

JANIFFE PERES DE OLIVEIRA



**PRODUÇÃO DE MUDAS *IN VITRO* E OCORRÊNCIA DE MICROORGANISMOS
ENDOFÍTICOS EM BANANEIRAS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL**

RIO BRANCO

2009

JANIFFE PERES DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE MUDAS *IN VITRO* E OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS
ENDOFÍTICOS EM BANANEIRAS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Dr. Amauri Siviero

Co-orientador: Dr. Jonny E. Scherwinski-Pereira

RIO BRANCO

2009

© OLIVEIRA, J. P. de. 2009.

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Acre

O48d

OLIVEIRA, Janiffe Peres de. **Produção de mudas *in vitro* e ocorrência de microrganismos endofíticos em bananeiras da Amazônia Sul-Ocidental.** 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco-Acre, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Siviero

Co-orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

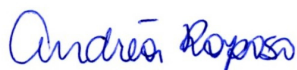
1. *Musa* spp., 2. Inflorescência, 3. Ápices caulinares, 4. Micropropagação, 5. Aclimatização, 6. Bactérias fixadoras de nitrogênio, I. Título

CDU 631 (811.2)

**PRODUÇÃO DE MUDAS *IN VITRO* E OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS
ENDOFÍTICOS EM BANANEIRAS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL**

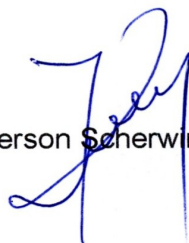
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

APROVADA em 07 de Agosto de 2009



Prof.ª. Dr.ª Andrea Raposo

Embrapa Acre



Prof.º. Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Prof.º. Dr. Amauri Siviero

Embrapa Acre

Orientador

RIO BRANCO

2009

OFEREÇO

Aos meus irmãos Johnatan Peres de Oliveira e Maira Peres de Oliveira.
E aos sobrinhos Carlos Eduardo e Vitória Ysah.

Essa conquista é nossa!

Aos meus pais João Paes de Oliveira e Marizete Peres da Silva, pelos ensinamentos que foram fundamentais para formação do meu caráter, pela dedicação durante minha criação, pelo esforço despendido para me apoiarem nas dificuldades, por me proporcionarem e estarem presentes durante as melhores fases da minha vida e principalmente porque mesmo sendo pessoas simples sempre me deram o incentivo necessário para que eu continuasse lutando por essa conquista e ao Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, sem o qual não teria sido possível a conclusão deste trabalho.

DEDICO

Biografia

JANIFFE PERES DE OLIVEIRA, filha de João Paes de Oliveira e Marizete Peres da Silva, nasceu em 11 de novembro de 1982, no município de Xapuri, estado do Acre, onde morou e estudou até o primeiro ano do segundo grau. Aos dezesseis anos mudou-se para capital Rio Branco, onde se formou Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal do Acre (UFAC), em fevereiro de 2007.

Durante a formação acadêmica foi bolsista do Programa de iniciação científica financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante quatro anos desenvolvendo as atividades de pesquisa na Embrapa Acre.

Foi como bolsista PIBIC/CNPq que iniciou suas primeiras atividades na área de Cultura de Tecidos Vegetais no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa sob a orientação do Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, já trabalhando com a cultura da banana.

Foi aprovada na seleção do curso de pós-graduação em Agronomia da UFAC em outubro de 2006 e iniciou as atividades no mestrado de Produção Vegetal em março de 2007 na área de conhecimento de Melhoramento Vegetal e Recursos Genéticos dedicando-se a área de atuação de Biotecnologia e Cultura de Tecidos dando continuidade aos estudos com bananeiras.

Durante a especialização, desenvolveu parte do trabalho prático da dissertação na Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, onde passou um semestre do curso adquirindo experiência em trabalhos com microrganismos diazotróficos isolados de banana.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, saúde e proteção, por nunca ter me abandonado nos momentos de fraqueza e desânimo, mas, sobretudo, por ter usado minha fé como instrumento de incentivo, coragem e determinação para a realização dos sonhos de uma vida.

Aos meus pais e irmãos, pela paciência, carinho, amor, amizade e compreensão e em especial por nunca terem me deixado só mesmo estando distante.

Ao meu orientador Dr. Amauri Siviero pela compreensão, boa vontade e disposição em me orientar.

À meu co-orientador Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, pelo exemplo de pessoa e profissional que és, pela paciência e desprendimento para ensinar e, principalmente, pela confiança que depositou em mim durante todos esses anos de parceria, sendo não apenas um incentivador do meu trabalho, mas também um amigo que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a crescer.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Acre e seus funcionários, pela oportunidade e apoio durante a realização dos trabalhos.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agronomia bem como todos aqueles que de alguma forma foram para mim, exemplo de grandes profissionais que contribuíram brilhantemente com a minha formação profissional.

Aos amigos Rean Augusto Zaninetti, Mizael Vasconcelos Maciel e Raone Miranda pela amizade, companheirismo, alegrias e principalmente pelo apoio, não me deixando perder a fé, as forças e a confiança no meu potencial.

Aos amigo de trabalho, Tatiane Loureiro, Simone Maciel, Luiz Gustavo de M. C. e Silva, Dra. Andrea Raposo, Msc. Rodrigo da Silva Guedes e Msc. Lauro Saraiva Lessa pela ajuda prestada na hora das pesquisas e análises e, sobretudo pela amizade que nasceu nestes anos de convivência e que será preservada sempre.

Aos amigos do programa de pós-graduação, em especial a Elequisandra Araruna por tudo que compartilhamos nesta fase, alegrias, dúvidas, força de vontade, conhecimento, solidariedade, desanimos e sobretudo a superação de todos os obstáculos enfrentados.

Ao colega Msc. Frederico Henrique da Silva Costa pela incontestável

contribuição no que se refere aos trabalhos científicos desenvolvidos e publicados em conjunto.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o desenvolvimento dos meus trabalhos de dissertação.

À pesquisadora da Embrapa Agrobiologia Dra. Veronica Reis pela orientação e a todos os colegas do Laboratório de Gramíneas e Meio de Cultura pela recepção e ajuda durante a execução dos trabalhos na Embrapa Agrobiologia.

À pesquisadora da Embrapa Agrobiologia Prof. Dra. Vera Lúcia Baldani pela grande profissional, pela ajuda prestada e pela amizade dedicada durante minha permanência no Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia.

Aos colegas do alojamento CNPAB Seropédica, Rio de Janeiro, e em especial Ana Paula, Jakson Leite, Guilherme e Cecília pela amizade e ajuda, Dona Vera pelos conselhos e pela comidinha sempre deliciosa, e as amigas de quarto Raquel Reis Ruz e Régia Gualter por terem iluminado meus dias com muita alegria, carinho e respeito que acabou se transformando em uma bela amizade.

À todos aqueles, que mesmo não citados, contribuíram de forma positiva durante esta etapa de minha vida.

“Não existe limites para se
aperfeiçoar na sabedoria e no amor.”
Seicho-No-Ie

RESUMO

A bananicultura têm se constituído como uma das principais fontes de renda para a agricultura familiar no Sudoeste da Amazônia. Contudo, esta atividade está em risco na Região, especialmente pelo uso de cultivares suscetíveis a doenças e falta de material propagativo de qualidade para formar os plantios. A cultura de tecidos de plantas é uma técnica de grande aplicação para rápida multiplicação de um elevado número de mudas livres de patógenos, além de ser uma ferramenta aplicável em diversas áreas da agricultura. Este trabalho teve por objetivo geral otimizar a propagação clonal *in vitro* e detectar a ocorrência de microrganismos endofíticos e diazotróficos em genótipos de bananeira da Região Sudoeste da Amazônia. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, Rio Branco, AC, e nos Laboratórios de Gramíneas e Meio de Cultura da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Para os experimentos de micropropagação utilizaram-se explantes caulinares das cultivares Maravilha, Preciosa, Pacovan Ken e Japira onde foram testadas diferentes concentrações de BAP (0, 2, 4 e 6 mg.L⁻¹) e ainda, explantes florais das cvs. Preciosa e FHIA 02 em meio de cultura contendo 4 mg.L⁻¹ de BAP. Para ambos os experimentos foram avaliadas as taxas de multiplicação e estimado o número de mudas a serem produzidas em razão de sete subcultivos sucessivos. Seis diferentes substratos e dois tipos de tubetes (115 cm³ e 180 cm³ de capacidade) foram testados na aclimatização em condições de viveiro. Durante o processo de multiplicação *in vitro*, contaminantes de origem bacteriana foram isolados, caracterizados e identificados. Testes de sensibilidade à antibióticos, concentração bactericida mínima inibitória e fitotoxicidade foram realizados visando selecionar substâncias para o controle dos microrganismos. Em razão da ocorrência de diazotróficos entre os contaminantes identificados, amostras de solo e raízes de 30 genótipos de bananeira foram avaliadas quanto à presença de isolados fixadores de nitrogênio atmosférico. Os isolados obtidos neste estudo foram caracterizados e agrupados por dendogramas de similaridade. Na média, as taxas de multiplicação utilizando-se ápices caulinares e gemas florais alcançaram entre 2,7 e 6,1 brotos por explante, respectivamente, na concentração de 4 mg.L⁻¹ BAP. Na aclimatização, a sobrevivência das microplantas alcançou média superior a 96% em substrato formado com casca de arroz carbonizada, terra de mato e

esterco bovino (3:1;1 v/v), independentemente da capacidade do tubete utilizado. Oito estirpes bacterianas contaminantes foram isoladas durante os subcultivos, pertencentes às espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas hydrophila*. Estes contaminantes mostraram-se sensíveis aos antibióticos Cefaclor, Ácido Nalidíxico e Vancomicina nas concentrações de 512 e 1.024 mg.L⁻¹. Em meio de cultura, o antibiótico Cefaclor afetou a taxa de multiplicação dos explantes a partir da concentração de 512 mg.L⁻¹. Das amostras de solo e raízes dos genótipos de bananeira utilizados para o estudo foram isolados 67 fenótipos culturais, com a formação de até 22 grandes grupos com pelo menos 90% de similaridade. Todos os isolados obtidos apresentaram potencial para produção de auxina e fixação biológica de nitrogênio atmosférico.

Palavras-chave: *Musa* spp., inflorescência, ápices caulinares, micropropagação, aclimatização, substratos, contaminação, ácido indolacético, redução de acetileno, bactérias fixadoras de nitrogênio.

ABSTRACT

The banana crop has constituted as one of the main sources of income for familiar agriculture in the Southwest Amazon. However, this activity is in risk, especially because the use of susceptible banana cultivars to diseases and it lacks of propagative material with quality for plantations. The plant tissue culture is a technique of great application for fast multiplication of a high number of elite and disease-free plants and can be applicable in several areas of the agriculture. This work has as objective to optimize the in vitro clonal propagation of disease resistant banana cultivars and to evaluate the occurrence of contaminants and diazotrophic endophytic microorganisms in banana genotypes from Southwest Amazon. The works were carried out in the Laboratory of Morfogênese and Biologia Molecular of Embrapa Acre, Rio Branco, AC, and in the Laboratories of Gramíneas and Meio de Cultura of Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. For the micropropagation experiments shoot tip explants of Preciosa, Maravilha, Pakovan Ken and Japira cultivars were used in combination with different BAP concentrations (0, 2, 4 and 6 mg.L⁻¹). Floral explants of Preciosa and FHIA 02 cultivars were also evaluated in MS medium added of 4 mg.L⁻¹ of BAP for multiple shoots formation. For both experiments the multiplication rates and estimates of the number of plantlets to be produced in reason of seven successive subcultures were evaluated. Six different substrates and two types of plastic dibble tubes (115 cm³ and 180 cm³ of capacity) were evaluated during the banana plantlets acclimatization in nursery. During the in vitro multiplication, bacterial contaminants were isolated, characterized and identified. Besides, the bacterial sensibility to different antibiotics was evaluated. The phytotoxicity of these products was also determined in vitro. In reason of diazotrophic microorganism occurrence among the identified contaminants, soil and roots samples of 30 banana genotypes were evaluated in relation to the presence of nitrogen-fixing bacteria (NFB). The NFB isolated were characterized, and dendrograms based on the similarity of the isolated were done. In average, the multiplication rates using apex and floral explants reached up to 2.7 and 6.1 new shoot per explant, respectively, in 4 mg.L⁻¹ BAP. In the acclimatization, the microplants survival reached at 96% in substrate composed by soil, carbonized rice hulls and bovine manure (3:1:1 v/v), independently of the plastic dibble tubes capacity. Eight isolates of in vitro

bacterial contaminants were isolated during the subcultures, belonging to *Klebsiella pneumoniae* and *Aeromonas hydrophila* species. These contaminants were sensitive to Cefaclor, Nalidixic acid and Vancomycin antibiotics in concentrations of 512 and 1,024 mg.L⁻¹. In culture media, the only antibiotic that affected the multiplication rate was Cefaclor. From soil and roots samples of the banana genotypes used in this study, it was isolated 67 cultural phenotypes with the formation of up to 22 great groups at a similarity of at least 90%. All isolates presented potential to auxin production and capacity to fix atmospheric nitrogen.

Palavras-chave: *Musa* spp., inflorescences, shoot tips, micropropagation, acclimatization, substrates, contamination, indole acetic acid, acetylene reduction, nitrogen-fixing bacteria.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 A - Aspecto de explante contaminado por bactéria em fase inicial de cultivo; B - Aspecto de explante sadio em fase inicial de cultivo; C - Explantes em fase de multiplicação; D - Aspecto das mudas após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação. 56
- FIGURA 2 A- Brotações a partir de inflorescência no início do cultivo; B e C- Brotações de inflorescência a partir do 3º subcultivo; D e E- Inflorescências em 4 mg.L⁻¹ de BAP a partir do quinto subcultivo; F- Fonte de explante de ápice floral..... 60
- FIGURA 3 Aclimatização de mudas cv. Grande Naine no viveiro da Embrapa Acre; Comparação entre mudas aclimatizadas em: A - tubetes pequenos (115 cm³); B- tubetes grandes (180 cm³); C- Aspecto das mudas oriundas da micropropagação após 45 dias de aclimatização. 66
- FIGURA 4 Biotestes de sensibilidade de contaminante bacteriano de banana a antibióticos, mostrando sensibilidade (a) ou não (b) ao agente antimicrobiano testado. 71
- FIGURA 5 Escala ilustrativa de turbidez no meio líquido inoculado com bactérias contaminantes, isoladas de explantes de bananeira micropropagados, contendo diferentes concentrações de antibióticos: A- meio turvo com 256 mg.L⁻¹; B- meio turvo com 512 mg.L⁻¹; C- meio não turvo com 1.024 mg.L⁻¹..... 73
- FIGURA 6 Número de isolados obtidos de amostras de raiz e solo rizosférico de cultivares de bananeiras em meios de cultura JNFb e LGI..... 79
- FIGURA 7 Número de isolados obtidos de cultivares de bananeira através dos meios JNFb e LGI em ambos os tipos de amostras (solo e raiz): amostras coletadas em Rio Branco, Acre. 80
- FIGURA 8 Isolados diazotróficos bacterianos de bananeiras inoculados em meios semi-sólidos após sete dias de cultivo; A – Escala gradual da mudança de pH do meio JNFb devido ação das bactérias: a – meio sem alteração de pH, b – meio em transição para pH básico; B – Escala gradual da mudança de pH do meio LGI

| | | |
|-----------|---|----|
| | devido ação das bactérias: a – meio sem alteração de pH, b – meio em transição para pH ácido; C – aspecto da película densa característica do crescimento bacteriano em meio semi-sólido e; D – aspecto da película fina subsuperficial característica..... | 81 |
| FIGURA 9 | Grupos de isolados bacterianos diazotróficos obtidos de bananeiras formados por dendograma de similaridade para o meio LGI, a partir de dados analisados pelo programa NTSYS, índice SM..... | 84 |
| FIGURA 10 | Grupos de isolados bacterianos diazotróficos obtidos de bananeiras formados por dendograma de similaridade para o meio JMV a partir de dados analisados pelo programa NTSYS, índice SM..... | 85 |
| FIGURA 11 | Grupos de isolados bacterianos diazotróficos obtidos de bananeiras formados por dendograma de similaridade para meio NFB _{3x} a partir de dados analisados pelo programa NTSYS, índice SM..... | 86 |
| FIGURA 12 | Grupos de isolados bacterianos diazotróficos obtidos de bananeiras formados por dendograma de similaridade para meio Batata, a partir de dados analisados pelo programa NTSYS, índice SM..... | 87 |
| FIGURA 13 | Isolados bacterianos diazotróficos crescidos em meio semi-sólido para caracterização morfológica: A - NFB _{3x} ; B – LGI; C – JMV e D, E e F: aspecto das colônias puras de três tipos distintos de isolados de bananeira..... | 88 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 1 | Taxa de multiplicação e estimativa de produção das cultivares de bananeira Preciosa, Maravilha, Japira e Pacovan Ken, a partir de gemas apicais durante o cultivo in vitro após seis subcultivos em meio de cultura com diferentes concentrações de BAP..... | 55 |
| TABELA 2 | Avaliação das perdas por contaminação fúngica e bacteriana ao longo de seis subcultivos in vitro das cultivares de bananeira Preciosa, Maravilha, Japira e Pacovan Ken independente das concentrações de BAP utilizadas no meio de cultura | 55 |
| TABELA 3 | Avaliação das perdas por contaminação bacteriana ao longo de sete subcultivos in vitro das cultivares de bananeira Preciosa e FHIA 02..... | 59 |
| TABELA 4 | Taxas de multiplicação por clones das gemas florais de bananeira in vitro, com 4 mg.L ⁻¹ de BAP, das cultivares Preciosa e FHIA 02..... | 59 |
| TABELA 5 | Características químicas dos Substratos testados e de seus componentes | 61 |
| TABELA 6 | Taxa de sobrevivência, altura da parte aérea e diâmetro do pseudocaulo de mudas micropropagadas de bananeira, cv. Grande Naine, após 75 dias de aclimatização..... | 65 |
| TABELA 7 | Massa fresca de raízes, parte aérea e total de mudas micropropagadas de bananeira, cv. Grande Naine, após 75 dias de aclimatização | 65 |
| TABELA 8 | Massa seca de raízes, parte aérea e total de mudas micropropagadas de bananeira, cv. Grande Naine, após 75 dias de aclimatização | 66 |
| TABELA 9 | Caracterização de isolados bacterianos endofíticos obtidos de explantes de bananeira das Cultivares Thap Maeo, Preciosa e Maravilha durante a micropropagação..... | 69 |
| TABELA 10 | Sensibilidade de estirpes bacterianos isolados de banana cultivada in vitro a antibióticos* | 71 |
| TABELA 11 | Concentração bactericida mínima inibitória (CBMI) dos antibióticos Ácido Nalidixico, Cefaclor, Cefalexina, Cloranfenicol, | |

| | | |
|-----------|--|----|
| | Vancomicina e Cefalotina para as diferentes estirpes bacterianas isoladas de banana sob micropropagação | 73 |
| TABELA 12 | Teste de confirmação da inibição do crescimento em placas de petri de colônias de bactérias das concentrações que não apresentaram turvação no meio, após dois dias..... | 73 |
| TABELA 13 | Taxa de multiplicação e sobrevivência de explantes de bananeira cv. Preciosa, sob diferentes concentrações de Cefaclor, Ácido Nalidixico e Vancomicina em meio semi-sólido contendo 4 mg.L ⁻¹ de BAP, após 30 dias de cultivo | 75 |
| TABELA 14 | Número de células (x 10 ⁵) por grama de peso fresco de bactérias diazotróficas associadas às raízes e solo rizosférico de 30 cultivares de bananeira coletadas no Estado do Acre | 79 |
| TABELA 15 | Atividade de produção de Ácido Indolacético por bactérias diazotróficas isoladas de bananeiras e estirpes de referência..... | 90 |
| TABELA 16 | Atividade de redução de acetileno de bactérias diazotróficas isoladas de bananeiras e estirpes de referência, após sete dias de incubação à 30 °C..... | 92 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA..... | 22 |
| 2.2 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO DA CULTURA: PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL X PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> | 24 |
| 2.2.1 Propagação convencional | 24 |
| 2.2.2 Propagação <i>in vitro</i> | 25 |
| 2.2.2.1 Etapas da propagação <i>in vitro</i> | 27 |
| 2.2.2.2 Aclimatização | 28 |
| 2.2.2.3 Tipos de explantes | 31 |
| 2.3 OCORRÊNCIA DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS: PRINCIPAL CAUSA DE PERDAS DE MUDAS DURANTE A MICROPROPAGAÇÃO DA BANANA..... | 32 |
| 2.4 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E SUA OCORRÊNCIA EM PLANTAS DE BANANEIRA..... | 35 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 3.1 PRODUÇÃO DE MUDAS DE BANANEIRAS POR MICROPROPAGAÇÃO.. | 39 |
| 3.1.1 Micropropagação de banana a partir de ápices caulinares | 39 |
| 3.1.2 Micropropagação de banana a partir de gemas florais | 40 |
| 3.1.3 Condições do cultivo <i>in vitro</i> | 41 |
| 3.1.4 Enraizamento e aclimatização das mudas produzidas <i>in vitro</i> | 41 |
| 3.2 ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO DE MUDAS DE BANANEIRAS MICROPROPAGADAS NAS CONDIÇÕES DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL: EFEITO DE TIPOS DE SUBSTRATOS E RECIPIENTES | 42 |
| 3.3 DIAGNOSE E CONTROLE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS CONTAMINANTES EM EXPLANTES DE BANANEIRAS..... | 43 |
| 3.3.1 Isolamento e purificação de bactérias endofíticas contaminantes de banana durante o cultivo <i>in vitro</i> | 43 |
| 3.3.2 Identificação de bactérias endofíticas contaminantes de banana durante o cultivo <i>in vitro</i> | 44 |
| 3.3.3 Testes de sensibilidade dos isolados bacterianos a antibióticos..... | 45 |
| 3.3.4 Determinação da concentração bactericida mínima inibitória (CBMI) | 46 |
| 3.3.5 Avaliação de antibióticos para uso no cultivo <i>in vitro</i> de bananeiras: efeito da fitotoxicidade sobre os cultivos | 47 |
| 3.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM GENÓTIPOS DE BANANEIRAS | 48 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.1 Contagem e Isolamento | 48 |
| 3.4.1 Caracterização morfo-fisiológica dos isolados | 49 |
| 3.4.1.1 Aspectos morfológicos das culturas | 50 |
| 3.4.1.2 Aspectos fisiológicos das culturas | 50 |
| 3.4.1.2.1 Produção de Ácido Indolacético (AIA) | 50 |
| 3.4.1.2.2 Redução de acetileno (ARA) | 51 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| 4.1 PRODUÇÃO DE MUDAS DE BANANEIRAS POR MICROPROPAGAÇÃO | 53 |
| 4.1.1 Micropropagação de banana a partir de ápices caulinares | 53 |
| 4.1.2 Micropropagação de banana a partir de gemas florais | 56 |
| 4.2 ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO DE MUDAS DE BANANEIRAS MICROPROPAGADAS NAS CONDIÇÕES DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL: EFEITO DE TIPOS DE SUBSTRATOS E RECIPIENTES | 60 |
| 4.3 DIAGNOSE E CONTROLE DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES EM EXPLANTES DE BANANEIRAS | 66 |
| 4.4 TESTES DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS BACTERIANOS A ANTIBIÓTICOS | 68 |
| 4.4.1 Determinação da concentração bactericida mínima inibitória (CBMI) | 72 |
| 4.4.2 Fitotoxicidade de antibióticos para uso no cultivo <i>in vitro</i> de bananeira | 74 |
| 4.5 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM GENÓTIPOS DE BANANEIRAS | 77 |
| 4.5.1 Contagem e Isolamento | 77 |
| 4.5.2 Caracterização morfo-fisiológica dos isolados | 81 |
| 4.5.2.1 Aspecto morfológico das culturas | 81 |
| 4.5.2.1 Aspectos fisiológicos das culturas | 88 |
| 4.5.2.1.1 Produção de Ácido Indolacético (AIA) | 88 |
| 4.5.2.1.2 Redução de acetileno (ARA) | 90 |
| 5 CONCLUSÕES | 93 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 95 |
| REFERÊNCIAS | 97 |
| ANEXOS | 120 |

1 INTRODUÇÃO

Entre as espécies frutíferas plantadas no estado do Acre, a bananeira é a que apresenta a maior expressão econômica (OLIVEIRA et al., 2008b), com produção anual estimada em 85 mil toneladas. Essa atividade movimentou a economia local gerando um PIB com valores aproximados ao do açaí, castanha e até madeira, além de ser um setor produtivo gerador de empregos, seja de forma direta ou indireta (FERREIRA, 2008).

Contudo, a cultura da bananeira ainda apresenta níveis baixos de produtividade em razão da pouca tecnificação dos plantios e do uso de variedades suscetíveis às principais doenças da cultura (prata, maçã e terra), notadamente a Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*), Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola*) e mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*). Devido a isto, a bananicultura no Estado chegou a sofrer uma redução na produção e na área cultivada de aproximadamente 42% em 2001, o que repercutiu em impactos negativos nos diversos segmentos da cadeia produtiva (OLIVEIRA et al., 2008b).

Contudo, são grandes os esforços empregados por instituições de pesquisa visando a obtenção de híbridos de bananeira mais produtivos, com porte reduzido e que apresentem resistência às principais pragas e doenças que prejudicam o desenvolvimento da cultura (SILVA et al., 2003; JESUS, 2006).

As técnicas biotecnológicas, com destaque a cultura de tecidos de plantas (GOMES et al., 2005), realizada em condições controladas de laboratório, tem sido a melhor alternativa para se obter material propagativo em quantidade e com qualidade, sendo utilizada atualmente como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento genético da bananeira, visando acelerar a obtenção e distribuição de novas variedades (SILVA; SANTOS-SEREJO, 2003; COSTA et al., 2008).

Essa forma de propagação *in vitro*, além de maximizar o potencial de propagação vegetativa a partir de gemas apicais, pode ainda, proporcionar a produção de mudas por meio de propágulos alternativos, como gemas florais, em razão da desdiferenciação celular induzida a partir de determinado balanço de reguladores vegetais presentes no meio de cultura. As gemas florais são retiradas do coração dos cachos de bananeira que são comumente descartados, constituindo-se uma vantagem adicional do método para a produção de novas mudas.

O uso da cultura de tecidos na propagação clonal de bananeira permite a

produção de um elevado número de plantas em tempo e espaço reduzidos, além de garantir o estado fitossanitário das mudas. Partindo-se desta técnica a Embrapa Acre distribuiu, aproximadamente, 25 mil mudas matrizes de bananeira resistentes a Sigatoka-negra no Estado em 2007.

No entanto, para a multiplicação e difusão acelerada de mudas micropropagadas para o setor produtivo, é necessário o estabelecimento de protocolos que propiciem altas taxas proliferativas *in vitro*, uma vez que essas taxas são bastante variáveis em função do genótipo utilizado (OLIVEIRA et al., 2001; DEBIASE et al., 2002).

Na etapa de multiplicação *in vitro*, um dos principais problemas encontrados e que pode até mesmo inviabilizar o cultivo, refere-se às contaminações microbianas. Embora seus efeitos sejam pouco conhecidos, sob condições *in vitro*, a presença destes microrganismos constitui-se numa das mais importantes causas de perda de material vegetal (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003).

Os microrganismos que têm sido isolados com maior frequência têm sido os fungos, as leveduras e as bactérias (LEGGATT et al., 1988; LEIFERT; WOODWARD, 1998; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003). Geralmente, fungos e leveduras crescem bem em meio de cultura, podendo ser identificada sua presença logo no início do cultivo. Entretanto, os maiores problemas normalmente estão relacionados com as contaminações bacterianas, especialmente aquelas que permanecem latentes *in vitro*, ou seja, não apresentam crescimento visível no meio nem sintomas nos tecidos nos primeiros subcultivos. As bactérias passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos cultivos, podendo levá-los rapidamente à morte (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003).

Apesar das contaminações causadas por microrganismos (fungos, bactérias e leveduras) serem prejudiciais durante a fase de multiplicação *in vitro* das mudas, sabe-se que sob condições *ex vitro*, muitos dos microrganismos endofíticos apresentam uma relação benéfica com a planta hospedeira, podendo esta simbiose estar relacionada com a produção de hormônios de crescimento ou ainda a fixação biológica de nitrogênio (BALDANI et al., 1997; KLOEPPER et al., 1997; BEVIVINO et al., 1998; PEIX et al., 2001; VIDEIRA et al., 2007).

Assim, considerando-se a importância que pode ter alguns desses microrganismos no desenvolvimento *ex vitro* das plantas é que se deve ampliar a

atenção aos estudos envolvendo microrganismos não patogênicos em plantas, uma vez que muito ainda há para se compreender sobre a interação planta-microrganismos.

Outro fator igualmente importante no que se refere ao sucesso da micropropagação é a fase de aclimatização das mudas, onde podem ocorrer perdas significativas por morte dos materiais micropropagados em razão das mudanças bruscas das condições ambientais. No entanto, ainda são incipientes os trabalhos que relatam a aclimatização de mudas micropropagadas nas condições da Amazônia, sendo que para os estados da Amazônia Sul-Occidental, incluindo Acre e Rondônia, até o momento, estes estudos são inexistentes.

Este trabalho teve por objetivo geral otimizar a propagação clonal *in vitro* de cultivares de bananeira resistente a doenças e de identidade varietal reconhecida, além de determinar a ocorrência de microrganismos endofíticos e diazotróficos em genótipos de bananeira da Região Sudoeste da Amazônia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA

Originária da Costa Ocidental da África (MOREIRA, 1987), a bananeira (*Musa spp.*) é um importante elemento constituinte da alimentação humana, tanto pelo seu valor nutritivo, quanto pelo seu baixo custo, contribuindo fortemente para a fixação da mão-de-obra rural (BORGES et al., 1997).

A cultura da bananeira ocupa o segundo lugar no mundo em área colhida dentre todos os tipos de frutas, superada apenas pela dos citros (SOUZA; TORRES FILHO, 1997). Nos últimos anos, tem ocorrido uma ampliação do mercado consumidor e conseqüente elevação dos preços da banana, o que tem ocasionado à expansão da cultura em vários estados brasileiros (SILVA et al., 2006), e levado esta fruta ao *ranking* das frutas de maior produção e comercialização mundial.

Apesar desta fruta ser responsável por 37% do volume total de frutas transacionadas no mercado internacional (RANGEL et al., 2002), segundo Barros et al. (2008), em 2006 esse valor representou apenas 3% da produção total de banana no Brasil. Contudo, a comercialização da banana é muito difusa e por esse motivo, a bananicultura tem se tornado um dos principais segmentos agrícolas da economia do país, onde o Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial desta fruta (GOMES et al., 2005), com uma produção estimada na ordem de 605 milhões de toneladas.

A produção de banana no Brasil, no período 2001-2006, medida em toneladas, aumentou 12,6%, apesar de se ter sido observado uma redução de área cultivada neste mesmo período (BARROS et al., 2008). Esse incremento na área cultivada se deu, principalmente, pela introdução de variedades resistentes ao mal de Sigatoka em meados de 2005 (OLIVEIRA et al., 2007).

No território brasileiro, quando se considera a preferência para o cultivo e consumo, destacam-se as variedades tipo Maçã, Mysore, Prata, Plátano e as do tipo Cavendish (OLIVEIRA, et al., 2008b; SILVA et al., 2003) com sua importância econômica voltada para o volume exportado, onde só em 2005, foi na ordem de 212 mil toneladas no Brasil o que representou cerca de 33 milhões de dólares em divisas (BRASIL, 2006).

A cultura constitui-se como uma das principais fontes de renda para os

pequenos produtores e atualmente, a bananicultura brasileira passou a ocupar uma área de 582 mil ha (FAO, 2007), onde somente a região Norte participa desta produção com 91.836 ha de área plantada.

Da área cultivada com bananas na região Norte do Brasil, o estado do Acre representa 9,71% deste total, tendo atualmente, o município de Acrelândia como o maior produtor do Estado (OLIVEIRA, et al., 2008b) com uma área plantada de cerca de 2.000 hectares e produção de 18 mil toneladas (IBGE, 2006).

Contudo, nos últimos anos observou-se uma redução de aproximadamente 42% de área cultivada, ocasionando impactos negativos em vários segmentos da cadeia produtiva (OLIVEIRA et al., 2008b). Isso tem ocorrido, em grande parte, devido à utilização generalizada de cultivares (prata, maçã e terra) suscetíveis às mais importantes doenças da cultura que é ainda produzida sem nenhum controle e muitas vezes pela abertura de novas áreas de cultivo utilizando mudas não certificadas sem garantia de sanidade da plantação (COSTA et al., 2008).

Entretanto, a partir de programas de melhoramento genético da cultura, a Embrapa já lançou no mercado nacional variedades de banana com importantes qualidades agronômicas, como porte baixo e resistência a doenças, como: 'Caipira', 'Thap Maeo', 'FHIA 18', 'Prata Baby' (Nam), 'Pacovan Ken' (PV42-68), 'Prata Graúda' (SH36-40), 'Preciosa' (PV42-85), 'Maravilha' (FHIA 01) 'Tropical' (YB42-21), entre outras (SILVA, et al., 2003). Destas, cinco foram testadas e recomendadas para plantios nas condições edafoclimáticas do Estado do Acre, sendo elas a 'Preciosa', 'Maravilha', 'Thap Maeo', 'Japira' e 'Pakovan Ken'.

As recentes pesquisas consolidam a banana entre os mais importantes produtos de exportação e consumo da região apresentando um valor de produção de R\$ 12,2 milhões, representando 53,48% do valor da produção das lavouras permanentes do Estado (IBGE, 2006). Essa importância fica ainda mais evidente quando se compara o valor da produção da banana com o valor da produção de algumas atividades econômicas do Acre, como por exemplo a madeira em tora com um valor de 12,53 milhões, a borracha com R\$ 2,88 milhões, o café beneficiado com R\$ 2,8 milhões, o açaí com R\$ 393 mil a até mesmo a castanha-do-brasil, que em 2006 foi de R\$ 12,25 milhões (FERREIRA, 2008).

Por esse motivo, dados divulgados pelo Sebrae (2008), chegaram a estimar que cerca de três mil famílias sobrevivam diretamente do comércio ou produtos de banana em Rio Branco. Mas a importância desta fruta não é apenas econômica, e

estudos tem revelado que além de ser apreciada por seus aspectos sensoriais e valor nutricional, a banana é indicada como uma potencial fonte de vitamina A, B1, B2, C e pequenas quantidades de vitamina D e E, fibras e potássio (MATSSURA et al., 2004).

A banana é uma fruta com características medicinais, inclusa no grupo dos alimentos funcionais, considerada um prebiótico que ajuda na regulação intestinal, redução do risco de câncer, bem como suas fibras diminuem os níveis de colesterol total e triglicerídeos no sangue e ainda redução da intolerância a lactose (ANJO, 2004).

Além disso, algumas substâncias presentes na fruta ajudam no tratamento da depressão, anemia, úlcera, excesso de peso, TMP, estresse no trabalho, ajuda na recuperação dos efeitos da retirada da nicotina do organismo além de ser indicado na recuperação após o consumo de bebidas alcoólicas. Por ser rica em potássio, sua inclusão na dieta de adultos e idosos auxilia para uma boa função muscular, inclusive para o coração, é ótima fonte de energia, seu consumo também reduz o risco de derrame e doenças relacionadas à pressão sangüínea (FERREIRA, 2008).

Quando verde, a banana é constituída essencialmente por água e amido (55% a 93% dos sólidos totais) (FASOLIN et al., 2007). Por esse motivo, a banana é utilizada ainda, como fonte de alimentação na forma de ingredientes para a composição de farinhas, sendo utilizadas ainda como fontes de hidratos de carbono em diversos pratos do cardápio brasileiro e até sua casca após desidratada e triturada pode ser utilizada como suplemento da ração animal (FERREIRA, 2008).

Assim, torna-se indiscutível a importância da banana, seja na área econômica, social, nutricional e até mesmo medicinal.

2.2 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO DA CULTURA: PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL X PROPAGAÇÃO *IN VITRO*

2.2.1 Propagação convencional

Por tratar-se de frutos partenocárpicos e efetivamente estéreis, convencionalmente a banana é propagada por meio de rizomas (separação de brotos do rizoma-mãe, fracionamento do rizoma, propagação rápida). Teoricamente, uma bananeira pode produzir tantas mudas quanto forem as folhas emitidas até o

surgimento do cacho, e embora Oliveira et al. (2008b), em estudos realizados nas condições locais, tenham observado que o número médio de folhas produzidas pelas mudas de bananeira durante três ciclos não foi superior a 12,5, Alves et al. (2004) revelaram que o número de folhas de banana pode chegar à aproximadamente 38. Contudo, o potencial de uma alta produção de mudas não se traduz naturalmente devido a influencia da dominância apical da planta mãe e dos filhotes já desenvolvidos (COSTA, 2007).

Além disso, dependendo da cultivar, do porte da bananeira e da idade da planta-mãe, o potencial de produção de rebentos emitidos até o surgimento do cacho pode ser reduzido a aproximadamente 25% (ALVES et al., 2004), representando cerca de 3 a 10 filhotes por matriz em um período geralmente superior a 12 meses, a depender das condições de manejo da cultura (VUYLSTEKE; DE LANGHE, 1985).

Portanto, o método de propagação convencional de banana está entre os principais aspectos que limitam a expansão da cultura da bananeira, pois além de apresentarem baixo rendimento no número de propágulos produzidos (VUYLSTEKE, 1989), podem se constituir num poderoso mecanismo de disseminação de pragas, fungos e nematóides (SAGI et al., 1998; ROELS et al., 2005), e ocasionar perdas de até 100% na produtividade (SILVA et al., 2003).

Além da baixa taxa de multiplicação e da possibilidade de comportarem-se como vetores na disseminação de doenças as mudas obtidas pelo processo convencional de propagação, apresentam grande desuniformidade, o que dificulta o manejo do pomar. Muito embora os métodos de propagação convencional estejam sendo aperfeiçoados de modo a elevar a taxa de multiplicação e incrementar a produção de mudas de qualidade, estes métodos tem sido considerado como pouco efetivos quanto à sanidade e uniformidade das plantas obtidas (ALVES et al., 2004).

2.2.2 Propagação *in vitro*

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; COSTA et al., 2009).

Os avanços conquistados no campo da fisiologia vegetal nos últimos 40 anos proporcionaram o desenvolvimento de tecnologias de propagação alternativas aos

métodos convencionais através da cultura de tecidos (FLORES, 2003). Esta técnica de propagação vegetativa envolve a seleção da fonte de explante, desinfestação dos tecidos e a introdução dos mesmos em ambiente asséptico em meios de crescimento, enraizamento e aclimatização (VASIL; THORPE, 1994). Tendo em vista que as plantas são obtidas em ambiente asséptico, esta técnica possui grande aplicação e aceitação mundial por possibilitar o intercâmbio de material vegetal isento de patógenos entre os países, evitando assim, barreiras fitossanitárias.

A micropropagação, por ser uma técnica que permite a produção massal de plantas a partir de um mínimo de material utilizado como explante primário, é de particular importância para espécies onde o método de propagação convencional é pouco eficiente. Esse fato, pode lhe conferir ainda uma vantagem do ponto de vista ecológico na conservação *ex situ* de espécies nativas raras e ameaçadas de extinção ou ainda recalcitrantes, bem como evitando a retirada de grandes quantidades de exemplares dos habitats naturais para exploração econômica (FLORES, 2003).

Assim, o cultivo *in vitro* vem se tornando uma técnica cada vez mais comum no mercado visando suprir a demanda de uma produção agrícola cada vez mais tecnificada (MENDES et al., 1996) e já tem sido aplicada com sucesso para muitas espécies dentre as quais: abacaxi (MOREIRA et al., 2003; BARBOZA et al., 2006; COSTA et al., 2006;), mandioca (OLIVEIRA et al., 2000; SATO et al., 2001), cana-de-açúcar (SILVA et al., 2007), espécies ornamentais (THOMÉ et al., 2004, SANTOS, 2009) além da banana (ALVARES; CALDAS, 2002; COSTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

Os primeiros relatos sobre a aplicação da micropropagação, cultura de tecidos ou propagação *in vitro* de espécies do gênero *Musa* datam da década de 1960. Desde então tem ocorrido uma grande intensificação dos trabalhos de pesquisa a fim de tornar a técnica cada vez mais eficiente, produtiva e menos onerosa (SENDIN, 2001; SILVA et al., 2002; ROCHA, 2005; COSTA et al., 2007; COSTA, 2007; COSTA et al., 2009). Atualmente, a literatura dispõe de inúmeros trabalhos que podem confirmar o sucesso da produção de mudas de bananeira *in vitro* (BRAGA et al., 2001; LEMOS et al., 2001; SMITH et al., 2001; DEBIASI et al., 2002; SANTOS; RODRIGUES, 2004) e ainda alguns que relatam sobre a micropropagação de bananeira e a qualidade genética e fitossanitária das mudas produzidas (OLIVEIRA; SILVA, 1997; YOKOTA et al., 2007).

Assim, no que se refere a cultura da bananeira a propagação *in vitro* constitui uma importante ferramenta para obtenção massal de clones de genótipos elite (KOZAI et al., 1997), facilitando a distribuição, a conservação e o intercâmbio de germoplasma, além de proporcionar a rápida propagação e validação de variedades recentemente lançadas pelos programas de melhoramento genético da bananeira (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004; ROCHA, 2005) tendo em vista as limitações dos métodos de propagação convencional.

Estudos realizados por Oliveira et al. (2008) e Costa et al. (2006) nas condições climáticas de Rio Branco Acre, tem comprovado a eficiência da técnica e a capacidade de multiplicação e adaptação de genótipos de bananeira resistentes a doenças e cultivados na região, onde a produção anual pode chegar a aproximadamente 3.935 plantas por explante podendo variar de acordo com a cultivar utilizada.

Entretanto o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de fatores que vão desde a coleta e manipulação da planta matriz até a aclimatização e plantio no campo das novas plantas (BOMFIM, 2006).

2.2.2.1 Etapas da propagação *in vitro*

De acordo com Pasqual et al. (2001) um trabalho de micropropagação geralmente envolve seis etapas: preparativa, estabelecimento, multiplicação, alongamento, enraizamento e, por fim, a aclimatização.

Considera-se a fase inicial do cultivo *in vitro*, a preparação das plantas matrizes, destinadas ao fornecimento dos explantes primários para o cultivo (WILLADINO; CAMARA, 2005). Esta etapa requer atenção especial, pois é nesta etapa que se escolhem os melhores materiais para o cultivo, sendo determinante a escolha de plantas matrizes saudáveis, vigorosas, isenta de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento vegetativo (PASQUAL et al., 2001).

A segunda etapa que envolve o processo de micropropagação é a fase de estabelecimento. Segundo Torres et al. (1998), é composta pelos seguintes procedimentos: coleta, desinfestação, isolamento e cultivo dos explantes em meio de cultura e sob condições assépticas.

Um fator determinante da sobrevivência dos explantes durante os estágios

iniciais é o meio de cultura no qual estes são inoculados. O meio de cultura deve conter em sua composição sais e vitaminas necessárias ao desenvolvimento da planta durante essa fase. Diversos tipos de meios podem ser usados no início dos cultivos (BOMFIM, 2006), e apesar de serem encontrados na literatura vários tipos de meios propostos para o cultivo de diversas espécies, para a bananeira é comum o uso do meio MS descrito por Murashige e Skoog (1962).

A terceira etapa envolve o processo de multiplicação, onde os propágulos são multiplicados em escala durante sucessivos subcultivos em meio próprio de multiplicação, de modo que as partes formadas ou são subdivididas em partes menores ou são individualizadas para formação de novos explantes (BOMFIM, 2006). No caso da bananeira o meio de multiplicação mais indicado é o meio MS acrescido de reguladores de crescimento, que possuem efeito na quebra da dominância apical e na proliferação de gemas axilares.

Segundo Tombolato e Costa (1998), a concentração e o tipo de citocinina são fatores que mais influenciam na taxa de multiplicação dos explantes, sendo que para a bananeira é geralmente acrescido ao meio a citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP), em concentrações variando de 0,5 a 7,5 mg.L⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2001; BRAGA et al., 2001; LIMA; MORAES, 2006). Para esta fase, Pasqual et al. (2001) atentam ainda para a importância das condições ambientais da sala de crescimento (local de armazenamento dos frascos contendo as plantas durante o cultivo) serem favoráveis, principalmente no que diz respeito a luminosidade e temperatura, tendo em vista que a fase de multiplicação é considerada a mais longa de todo o processo.

Uma vez multiplicados em número suficiente, dependendo da espécie, o material geralmente é transferido para meios de alongamento e/ou enraizamento para formação de raízes adventícias, sendo que esta fase pode durar de 30 a 45 dias. Posteriormente, as mudas são transferidas para substrato ou solo apropriado visando a aclimatização finalizando assim o processo.

2.2.2.2 Aclimatização

Esta etapa é considerada como sendo uma das mais críticas da micropropagação e requer atenção, pois durante o período de aclimatização pode ocorrer morte das plantas, causando grandes prejuízos (TORRES et al., 1998).

Segundo Bomfim (2006), é comum confundir o termo aclimatização com

aclimação. Para George (1993), a aclimação é um processo regulado pela natureza, enquanto que a aclimatização é um processo controlado pelo homem. Assim, aclimação pode ser definida como sendo um termo que se refere ao processo no qual as plantas ou outros organismos vivos tornam-se ajustados a um novo clima ou situação, como resultado de um processo essencialmente natural (PREECE; SUTTER, 1991), enquanto que aclimatização é definida como sendo a transferência de um organismo, especialmente uma planta, para novo ambiente, sendo todo o processo realizado artificialmente (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

Segundo Wardle et al. (1983), o período de aclimatização, compreendido entre o transplante das plantas produzidas *in vitro* e o total estabelecimento em casa de vegetação, é complexo e, freqüentemente, ocorrem perdas significativas por morte.

Hazarika (2003), explica que tais perdas na fase de aclimatização podem ocorrer, pois as plantas não suportam drásticas mudanças ambientais proporcionadas pelo transplante, de um meio totalmente controlado para um ambiente hostil com elevados níveis de estresse (baixa umidade, luminosidade e temperaturas elevadas, doenças, etc). Além disso, as plantas recém micropropagadas são pouco eficientes fotossinteticamente, e as folhas das plantas cultivadas *in vitro* possuem menor quantidade de ceras epicuticulares do que as plantas crescidas em casa de vegetação ou no campo e, associadas à pouca funcionalidade dos estômatos e à fraca conexão com o sistema vascular, tornam-nas sensíveis a grandes perdas de água por transpiração, podendo ocasionar à morte destas (SCIUTTI; MORINI, 1993; ROSS-KARSTEN et al., 1998; POSPÍSILOVÁ et al., 1999; COSTA et al., 2009).

Outro aspecto a se considerar na fase de aclimatização refere-se ao padrão de crescimento das plantas. Isso se deve ao fato de que, ao sofrer mudança abrupta de ambiente, ou seja, passando de condições *in vitro* para *ex vitro*, normalmente as plantas apresentam uma parada ou redução do crescimento até que se adaptem às novas condições, podendo levar de dias a semanas até que retornem ao crescimento (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2000; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2001). Assim, a redução de perdas por morte, associada ao rápido crescimento de mudas na aclimatização são fatores que podem contribuir significativamente para que mudas micropropagadas cheguem ao setor produtivo de forma mais rápida e barata (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2004).

Alguns cuidados devem ser tomados durante o transplântio visando assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento satisfatório das plantas micropropagadas. Tais cuidados estão relacionados com as condições ambientais, os substratos, as condições fitossanitárias, a irrigação e os recipientes (BOMFIM, 2006), onde, a escolha adequada de substratos e recipientes específicos para cada espécie é de fundamental importância (SCHMITZ et al., 2002) para o sucesso da técnica e sobrevivência das plantas.

No caso dos substratos, suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem facilitar ou limitar a sobrevivência, formação de novas raízes e o conseqüente crescimento das plantas (FACHINELLO et al., 1995; CALVETE, 2000; SETUBAL; NETO, 2000; SILVA et al., 2004). Para Torres et al. (1998), um bom substrato deve apresentar uma boa capacidade de retenção de água e não compactar-se excessivamente, comprometendo a drenagem e, conseqüentemente, a aeração do sistema radicular.

Ressalta-se, ainda, que não apenas as propriedades físico-químicas devem ser consideradas na escolha de substratos e materiais que irão compor a mistura, devendo-se observar, também, o custo e sua disponibilidade. Desse modo, o uso de substratos e formulações facilmente disponíveis nos locais de produção das mudas, tais como pó de coco, esterco bovino, casca de arroz carbonizada, bagana de carnaúba, entre outros (PEIXOTO et al., 2006), são alternativas para a redução dos custos, com resultados positivos no desenvolvimento das plantas (BEZERRA; ROSA, 2002).

Quanto aos recipientes nos quais as plantas são cultivadas, devem-se considerar aspectos como o volume do recipiente que, poderão exercer influência decisiva no desenvolvimento e manutenção do ativo crescimento das plantas durante as etapas de aclimatização e enviveiramento. De maneira geral, as plantas crescem mais rapidamente em recipientes mais espaçosos, segundo Reis et al. (1989), o desempenho no campo é maior, à medida que as dimensões das mudas, por ocasião do plantio, forem maiores. A restrição do sistema radicular limita o crescimento e o desenvolvimento de várias espécies, pela redução da área foliar, altura e produção de biomassa. Ainda segundo estes autores, o pequeno volume dos recipientes exige, também, a aplicação de doses elevadas de nutrientes, devido às perdas por lixiviação, resultantes da necessidade de regas freqüentes.

Oliveira et al. (2008) têm elucidado em seus estudos as questões práticas

sobre as melhores composições e proporções de tipos de substrados, os melhores tipos e tamanhos de recipientes a serem utilizados para aclimatização de mudas de bananeira nas condições da Amazônia Sul-Occidental.

2.2.2.3 Tipos de explantes

Explante pode ser conceituado como sendo uma mistura de células em variados estados fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento, que quando expostos a um ambiente *in vitro*, sofrem reações diversificadas nos diferentes tipos celulares que o compõem, fazendo com que somente algumas células competentes respondam a um determinado estímulo, no caso da cultura de tecidos, normalmente a reguladores de crescimento (MANTELL et al., 1994).

Podem ser selecionados vários tipos de explantes para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta já que, teoricamente, qualquer tecido vegetal apresenta totipotência de suas células para originar novas plantas. No entanto, na prática, os explantes mais usados são os que possuem maior proporção de tecidos meristemáticos ou que apresentam maior capacidade de expressar a totipotência (TORRES et al., 1998).

Para Zaffari et al. (1995) e Araújo e Carvalho (2005), entre os diversos fatores relacionados à micropropagação, o tipo de explante, no que diz respeito à origem, tamanho, fase e manejo empregado, exerce forte influência nas subseqüentes respostas obtidas *in vitro*.

Na maioria dos trabalhos de micropropagação são utilizadas gemas axilares ou gemas apicais como explante inicial (PASQUAL et al., 2001). Entretanto, diferentes estudos demonstraram que o uso de ápices caulinares no processo de micropropagação de bananeira é eficiente para a produção de plantas (DHED'A et al., 1991; ISRAELI et al., 1991; VUYLSTEKE et al., 1991; COSTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

Contudo, apesar do grande potencial, outros poucos estudos verificaram que a cultura *in vitro* da bananeira também pode ser iniciada usando ápices florais como fonte de explantes (BALAKRISHNAMURTHY; SREE RANGASAMY, 1988; CRONAUER-MITRA; KRIKORIAN, 1988).

2.3 OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS: PRINCIPAL CAUSA DE PERDAS DE MUDAS DURANTE A MICROPROPAGAÇÃO DA BANANA

Bactérias endofíticas são microrganismos isolados do interior dos tecidos ou órgãos vegetais. Vários microrganismos, durante todo seu ciclo de vida, ou somente parte dele, vivem no interior dos vegetais. Usualmente, esses microrganismos vivem em uma associação que embora possa ser antagônica, muitas vezes é neutra ou benéfica para o hospedeiro. A natureza dessa associação é diversa e, via de regra, exibe vários graus de interdependência fisiológica e ecológica (SOUZA, 1996).

Apesar destes microrganismos não manifestarem, aparentemente, qualquer dano a seu hospedeiro, podem causar contaminações indesejáveis durante a etapa de micropropagação (CASSELLS, 1996; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003). Estas contaminações são consideradas as mais sérias ameaças para a cultura de tecidos (LEIFERT; WOODWARD, 1998; LEIFERT; CASSELLS, 2001; HERMAN, 2004).

Embora o exame visual das culturas para o óbvio crescimento microbiano ou turvação do meio seja geralmente considerado como o indicador de saúde de culturas *in vitro*, alguns contaminantes, particularmente bactérias, podem sobreviver em forma latente o que dificulta sua detecção em meios de cultura durante a fase inicial de cultivo (LEIFERT; WOODWARD, 1998; THOMAS, 2004; STROSSE et al., 2004).

Existe uma tendência de se atribuir a contaminação microbiana em cultura de tecidos vegetais à ineficácia no processo de desinfecção dos explantes ou a práticas ineficientes de assepsia ao longo do manejo com a cultura (THOMAS et al., 2008). Entretanto, microrganismos endofíticos não são eliminados por meio de agentes desinfetantes (THOMAS, 2007), uma vez que a desinfestação dos explantes é feita de forma superficial.

Apesar de seus efeitos serem ainda muito pouco conhecidos *in vitro*, devido, principalmente, ao fato destes organismos serem introduzidos sistematicamente no meio de cultura juntamente com os explantes no momento de seu estabelecimento, relatos da presença de microrganismos endofíticos em tecidos vegetais têm sido verificados em um grande número de espécies de plantas (MISAGHI; DONDELINGER, 1990; MUSSON et al., 1995; RAPS; VIDAL, 1998). Estes microrganismos vêm sendo objeto de aprofundados estudo, em especial por sua

importância na fixação de N₂ além de conferirem outras características benéficas aos seus hospedeiros, tais como maior resistência as condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, suprimento de nutrientes, produção de reguladores de crescimento vegetal, entre outros (SOBRAL, 2004; BENCHIMOL et al., 2000).

Em cultura de tecidos, geralmente, as contaminações são causadas por fungos, bactérias e leveduras e constituem as principais causas de perdas de material vegetal (LONG et al., 1988; LEIFERT; WOODWARD, 1998; DANTAS et al., 2000; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003). No entanto, os maiores problemas normalmente estão relacionados com as contaminações bacterianas, especialmente aquelas que permanecem latentes *in vitro*, ou seja, não apresentam crescimento visível no meio nem sintomas nos tecidos (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003).

No caso da bananeira, a matéria-prima destinada a micropropagação e conservação *in vitro* é protegida das camadas de solo por vários tecidos (THOMAS et al., 2008), e apesar de existirem poucos estudos que relatem sobre a contaminação microbiana em banana e, em especial, devido a contaminantes endofíticos (OLIVERIA et al., 2001; HABIBA et al., 2002), sabe-se que estes explantes podem apresentar altos níveis de contaminação (OLIVEIRA et al., 2001; SÁ; BRAGA, 2002), com taxas de até 39% para cultivar Japira segundo Oliveira et al. (2008a) enquanto que Braga et al. (2001) trabalhando com a cultivar Caipira verificou níveis de até 75% de contaminação bacteriana na fase de estabelecimento. Isso pode ocorrer, principalmente, devido à difícil visualização desses microrganismos durante os subcultivos, sendo detectados somente após um determinado período de tempo em que um grande número de plantas geralmente já está propagado (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003).

Alguns contaminantes podem agir de forma direta sobre o crescimento e desenvolvimento dos explantes. No entanto, a grande maioria compromete o desenvolvimento normal dos cultivos de forma indireta, pois estes acabam competindo com as plantas por nutrientes e vitaminas do meio de cultura e/ou produzem metabólitos fitotóxicos, tais como os ácidos lático e acético, cianeto, além de certos reguladores de crescimento e antibióticos, que intoxicam os tecidos vegetais podendo levá-los à morte (BAKKER; SCHIPPERS, 1987; STANIER et al., 1987; KLOEPPER et al., 1989; LEIFERT et al., 1989, 1991; YEPES; ALDWINCKLE, 1994).

Do ponto de vista prático, a melhor medida a ser tomada é o descarte e autoclavagem do material contaminado (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003). Contudo, no caso da necessidade de manutenção do material vegetal contaminado, torna-se indispensável efetuar o controle completo da contaminação (LIMA; MORAES, 2006).

Uma alternativa para a redução dos problemas de contaminação é a aplicação de tratamentos curativos (LEIFERT et al., 1989; DANTAS et al., 2000; NIEDS; BAUSHER, 2002). Estes tratamentos, em se tratando de contaminações bacterianas, consistem no controle normalmente feito por meio do uso de substâncias antibióticas que são incorporadas ao meio de cultura por períodos que variam de dias a meses ou usadas diretamente sobre os explantes contaminados (SALEHI; KHOSH-KHUI, 1997).

Várias experiências têm sido realizadas usando substâncias antimicrobianas complementar a atividade dos desinfetantes o que condiciona melhor eficiência durante a desinfestação do material (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003; DONATO et al., 2005, LIMA; MORAES, 2006). Os antibióticos podem ser utilizados no tratamento de dois modos, adicionando-os ao meio de cultura por um período limitado, o necessário para a eliminação dos contaminantes (KNEIFEL; LEONHARDT, 1992; LEIFERT et al., 1992) ou ainda na forma de imersão antes do isolamento (TANAKA et al., 1983; SCORTICHINI; CHIARIOTTI, 1988).

Porém, mesmo que se utilizem antibióticos de amplo espectro, o controle bacteriano na cultura de tecidos é problemático. Na maioria dos trabalhos *in vitro*, a porcentagem de descontaminação não é total, pois, os tecidos vegetais podem interferir no controle, por meio da destoxificação destas substâncias ou servindo como habitat para os contaminantes que se translocam por seus tecidos. Por isso, é comum que as concentrações de antibióticos devam ser elevadas quando estes são adicionados ao meio nutritivo juntamente com o explante. No entanto a fitotoxicidade dessas substâncias é o fator limitante para elevação dessas concentrações (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2003).

Trabalhando com diversas espécies *in vitro* e quatro antibióticos, Leifert et al. (1992) definiram a seguinte ordem decrescente de fitotoxicidade dos produtos: estreptomina, polimixina, rifampicina e carbenicilina. Os antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos, tais como estreptomina, neomicina, kanamicina, gentamicina, amikacina e tobromacina, são tóxicos aos vegetais, mesmo em baixas

concentrações (POLLOCK et al., 1983; OKKELS; PEDERSEN, 1988; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), já os antibióticos betalactamos (ampicilina e carbenicilina), cefalosporinas (cefotaxime, cefaloridina, cefalotina), piperaciclina e rifampicina são menos tóxicos aos vegetais (POLLOCK et al., 1983; OKKELS; PEDERSEN, 1988; POULSEN, 1988; LEIFERT et al., 1992; BIASI, 1995; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003.).

Scherwinski-Pereira et al. (2003) afirmam que uma das alternativas para se evitar o efeito tóxico dos antibióticos sobre os explantes é reduzir ao máximo o tempo de tratamento (contato) dos explantes com o agente antimicrobiano. No entanto, esta técnica pode afetar o efeito do antibiótico podendo ocorrer apenas uma ação bacteriostática, constituindo uma ação paliativa frente ao principal objetivo que é a eliminação por completo do organismo contaminante.

Além disso, o sucesso dos trabalhos de controle de microrganismos com uso de antibióticos depende ainda do isolamento, identificação e realização de testes de sensibilidade das bactérias. Por causa da fitotoxicidade e do alto custo do tratamento, os antibióticos devem ser utilizados apenas em contaminantes específicos das culturas, pois, somente as bactérias que estiverem dentro do espectro de ação de cada antibiótico serão controladas (LEIFERT et al., 1991; TENG; NICHOLSON, 1997; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003; SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2003).

2.4 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E SUA OCORRÊNCIA EM PLANTAS DE BANANEIRA

A descoberta da fixação biológica do nitrogênio remonta do século XIX, quando pesquisadores comprovaram que o processo de fixação do N_2 ocorria em nódulos de plantas (WEBER, 1998). No entanto, as pesquisas na área de fixação biológica de nitrogênio se intensificaram ainda mais a partir da década de 70, devido a importância da biologia do solo e da busca de alternativas para diminuir o consumo de fertilizantes nitrogenados. Além disso, no Brasil o fertilizante nitrogenado representa o maior custo entre os fertilizantes e os solos brasileiros em sua maioria são considerados de baixa fertilidade sendo ainda os fertilizantes nitrogenados um dos mais requeridos pelas plantas (DÖBEREINER, 1990; REIS et al., 2005).

A descoberta de novas espécies de bactérias associadas às gramíneas tanto na rizosfera como no interior das plantas. Na época, outros pesquisadores também relataram que microrganismos do solo eram responsáveis pela captação do nitrogênio do ar (KENNEDY; ISLAM, 2001). Sabe-se que leguminosas, gramíneas e várias outras plantas lenhosas estabelecem associação com bactérias capazes de reduzir a molécula do nitrogênio atmosférico (N_2) para a amônia (NH_3). Este grupo de bactérias é conhecido como fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas.

Bactérias Diazotróficas são microrganismos fixadores de nitrogênio de vida livre, associados tanto às plantas leguminosas quanto a não leguminosas (WEBER, 1998). Segundo Döbereiner e Pedrosa (1987), essas bactérias, desenvolveram mecanismos de proteção da nitrogenase contra o oxigênio livre, inativando estas enzimas, seja pela elevação das taxas respiratórias ou pelo crescimento em locais com baixa difusão deste gás e presença de proteínas protetoras associadas ao complexo enzimático, e podem em menor ou maior extensão contribuir para a nutrição das plantas (SUBERER, 1990).

Estudos com estes microrganismos têm sido intensificados desde o isolamento de *Beijerinckia fluminense* em 1958 por Döbereiner e Ruschel obtida da rizosfera de cana-de-açúcar e a re-identificação de *Azospirillum lipoferum* em 1975 por Döbereiner e Day, isolada de raízes de diversas gramíneas forrageiras e cereais (WEBER, 1998). A partir destes estudos, várias outras espécies de diazotróficas que colonizam a rizosfera e partes aéreas de plantas leguminosas foram identificadas (BALDANI et al., 1997).

Geralmente, as bactérias diazotróficas colonizam o córtex da raiz, penetram na endoderme e colonizam os vasos condutores, podendo ser translocadas para parte aérea da planta. Essas bactérias penetram em células vivas infestam e colonizam o apoplasto, xilema, parênquima de xilema lignificados, bem como células mortas e podem também colonizar o aerênquima como observado na cultura do arroz (JAMES et al., 1999).

Estudos sobre as espécies de bactérias diazotróficas endofíticas recentemente descritas avançaram muito nos últimos anos devido principalmente à importância atribuída à característica endofítica destas bactérias (DÖBEREINER, 1992). A capacidade destas bactérias em colonizar regiões, no interior dos tecidos da planta, protegidos dos altos níveis de oxigênio, permite especular sobre o potencial destes endofíticos em contribuir para o processo de fixação biológica de

nitrogênio mais eficientemente do que as bactérias que colonizam a superfície das raízes (BRASIL, 2001). Além disso, há evidências da eficiência da excreção do nitrogênio fixado pela bactéria, como demonstrado por Cojho et al. (1993) com *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

O gênero *Burkholderia* spp. foi classificado recentemente, incluindo estirpes pertencentes a *Pseudomonas* (*P. solanacearum* e *P. cepacia*). Muitos autores (BALOTA et al., 1999; BEVIVINO et al., 1994; MALIK et al., 1997) relatam à produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas em bactérias deste gênero. Segundo Bevivino et al. (1994), isolados de *Burkholderia cepacia* são capazes ainda, de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos em meio artificial.

Quanto à relação destes microrganismos com fruteiras é recente o conhecimento dessa associação (WEBER, 1998). Na década de 80, pesquisadores da Índia (RAO, 1983; GHAI; THOMAS, 1989) isolaram bactérias do gênero *Azospirillum* da rizosfera de bananeiras e outras fruteiras tropicais. Posteriormente, pesquisadores brasileiros (WEBER, 1998; WEBER et al., 1999; WEBER et al., 2001), identificaram várias espécies diazotróficas, como as do gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em bananeiras e abacaxizeiros.

Considerando que mudas de bananeiras respondem bem à inoculação com bactérias diazotróficas (WEBER et al., 2000), supõe-se que tal associação, além de afetar o crescimento, também possa influenciar na produção das frutas. Essa associação pode ser ainda mais benéfica durante a fase de aclimatização, que é considerada, para muitas espécies uma fase crítica da micropropagação, sendo um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos na propagação de plantas, devido à grande diferença entre as duas condições ambientais (READ; FELLMAN, 1985).

Apesar da contribuição de bactérias diazotróficas na cultura da banana ser ainda pouco conhecida, Weber (1998) constatou que isolados de bactérias pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, provenientes da própria cultura, proporcionavam melhor crescimento das mudas micropropagadas das cultivares Butuhan, Caipira e Prata Anã. Assim, pode-se inferir que a inoculação artificial de tais bactérias em mudas pode ser interessante do ponto de vista agrônomico, uma vez que na propagação *in vitro*, o processo de desinfestação, ocasiona a eliminação de microrganismos que posteriormente, poderiam beneficiar a cultura.

A alternativa de produção envolvendo a aplicação de agentes microbianos para prevenção e controle de doenças e pragas na agricultura tem sido destacada (SOUZA, 2001). Em mudas micropropagadas de bananeira poderiam ser aplicadas bactérias diazotróficas, no sentido de reduzir o uso de agrotóxicos e convergir para um sistema de produção integrada de frutas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se para o desenvolvimento deste trabalho, a estrutura do Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular – LABMOL da Embrapa Acre, em Rio Branco, AC, e dos Laboratórios de Gramíneas e Meio de Cultura da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ.

A coleta dos materiais propagativos de bananeira no campo e o estabelecimento das mudas micropropagadas no viveiro foram realizados na área experimental da Embrapa Acre (9°58'22"S, 67°48'40"W e 160 m de altitude), com precipitação anual entre 1.800 e 1.900 mm e temperatura média de 25 °C.

3.1 PRODUÇÃO DE MUDAS DE BANANEIRAS POR MICROPROPAGAÇÃO

3.1.1 Micropropagação de banana a partir de ápices caulinares

Para este experimento, utilizou-se como fonte de explantes, ápices caulinares das cultivares de bananeira Maravilha (FHIA 01 AAAB), Preciosa (PV42-85 AAAB), Pacovan Ken (PV42-68 AAAB) e Japira (PV42.142 AAAB), selecionadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura e recomendadas para plantios no Estado do Acre (SIVIERO et al., 2006). Os materiais propagativos foram coletados da coleção de trabalho de bananeira, localizada no Campo Experimental da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Após a coleta dos ápices caulinares em campo foram realizadas três desinfestações: a primeira em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por uma hora sendo em seguida realizada uma pré limpeza do material para eliminar o excesso do pseudocaule. Posteriormente fez-se nova desinfestação por 30 minutos ainda em NaOCl a 1% passando, então, para a câmara de fluxo laminar onde foi feita nova desinfestação com Hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) a 1% por 10 minutos. Após cada desinfestação, realizou-se o enxágüe dos explantes em água destilada e autoclavada por três vezes consecutivas.

Após trinta dias de cultivo, o material propagativo que não apresentou contaminação aparente foi induzido à multiplicação dividindo-se os ápices caulinares ao meio e transferindo-os para frascos de vidro de 250 mL de capacidade com 30 mL de meio de cultura, adicionado com diferentes concentrações de N^6 -

Benzilaminopurina (BAP) (0; 2; 4 e 6 mg.L⁻¹). Cada tratamento foi avaliado mensalmente quanto ao número de brotações formadas por explante, durante seis subcultivos sucessivos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x6, com quatro concentrações de BAP e seis subcultivos, num total de 24 tratamentos para cada cultivar analisada. No estabelecimento dos cultivos (subcultivo zero) foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo cada parcela formada por um ápice caulinar. Nos demais subcultivos, foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por cinco explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

3.1.2 Micropropagação de banana a partir de gemas florais

Para este experimento utilizou-se como fonte de explantes gemas florais das cultivares Preciosa e FHIA 02 coletadas na coleção de trabalho de bananeira, localizada no Campo Experimental da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

As inflorescências (coração) coletadas de cachos imaturos de banana tiveram inicialmente o tamanho reduzido e foram desinfestadas com NaOCl a 1% por 20 minutos, realizando-se após desinfestação a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada. Em seguida, os ápices florais foram reduzidos a aproximadamente 1 cm³ e estabelecido *in vitro* conforme descrito no item 3.1.3.

Após 30 dias de estabelecimento o material propagativo que não apresentou contaminação aparente, foi transferido para frascos de vidro de 250 mL de capacidade contendo 30 mL de meio MS adicionado de 4 mg.L⁻¹ de BAP para multiplicação.

Durante o cultivo, as inflorescências foram identificadas como clones e numeradas individualmente, sendo o material multiplicado até o sétimo subcultivo. Em cada subcultivo, determinou-se o número de brotações formadas por clone, bem como a percentagem de perdas dos explantes por contaminação.

No estabelecimento dos cultivos (subcultivo zero) foram utilizadas quinze repetições por tratamento, sendo cada parcela formada por um ápice floral. Nos demais subcultivos, os clones foram multiplicados e mantiveram a identificação do clone de origem, sendo mantidos cinco explantes por frasco.

Para ambos os experimentos de micropropagação, a estimativa do número de mudas produzidas foi obtida a partir da determinação da taxa média de brotações (TM) obtida ao final dos subcultivos, em razão do número de subcultivos (ns) realizados, como segue:

$$\text{Número de mudas produzidas por explante} = \text{TM}^{\text{ns}}$$

3.1.3 Condições do cultivo *in vitro*

O meio de cultura básico utilizado nos experimentos foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol e solidificado com 6 g.L⁻¹ de Ágar. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do Ágar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos a 121 °C e 1,3 atm de pressão. O estabelecimento dos cultivos (ápices caulinares e florais) foi realizado em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio de MS e a multiplicação das brotações foi realizada em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio, sendo ambos os recipientes selados com filme plástico transparente.

Durante as etapas de estabelecimento, multiplicação e enraizamento, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares brancas frias.

3.1.4 Enraizamento e aclimatização das mudas produzidas *in vitro*

O enraizamento das brotações formadas *in vitro* foi realizado em meio de cultura de MS desprovido de regulador de crescimento por um período de 30 dias.

Após este período, as mudas enraizadas foram então retiradas do meio e lavadas em água corrente para eliminar o excesso do meio de cultura. Em seguida, as mudas foram transferidas para viveiro e acondicionadas em tubetes plásticos de 180 cm³, suspensos cerca de 0,5 m do solo do viveiro, contendo substrato composto por esterco bovino, terra de mato e casca de arroz carbonizada na proporção de 3:1:1 (v/v) (OLIVEIRA et al., 2008), sendo mantidas em telados cobertos com sombrite, com redução da radiação solar em 50%.

A irrigação das plantas foi feita por meio de aspersores, distantes a

aproximadamente 1,2 m de altura, de onde foram acondicionados os tubetes, com vazão nominal de 60 L/H/m², sendo controlados por um temporizador digital (*Timer*). Durante as duas primeiras semanas, as mudas foram submetidas a períodos de irrigação a cada três horas, por 15 minutos. Após a primeira semana, o período passou a ser a cada 8 horas, também por 15 minutos. A sobrevivência das mudas foi avaliada após 30 dias e durante este período, não se realizaram tratamentos fitossanitários.

3.2 ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO DE MUDAS DE BANANEIRAS MICROPROPAGADAS NAS CONDIÇÕES DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL: EFEITO DE TIPOS DE SUBSTRATOS E RECIPIENTES

Para avaliar a aclimatização de mudas de bananeiras micropropagadas, utilizaram-se brotações de bananeiras da cultivar Grande Naine (AAA), procedentes do sexto subcultivo e obtidas da multiplicação *in vitro* de ápices caulinares. O meio de cultura utilizado para a multiplicação das brotações foi o MS, acrescido de 4 mg.L⁻¹ de BAP e solidificado com 5 g.L⁻¹ de Ágar, sendo os subcultivos realizados a cada 30 dias. Para o enraizamento *in vitro*, as brotações foram mantidas por 30 dias em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, preenchidos com 40 mL de meio de MS desprovido de reguladores de crescimento, nas mesmas condições ambientais de laboratório descritas no item 3.1.3.

Decorrida a fase de enraizamento, as plantas foram retiradas dos frascos, individualizadas, lavadas em água corrente para remover o excesso do meio de cultura aderido às raízes, sendo imediatamente transferidas para os tubetes preenchidos com diferentes tipos de substratos.

Os tratamentos consistiram da combinação de dois tipos de tubetes (115 cm³ e 180 cm³ de capacidade) e seis composições de substratos homogeneizados manualmente, sem a adição de fertilizantes, como segue: S1 – terra de encosta; S2 – terra de encosta + esterco bovino (3:1 v/v); S3 – terra de encosta + casca de arroz carbonizada (3:1 v/v); S4 – terra de encosta + esterco bovino + casca de arroz carbonizada (3:1:1 v/v); S5 – terra de encosta + esterco bovino + casca de arroz carbonizada (3:1:2 v/v), e S6 – terra de encosta + esterco bovino + casca de arroz carbonizada (3:1:3 v/v).

Antes da transferência dos substratos para os tubetes, os mesmos foram

desinfestados com formol (ácido fórmico) a 2,5% e vedados com auxílio de um filme de polietileno preto (100 μm), por cinco dias consecutivos. Em seguida, retiraram-se amostras dos substratos para análise.

O plantio das mudas foi feito em telado, coberto com filme de polietileno transparente (150 μm) e sombrite (50% de interceptação luminosa), onde permaneceram por um período de 75 dias nas mesmas condições de irrigação descrita no item 3.1.4.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, no esquema de parcelas subdivididas, utilizando-se nas parcelas os dois tipos de tubetes (115 cm^3 e 180 cm^3 de capacidade) e, nas subparcelas, os seis tipos de substratos, com quatro repetições e nove plantas por parcela.

Quinzenalmente, avaliaram-se a percentagem de sobrevivência, a altura da parte aérea e o diâmetro do pseudocaule. A determinação da sobrevivência das plantas foi realizada por contagem do número de plantas mortas após o tempo de aclimatização considerado. A determinação da altura da parte aérea foi feita por meio de medição da região compreendida entre o colo e a inserção da última folha das plantas. Os valores referentes ao diâmetro foram obtidos por medição do pseudocaule a 1 cm do substrato, com auxílio de um paquímetro. Ao final de 75 dias de avaliação, a determinação das massas fresca e seca da parte aérea e de raízes também foi realizada, coletando-se, ao acaso, três plantas por parcela de cada tratamento, logo após a última avaliação do experimento.

Destas plantas, separaram-se as raízes e a parte aérea, sendo o material secado em estufa à temperatura de 65 °C até peso constante.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco-seno $x/100^{0,5}$.

3.3 DIAGNOSE E CONTROLE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS CONTAMINANTES EM EXPLANTES DE BANANEIRAS

3.3.1 Isolamento e purificação de bactérias endofíticas contaminantes de banana durante o cultivo *in vitro*

Para este trabalho, utilizaram-se materiais propagativos de bananeira das

cultivares Maravilha, Thap Maeo e Preciosa previamente estabelecidos em meio de cultura de MS e que apresentavam contaminação bacteriana visível durante a etapa de multiplicação em meio de cultura de MS.

Após 30 dias de estabelecimento, o material contaminado foi selecionado e os contaminantes foram então transferidos individualmente para meio Ágar nutriente (AN) (peptona, 5 g.L⁻¹; extrato de carne 3 g.L⁻¹; glucose, 5 g.L⁻¹; Ágar, 15 g.L⁻¹; pH 7,0 ± 0,2) em placas de petri de 90 x 150 mm com 20 mL de meio, visando a purificação, com base nas características fenotípicas das bactérias, especialmente pigmentação, textura, superfície e borda. Uma vez inoculadas em meio AN, o material bacteriano foi incubado a 28 ± 1 °C por 5 dias até se visualizar o completo crescimento das colônias. Em seguida, estas foram então repicadas para novos meios AN até a purificação, utilizando o método de esgotamento por estrias.

Uma vez isolados e purificados, parte do inóculo foi colocado em tubos de ensaio de 15 x 150 mm contendo 5 mL de meio AN em bisel e armazenado em geladeira a 4 °C para conservação do material.

3.3.2 Identificação de bactérias endofíticas contaminantes de banana durante o cultivo *in vitro*.

As amostras dos microrganismos foram enviadas à Fundação André Tosello, Campinas, SP, onde foram identificadas em nível de família, gênero e espécie por meio de testes morfológicos e bioquímicos.

Os testes morfológicos incluíram observações quanto a forma, pigmentação, superfície e textura dos isolados bacterianos.

Os testes bioquímicos aplicados aos isolados bacterianos visando sua identificação incluíram: coloração de Gram; reação de catalase; nitrato; uréase; citrato; desaminação da lisina; hidrólise da ONPG, da esculina, da argina e do metabolismo de glicose oxidativo; oxidase; formação de ácidos utilizando: sacarose, inositol, glicose, L-arabinose, manitol, sorbitol, rafinose, lactose, maltose, xilose, raminose, malonato e adonitol; desaminação da ornitina e da lisina; descarboxilação da arginina e da ornitina; mudança de pH a partir de acetamina; produção de indol e de H₂S; crescimento na presença de Polymixina B; assimilação de ácidos como fonte de carbono: L-prolina, L-alanina, L-histidina, DI-lactato; assimilação de ácidos graxos como fonte de carbono: acético de sódio, glucônico, propiônico, heptanóico;

assimilação de açúcares como fonte de carbono: D-manitol, trealose, maltotriose, N-acetil-glicosamina, Myo-inositol, maltose, D-manose, D-galactose, sacarose, glicose, arabinose, D-xilose; assimilação de ácido aminoácido como fonte de carbono: L-ácido-aspártico; assimilação de ácido: β -hidróxido-butírico; assimilação de ácido carboxílico como fonte de carbono: azelaico, sebáico, subérico, adipico, cítrico, poritaconico; Triplo-Ágar-Açúcar-Ferro (TSI), aerobiose (utilização do oxigênio) e endosporos.

3.3.3 Testes de sensibilidade dos isolados bacterianos a antibióticos

A suscetibilidade das bactérias isoladas de explantes de bananeiras micropropagadas foi testada através da prova de sensibilidade por difusão, por meio de discos de papel impregnados com os tipos de antibióticos. Para a realização deste teste, com o auxílio da alça de platina, retirou-se uma porção de cada cultura pura das bactérias crescidas, transferindo-a, individualmente, para Erlenmeyers contendo 50 mL de meio caldo nutritivo (CN) (5 g.L⁻¹ de peptona, 3 g.L⁻¹ de extrato de carne, 5 g.L⁻¹ de glucose, pH 7,0 \pm 0,2, sem adição do solidificante Ágar). A incubação foi por 24 horas em shaker orbital ajustado para 100 rpm.

Em seguida, espalhou-se uma alíquota de 100 μ L do agente microbiano em estudo sobre a superfície do meio AN contido em placas de Petri de 90 x 150 mm distribuindo-se, em seguida, os discos de papel impregnados com os antibióticos. No total, 20 antibióticos foram avaliados, como segue: Cefalexina (30 μ g.mL⁻¹), Cloranfenicol (30 μ g.mL⁻¹), Estreptomicina (10 μ g.mL⁻¹), Amicacina (30 μ g.mL⁻¹), Ampicilina (10 μ g.mL⁻¹), Penicilina (10 μ g.mL⁻¹), Rifampicina (5 μ g.mL⁻¹), Sulfonamida (300 μ g.mL⁻¹), Cefaclor (30 μ g.mL⁻¹), Cefotaxima (30 μ g.mL⁻¹), Cefoxitina (30 μ g.mL⁻¹), Ácido Nalidíxico (30 μ g.mL⁻¹), Oxacilina (1 μ g.mL⁻¹), Cefalotina (30 μ g.mL⁻¹), Vancomicina (30 μ g.mL⁻¹), Tetraciclina (30 μ g.mL⁻¹), Amoxicilina (10 μ g.mL⁻¹), Gentamicina (10 μ g.mL⁻¹), Eritromicina (15 μ g.mL⁻¹), Novobiocina (5 μ g.mL⁻¹).

A distribuição dos discos sobre o meio de cultura foi feita de forma asséptica, sendo as placas incubadas a 28 °C na ausência de luz, conforme metodologia descrita por (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003).

A sensibilidade do isolado bacteriano ao antibiótico teste foi avaliado após 48 horas de incubação, onde se determinou o halo de inibição formado, considerando

suscetíveis ao antibiótico os isolados que apresentaram formação de halo de inibição mínimo de 8 mm, conforme metodologia descrita por Wilson e Power (1989).

Cada tratamento foi composto por duas placas de petri, sendo cada uma considerada como uma repetição. Em cada placa foram colocados três discos de cada antibiótico, considerados como unidades experimentais, em delineamento inteiramente casualizado.

3.3.4 Determinação da concentração bactericida mínima inibitória (CBMI)

Para realização de testes a fim de determinar a concentração bactericida mínima inibitória, utilizaram-se microrganismos previamente isolados dos explantes de bananeira.

Os isolados foram repicados para novo meio AN e incubados a 28 °C por um período de 18 a 24 horas. Do material crescido, com o auxílio da alça de platina retirou-se uma pequena alíquota de cada bactéria em estudo, a qual foi transferida individualmente para Erlenmeyers de 125 mL de capacidade contendo 50 mL de solução salina (sais de MS a 100%) e permaneceram sob agitação à 100 rpm por 24 horas em temperatura de 30 °C. Após as 24 horas, retirou-se 1 mL da suspensão bacteriana e esta foi transferida para tubos de ensaio medindo 25 x 150 mm contendo 9 mL de solução salina (sais de MS a 100%) para a realização de diluições seriadas até se obter uma suspensão de 10^{-5} números mais provável de células.

Posteriormente, onze tubos de ensaio com solução salina foram preparados em duplicata e esterilizados em autoclave a 121 °C e 1,5 atm de pressão por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram adicionados à solução, os seis antibióticos (Cefaclor, Vancomicina, Ácido Nalidixico, Cefalotina, Cloranfenicol, Cefalexina), previamente selecionados no teste de sensibilidade por difusão de discos (item 3.3.3).

Os antibióticos foram esterilizados à frio por meio de filtração (Millipore® 0,22 µm) e adicionados, individualmente, aos tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de modo a se obter uma diluição seriada de 1/2 a 1/1.024, correspondendo as concentrações que variaram de 2 a 1.024 mg.L⁻¹ do antibiótico testado. Em cada tratamento, adicionou-se uma alíquota de 100 µL de uma suspensão bacteriana (10^{-5}), utilizando, como testemunhas, tubos de ensaios contendo apenas solução salina, sem adição de antibióticos.

Posteriormente, os tubos foram mantidos a 28 °C no escuro e sob agitação (100 rpm). A avaliação da turvação do meio foi feita por até 96 horas de incubação. Para confirmação dos resultados, uma alíquota de 100 µL das diluições não turvadas dos agentes testes foram plaqueadas em meio AN, em placa de petri medindo 90 x 150 mm contendo 20 mL de meio, seguindo a metodologia desenvolvida por Scherwinski-Pereira et al. (2003). Este procedimento foi realizado em triplicata, avaliando-se o crescimento de colônias por até 72 horas de incubação. Para todos os testes o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado.

3.3.5 Avaliação de antibióticos para uso no cultivo *in vitro* de bananeiras: efeito da fitotoxicidade sobre os cultivos

Para execução deste experimento, explantes de bananeira da cultivar Preciosa, obtidos da fase de multiplicação *in vitro*, medindo aproximadamente 1,5 cm, foram cultivados em frascos de 250 mL de capacidade contendo 30 mL de meio de cultura de MS de consistência semi-sólida, acrescido de 4 mg.L⁻¹ BAP. A este meio de cultura adicionou-se, individualmente, os antibióticos de melhor resposta no controle bacteriano: Ácido Nalidíxico, Cefaclor e Vancomicina nas concentrações de 512 e 1.024 mg.L⁻¹.

Antes da adição no meio de cultura, os antibióticos foram esterilizados a frio utilizando-se filtros de 0,22 µm (Millipore®), sendo em seguida, acrescentados ao meio de cultura quando este estava em processo de resfriamento (40 a 50 °C). Os antibióticos testados foram àqueles previamente selecionados em razão da maior seletividade apresentada para as estirpes bacterianas isoladas e identificadas como endofíticas contaminantes da cultura da banana (item 3.5.1) pertencente às famílias Vibrionaceae e Enterobacteriaceae e aos gêneros *Aeromonas* e *Klebsiella* respectivamente.

Posteriormente, após a adição dos antibióticos ao meio de cultura, os explantes foram então inoculados e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e fluxo de radiação de 30 µmol.m⁻².s⁻¹. Após 30 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência dos explantes, a altura de brotações e a taxa de multiplicação do material vegetal.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x3 sendo três tipos

de antibióticos e três concentrações (0, 512 e 1.024 mg.L⁻¹), num total de 9 tratamentos com 4 explantes por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variação e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM GENÓTIPOS DE BANANEIRAS

3.4.1 Contagem e Isolamento

Em razão da ocorrência de uma espécie diazotrófica nas amostras contaminantes, durante a etapa de micropropagação, amostras de solo e de raízes de 30 cultivares de bananeira, provenientes da coleção de trabalho de bananeira da Embrapa Acre, Rio Branco, AC, foram avaliadas quanto à presença de isolados fixadores de nitrogênio atmosférico.

As cultivares avaliadas quanto à presença de bactérias diazotróficas foram: Pacovan Ken, Prata Local, Nanicão, Zulú, Ambrosia, Maravilha, Caipira, Grande Naine, SH36-40, Terrinha, Preciosa, Terra Maranhão, FHIA 02, Branca Roxa, Thap Maeo, D'Angila, FC06-02, Red Yad, Terra, PA42-44, Japira, Inajá, Pelipita, Maçã, FHIA 21, Burccaner, ST12-31, Calypso, Pacovan, Prata Anã.

Para amostragem, plantas de bananeiras foram selecionadas ao acaso e, destas, amostras de aproximadamente 100 g de solo rizosférico, juntamente com raízes, foram envoltos em sacos de papel e acondicionadas em caixa de isopor para o transporte.

Já em laboratório, as raízes foram inicialmente lavadas em água corrente e, de cada genótipo, 1 g de material fresco e de solo foi utilizado. Para o cultivo, as raízes foram trituradas manualmente em um gral e diluídas em solução salina até 10⁻⁵ (9 mL de solução autoclavada formulada com 1/4 da concentração de sais do meio NFb) (Anexo A), como descrito por Döbereiner et al. (1995). Esta mesma diluição foi feita para as amostras de solo.

Uma vez maceradas as raízes e feita as diluições de ambas as amostras (solo e raiz), uma alíquota de 0,1 mL dos extratos diluídos foram inoculados em frascos tipo penicilina medindo 520 x 248 mm contendo 3 mL dos meios semi-sólidos LGI (MAGALHÃES et al., 1983) e JNFb (DÖBEREINER et al., 1995) (Anexo A).

Foram feitas três repetições para cada diluição e os frascos inoculados permaneceram entre 5 e 7 dias em estufa à 30 °C para avaliação da formação de película sub-superficial, característica de crescimento de bactérias diazotróficas microaerófilas.

Conforme a metodologia tradicional descrita para isolamento de bactérias diazotróficas, recomenda-se repicar duas vezes consecutivas as bactérias crescidas nos frascos contendo meios semi-sólidos com o qual foram inicialmente isoladas, assim, as culturas dos frascos que apresentaram formação de película na maior diluição de cada tratamento foram repicadas para novos meios semi-sólidos e os que apresentavam formação de película foram então transferidos para placas de petri medindo 90 x 150 mm contendo 20 mL de meios sólidos de igual formulação, acrescidos de 20 mg.L⁻¹ de extrato de levedura. As bactérias que formaram colônias isoladas foram novamente repicadas para meios semi-sólidos semi-específicos, a fim de verificar e selecionar aquelas que continuaram a formar película (pressão de seleção).

Os isolados que continuaram a apresentar formação de película em meio semi-sólido foram então transferidos para meio sólido Dyg's (Anexo A) (RODRIGUES NETO et al., 1986) (meio enriquecido e que permite rápido crescimento microbiano) para facilitar a visualização de possíveis contaminantes. Este procedimento foi repetido até a obtenção de colônias puras, seguindo-se a metodologia de Döbereiner et al. (1995). Uma vez purificadas, todas as colônias morfológicamente diferentes foram individualizadas e transferidas para meios semi-sólidos LGI e JNFb para a verificação da formação de nova película.

As bactérias que apresentaram crescimento característico nas diferentes repicagens de seleção, foram então crescidas novamente em meio Dyg's, estocadas em glicerol à 5% e acondicionadas em geladeira para posterior continuidade dos testes de identificação das espécies associadas à bananeira.

3.4.1 Caracterização morfo-fisiológica dos isolados

Os isolados obtidos foram avaliados quanto aos aspectos morfológicos e fisiológicos e comparados com estirpes diazotróficas de referência: *Burkholderia brasilense* (M 130), *Herbaspirillum seropedicae* (HCR 54), *Glucona acetobacter* (PRJ

55), *Azospirillum amazonense* (CBAmC) e *Azospirillum brasilense* (SP7), todas pertencentes a Embrapa Agrobiologia.

3.4.1.1 Aspectos morfológicos das culturas

Os isolados de bananeira e as estirpes de referência foram individualmente distribuídos em placas de petri (15 x 60 mm), contendo 20 mL dos seguintes meios de cultura: NFB_{3x} (meio com a mesma formulação do NFB, no entanto, com o triplo da quantidade do corante Azul de Brometamol utilizada), JMV (BALDANI, 1996), Batata (BALDANI; DÖBEREINER, 1980) e LGI (MAGALHÃES et al., 1983) (Anexo A). Uma vez crescidas, as colônias foram então avaliadas morfológicamente visando agrupar os isolados dentro do mesmo gênero e da mesma espécie. Os parâmetros de avaliação foram: cor, elevação, textura, borda, forma, superfície, tamanho, além de detalhes característicos das colônias, como brilho, opacidade, translucidez, pigmentação diferente da cor dominante, absorção do corante presente no meio e consumo do meio (Anexo B).

Com os dados morfológicos obtidos foi possível agrupar os isolados, por meio da construção de um dendograma de similaridade pelo método Unweighted Pair Group Analyses (UPGMA), utilizando, para tanto, o programa NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), versão 2.1 (ROHLF, 2000), índice Simple Matching (SM).

3.4.1.2 Aspectos fisiológicos das culturas

3.4.1.2.1 Produção de Ácido Indolacético (AIA)

Para a determinação da produção de ácido indolacético (AIA), as culturas foram transferidas para meio Batata sólido (Anexo A). Após aproximadamente 2 dias de crescimento a 30 °C, os isolados foram inoculadas individualmente em um tubo de ensaio de 20 x 200 mm de capacidade, contendo 5 mL de meio líquido Dyg's com pH = 6,0.

Neste meio de cultura, as células bacterianas permaneceram sob agitação a 60 rpm e temperatura de 30 °C por 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 20 µL do inóculo foi adicionada a novos tubos de ensaio de igual capacidade e quantidade de

meio Dyg's, com o pH ajustado com NaOH para não inibir a ação do Triptofano precursor da auxina. Posteriormente, fez a adição de 30 μ L de Triptofano esterilizado a frio por meio de filtração (Milipore® de 0,22 μ m). Foram mantidas três repetições por isolado, as quais foram incubadas a 30 °C na ausência de luminosidade e sob agitação (60 rpm) por 72 horas.

Após o crescimento das bactérias, com o auxílio de um espectrofotômetro, a densidade ótica (DO) foi ajustada para aproximadamente 1 nm, e uma alíquota de 1 mL de cada repetição da cultura foi centrifugada à 10.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, retirou-se 150 μ L do sobrenadante aplicando-o em placas de polietileno com capacidade 300 μ L. Sobre o pellet, aplicou-se então 100 μ L do reagente de Salkowski (solução de 1 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 50 mL de HClO_4 à 35%), responsável pela formação de uma coloração rosácea ao reagir com a auxina produzida pelo isolado.

Após a adição do reagente, a placa foi mantida na obscuridade por 45 minutos para efetivação da reação de coloração e leitura em espectrofotômetro com filtro de 540 nm.

Como a detecção de AIA foi feita utilizando-se uma medida colorimétrica, fez-se necessário a construção de uma curva de calibração com AIA sintético. Para tal, preparou-se uma solução de AIA sintético em água destilada, nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 e 200 mM, adicionou-se aos poucos algumas gotas de KOH até a completa diluição do produto. Posteriormente, construiu-se uma curva de calibração de AIA repetindo a metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995), conforme descrito anteriormente.

A equação obtida pela curva de regressão linear ($R^2 = 0,9917$) formada através dos dados de absorbância gerados por espectrofotômetro (540 nm) foi utilizada para quantificação de auxinas produzidas pelos isolados.

3.4.1.2.2 Redução de acetileno (ARA)

Para a realização do teste de redução de acetileno, as culturas puras foram inoculadas em frascos tipo penicilina de 520 x 248 mm, vedados com tampas de borracha, contendo 3 mL de meio semi-sólido, de onde foram isolados inicialmente (LGI e JNFb). As células foram inoculadas de modo a se obter três repetições por isolado bacteriano. A incubação foi realizada a 30 °C até a formação de película

(aproximadamente sete dias), tempo considerado necessário para que os isolados atinjam o pico de atividade.

Após este período, com o auxílio de uma seringa, extraiu-se 1 mL de ar do interior dos vidros, injetando-se a mesma quantidade de gás (acetileno) nos frascos, os quais foram mantidos em estufa a 30 °C por 60 minutos até a leitura em cromatógrafo.

Passados os 60 minutos, tempo suficiente para ocorrer a ação dos microrganismos para fixação do acetileno, uma alíquota de 1 mL do gás inoculado nos frascos foi retirado com o auxílio de seringas descartáveis e injetado em cromatógrafo para leitura. No total, de cada isolado bacteriano foram realizadas duas leituras, cujos dados foram usados para o posterior cálculo da concentração do gás acetileno.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE MUDAS DE BANANEIRAS POR MICROPROPAGAÇÃO

4.1.1 Micropropagação de banana a partir de ápices caulinares

De maneira geral, as melhores taxas de multiplicação observadas quando se usou os ápices caulinares como material propagativo foram de 2,3 brotos por explante para a cv. Preciosa, 2,1 brotos por explante para cv. Maravilha e 2,7 brotos por explante para as cultivares Pacovan Ken e Japira na concentração de 4 mg.L⁻¹ de BAP (Tabela 1). Este resultado foi semelhante ao obtido por Costa et al. (2006) em experimento utilizando a cv. Grande Naine.

A partir das taxas médias encontradas na concentração de 4 mg.L⁻¹ BAP pode-se estimar o número potencial teórico de brotos e, conseqüentemente, de mudas a serem produzidas em razão do tempo, por meio da taxa de multiplicação estimada (TMe). Assim, tomando-se por base a média do número de brotações acumuladas em cada subcultivo das cultivares Preciosa, Japira, Maravilha e Pacovan Ken, ao final de seis subcultivos sucessivos, seriam formadas 237; 539,1; 137,8 e 548,8 mudas por explante, respectivamente (Tabela 1), excluindo-se as perdas ocasionadas por contaminações durante o processo.

Na média, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de 4 e 6 mg.L⁻¹ de BAP para as cultivares Preciosa e Maravilha. Para a cultivar Maravilha também não se observaram diferenças estatística entre as concentrações de 2, 4 e 6 mg.L⁻¹ de BAP as quais apresentaram médias semelhantes entre si em torno de 2,1 brotos por explante, sendo este, o genótipo que apresentou as menores médias para taxa de multiplicação. Este fato comprova os resultados obtidos por Banerjee e De Langhe (1985), Vuylsteke e De Langhe (1985) e Wong (1986), de que a taxa de multiplicação apresenta uma grande variação em função do genótipo e ainda Oliveira et al. (2001), que afirmam que a taxa de multiplicação e o desenvolvimento *in vitro* de plantas dependem da escolha da melhor concentração de BAP.

A cultivar Maravilha, apesar de ter apresentado um total de 35,8% de perdas por contaminação bacteriana (Tabela 3) e 1,5% de perdas dos explantes por contaminação fúngica no início dos subcultivos, alcançou um somatório total de

2.185,6 brotações ao final do sexto subcultivo, partindo-se de 15 explantes iniciais por tratamento.

As cultivares Japira e Pacovan Ken acumularam um total de 3.935,3 e 3.143,4 plantas, respectivamente, com perdas por contaminação bacteriana na fase de estabelecimento de até 39,3% para cultivar Japira e 19,5% para cultivar Pacovan Ken (Tabela 2). De modo geral, melhorias na taxa de multiplicação foram observadas após o terceiro subcultivo, o que está de acordo com os resultados obtidos por Oliveira e Silva (1997).

Os dados referentes as perdas ocasionadas por contaminação fúngica e/ou bacteriana ao longo de seis subcultivos podem ser observados na Tabela 2. Verificou-se que as perdas por contaminação bacteriana foram reduzindo significativamente ao longo dos subcultivos, sendo maior durante a fase de estabelecimento para todas as cultivares analisadas. De acordo com Scherwinski-Pereira et al. (2003), apesar das contaminações fúngicas também ocasionarem importantes perdas de material, as contaminações bacterianas são as mais sérias, principalmente devido sua difícil detecção, podendo ser transferidas de um material para outro durante os sucessivos subcultivos.

Diferentemente da contaminação bacteriana, a contaminação fúngica foi verificada ao longo dos seis subcultivos, o que pode ter sido devido ao manuseio ou condições deficientes de assepsia. Neste trabalho, as cultivares que apresentaram os maiores índices de perdas de material devido a proliferação de fungos foram Pacovan Ken e Japira no quarto e quinto subcultivos, respectivamente.

TABELA 1 Taxa de multiplicação e estimativa de produção das cultivares de bananeira Preciosa, Maravilha, Japira e Pacovan Ken, a partir de gemas apicais durante o cultivo *in vitro* após seis subcultivos em meio de cultura com diferentes concentrações de BAP

| Subc.* | CONCENTRAÇÕES DE BAP mg.L ⁻¹ | | | | | | | |
|-----------|---|--------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|--------|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 0 | 2 | 4 | 6 |
| |Preciosa..... | | | |Japira..... | | | |
| 0** | 1,0 cA | 1,0 cA | 1,0 dA | 1,0 cA | 1,0 aA | 1,0 cA | 1,0 dA | 1,0 dA |
| 1 | 2,0 aA | 2,0 bA | 2,0 cA | 2,0 bA | 2,0 aA | 2,0 bA | 2,0 cA | 2,0 cA |
| 2 | 1,1 cB | 1,3 cB | 1,8 cA | 2,0 bA | 1,0 aB | 1,5 cB | 1,3 dB | 2,2 cA |
| 3 | 1,5 bC | 2,6 aB | 3,8 aA | 2,7 aB | 1,7 aC | 2,5 bB | 3,0 bA | 3,7 aA |
| 4 | 1,1 cB | 1,9 bA | 2,1 cA | 2,2 bA | 1,3 aC | 4,0 aB | 4,8 aA | 3,5 aB |
| 5 | 1,5 bC | 2,5 aB | 3,3 aA | 2,6 aB | 1,5 aC | 2,4 bB | 3,6 bA | 2,8 bA |
| 6 | 1,5 bC | 2,2 aB | 2,5 bB | 2,9 aA | 1,3 aC | 2,6 bB | 4,0 bA | 2,3 cB |
| Média BAP | 1,4 C | 1,9 B | 2,3 A | 2,2 A | 1,4 C | 2,3 B | 2,7 A | 2,5 B |
| TMe*** | 8,2 | 70,6 | 237,0 | 179,1 | 8,6 | 187,2 | 539,1 | 366,9 |
| |Maravilha..... | | | |Pacovan Ken..... | | | |
| 0** | 1,0 bA | 1,0 cA | 1,0 cA | 1,0 dA | 1,0 aA | 1,0 bA | 1,0 dA | 1,0 cA |
| 1 | 2,0 aA | 2,0 aA | 2,0 bA | 2,0 bA | 2,0 aA | 2,0 aA | 2,0 cA | 2,0 bA |
| 2 | 1,0 bA | 1,3 cA | 1,4 cA | 1,4 cA | 1,3 aA | 1,4 bA | 1,8 cA | 1,1 cA |
| 3 | 1,2 bB | 2,8 aA | 2,8 aA | 2,7 aA | 1,1 aD | 2,7 aC | 4,4 bA | 3,6 aB |
| 4 | 1,0 bC | 1,7 bB | 2,6 aA | 1,7 cB | 1,7 aB | 2,8 aA | 3,5 aA | 3,1 aA |
| 5 | 1,5 aB | 2,3 aA | 2,6 aA | 2,5 bA | 1,2 aB | 2,4 aA | 3,0 bA | 2,7 aA |
| 6 | 1,3 bB | 2,4 aA | 2,6 aA | 3,0 aA | 1,5 aB | 2,3 aB | 3,3 bA | 3,0 aA |
| Média BAP | 1,3 B | 2,0 A | 2,1 A | 2,0 A | 1,4 D | 2,1 C | 2,7 A | 2,3 B |
| TMe*** | 4,7 | 68,3 | 137,8 | 96,4 | 8,7 | 116,8 | 548,8 | 198,9 |

Médias acompanhadas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. *Subcultivos; **Fase de estabelecimento; ***Taxa de multiplicação estimada.

TABELA 2 Avaliação das perdas por contaminação fúngica e bacteriana ao longo de seis subcultivos *in vitro* das cultivares de bananeira Preciosa, Maravilha, Japira e Pacovan Ken independente das concentrações de BAP utilizadas no meio de cultura

| Subc.* | TAXA DE CONTAMINAÇÃO (%) | | | | | | | |
|--------|--------------------------|-----------|--------|----------|----------------------|-----------|--------|----------|
| |Fúngica..... | | | |Bacteriana..... | | | |
| | Preciosa | Maravilha | Japira | P. Ken** | Preciosa | Maravilha | Japira | P. Ken** |
| 0 | 0,0 | 1,5 | 0,0 | 0,0 | 22,4 | 35,8 | 39,3 | 19,5 |
| 1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 18,0 | 19,0 | 14,3 | 22,7 |
| 2 | 4,4 | 5,9 | 0,0 | 0,0 | 22,0 | 14,7 | 0,0 | 0,0 |
| 3 | 3,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 7,1 | 8,0 | 8,5 | 3,6 | 0,0 |
| 5 | 0,6 | 1,6 | 7,1 | 0,0 | 8,4 | 19,6 | 0,0 | 0,0 |
| 6 | 0,9 | 1,7 | 0,0 | 0,0 | 1,9 | 3,7 | 0,0 | 3,6 |

*Subcultivos; **Pacovan Ken.

Durante o plantio no viveiro das plantas produzidas em laboratório, verificou-se uma taxa de sobrevivência de 96% das mudas (Figura 1D), as quais apresentaram uma altura média de 17,1 cm aos 30 dias após o plantio. As perdas observadas durante esta fase foram de apenas 4% das plantas, resultado inferior ao obtido por Oliveira et al., (2001) trabalhando com a cultivar FHIA 01 onde as perdas das mudas foram de aproximadamente 6% nesta fase.

Neste trabalho, durante a aclimatização, as mudas apresentaram aspecto vigoroso e, visualmente, não foram observadas variantes somaclonais, o que indica que as condições propostas para a produção de mudas de bananeira das cultivares Preciosa, Maravilha, Pacovan Ken e Japira foram ideais para propagação destas cultivares.

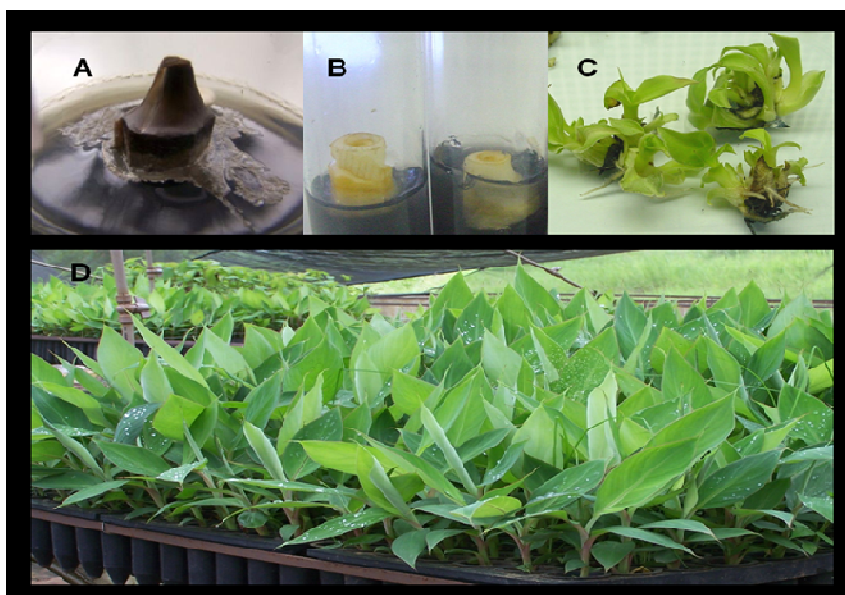


FIGURA 1 A - Aspecto de explante contaminado por bactéria em fase inicial de cultivo; B - Aspecto de explante sadio em fase inicial de cultivo; C - Explantes em fase de multiplicação; D - Aspecto das mudas após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação.

4.1.2 Micropropagação de banana a partir de gemas florais

As perdas por contaminação durante a fase de estabelecimento *in vitro* das gemas florais alcançaram 53,3% para ambas as cultivares testadas, Preciosa e FHIA 02. Muito embora este valor represente uma porcentagem expressiva dos explantes

inoculados, é ainda, inferior ao obtido por Soares et al. (2002), onde as contaminações bacterianas atingiram 70% do material estabelecido. Santana (1999), trabalhando com explantes provenientes de inflorescências da cv. Pacovan, observou que os problemas de contaminação e oxidação inicial dos explantes também ocorriam com maior intensidade quando se utilizavam este tipo de explante.

No entanto, muito embora a propagação de mudas de bananeiras não sejam comumente oriundas de explantes florais, a viabilidade de seu uso como fonte de material propagativo tem sido citada desde 1985 por Vuylsteke e De Langhe. Bakry e Rossignol (1985) recomendam a utilização de tecidos florais, argumentando que esses são menos susceptíveis às oxidações em consequência da menor liberação de compostos fenóis que, dependendo do grau, pode causar a morte e conseqüente perda do material durante o cultivo *in vitro*. Ainda segundo estes autores, esta liberação de fenóis ao redor dos explantes pode impedir a absorção dos nutrientes do meio de cultura e, portanto, o desenvolvimento e proliferação das gemas. Ressalta-se também que o uso de explantes de origem floral poderia ser uma alternativa ao uso de explantes originados de gemas apicais, uma vez que, geralmente, este tipo de propágulo é eliminado no momento de crescimento do cacho.

Ainda no que se refere à taxa de perda do material propagativo por contaminação, verificou-se que ao longo dos cultivos ocorreu uma redução na frequência de contaminação bacteriana e, conseqüente, descarte de material (Tabela 3).

Apesar das elevadas perdas de material por contaminação, as maiores taxas de multiplicação obtidas neste trabalho com o uso de propágulos florais alcançaram 5,3 brotos por explante para cultivar Preciosa e 6,1 brotos por explante para cultivar FHIA 02 no terceiro subcultivo (Tabela 4). Após este subcultivo, os clones de ambas as cultivares permaneceram com uma taxa de multiplicação semelhante até o sétimo subcultivo, com média de 2,1 brotos por explante. E assim como verificado para o experimento onde se utilizou gemas apicais como material propagativo, a estimativa (TMe) do número de mudas a serem produzidas em sete subcultivos, a partir de explantes de origem floral, foi de 60,6 e 79,2 mudas por explante para as cultivares Preciosa e FHIA 02, respectivamente.

Quando a taxa de multiplicação ao longo dos subcultivos foi avaliada individualmente, verificou-se que os clones 4 e 9 da cultivar FHIA 02 foram os únicos

que apresentaram produção de mudas estimada superior a 100 mudas por explante (113,4 e 163,2 mudas respectivamente). Já para a cultivar Preciosa, somente o clone 2 é que apresentou uma produção estimada em mais de 100 mudas por explante (105,9 mudas). Isso sugere a importância de se otimizar os índices de multiplicação em cada subcultivo para que, ao final do período de multiplicação, o número acumulado de brotações possa tornar este processo ainda mais eficiente.

Neste trabalho, verificou-se que um aumento significativo na taxa de multiplicação só foi observado após a 3ª subdivisão do material propagativo, tanto para cv. Preciosa como para a FHIA 02 (Tabela 4). Apesar de não ter sido testada e, portanto, necessitar de estudos mais aprofundados, a hipótese capaz de explicar esse aumento na taxa de multiplicação ao longo dos cultivos pode estar na necessidade de reversão do estado floral ao vegetativo dos explantes, que ocorreu somente a partir deste subcultivo (Figura 2) e, conseqüentemente, o retorno ao estado meristemático, em processos denominados de desdiferenciação e rediferenciação, ou seja, reprogramação celular (ALVES, et al., 2004).

Comparativamente ao terceiro subcultivo, observou-se decréscimo das taxas de multiplicação nos subcultivos subsequentes, que situaram-se entre 1,2 e 3,6 brotos por explante até o final do experimento (Tabela 4). Esta diminuição das taxas de multiplicação ocorreu, possivelmente, em razão da individualização das brotações e, por conseguinte, da diminuição dos índices de regeneração de novas brotações. Soma-se o fato de que as brotações originadas deste tipo de explante podem não apresentar uma estrutura morfofisiológica como as das gemas apicais, as quais possuem inúmeras porções vegetativas meristemáticas circundando o pseudocaulo, isso pode explicar o fato das taxas de multiplicação e, portanto, formação de mudas a partir deste tipo de explante serem, de maneira geral, inferiores àqueles observados quando se usa explantes provenientes de gemas apicais.

TABELA 3 Avaliação das perdas por contaminação bacteriana ao longo de sete subcultivos *in vitro* das cultivares de bananeira Preciosa e FHIA 02

| CI* | TAXA DE CONTAMINAÇÃO/MORTE (%) | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|--------------------------------|------------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | cv. Preciosa | | | | | | | | cv. FHIA 02 | | | | | | | |
| | Est.** | Subcultivos..... | | | | | | | Est. | Subcultivos..... | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| 2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 5,5 | 0,0 | 0,0 | 100 | - | - | - | - | - | - | |
| 3 | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 0,0 | 11,0 | 0,0 | 0,0 | 100 | - | - | - | - | - | - | |
| 4 | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 0,0 | 5,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2, | |
| 5 | 100 | - | - | - | - | - | - | 100 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 6 | 100 | - | - | - | - | - | - | 100 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 7 | 100 | - | - | - | - | - | - | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0, | |
| 8 | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100 | - | - | - | - | - | - | |
| 9 | 100 | - | - | - | - | - | - | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 7, | |
| 10 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 12,5 | 6,7 | 0,0 | 0,0 | 100 | - | - | - | - | - | - | |
| 11 | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 0,0 | 5,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0, | |
| 12 | 100 | - | - | - | - | - | - | 100 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 13 | 0,0 | 0,0 | 50 | 0,0 | 11,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0, | |
| 14 | 100 | - | - | - | - | - | - | 100 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 15 | 100 | - | - | - | - | - | - | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0, | |

*Clones; **Estabelecimento: A perda por contaminação inicial neste experimento foi de 53,33% dos clones.

TABELA 4 Taxas de multiplicação por clones das gemas florais de bananeira *in vitro*, com 4 mg.L⁻¹ de BAP, das cultivares Preciosa e FHIA 02

| Clones | TAXA DE MULTIPLICAÇÃO | | | | | | | |
|--------------|-----------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| | cv. Preciosa | | | | | | | TMe* |
| | Subcultivos..... | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 2 | 1,0 | 1,0 | 5,0 | 1,8 | 3,2 | 2,3 | 1,6 | 105,9 |
| 3 | 1,0 | 0,5 | 5,0 | 1,8 | 1,4 | 1,7 | 1,6 | 17,1 |
| 4 | 1,0 | 0,5 | 6,0 | 3,2 | 3,6 | 1,5 | 1,6 | 82,9 |
| 8 | 1,0 | 0,5 | 3,0 | 2,3 | 1,8 | 2,2 | 1,6 | 21,8 |
| 10 | 1,0 | 1,0 | 4,0 | 2,2 | 1,8 | 1,6 | 2,2 | 55,7 |
| 11 | 1,0 | 0,5 | 5,0 | 3,4 | 2,9 | 2,5 | 1,4 | 88,8 |
| 13 | 1,0 | 0,5 | 9,0 | 1,5 | 2,2 | 2,1 | 1,7 | 53,0 |
| Média | 1,0 | 0,64 | 5,3 | 2,3 | 2,4 | 2,0 | 1,7 | 60,6 |
| Clones | cv. FHIA 02 | | | | | | | TMe |
| | Subcultivos..... | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 1 | 1,0 | 0,5 | 2,0 | 2,5 | 2,0 | 2,4 | 1,8 | 21,6 |
| 4 | 1,0 | 0,5 | 7,0 | 2,5 | 2,4 | 3,0 | 1,8 | 113,4 |
| 7 | 1,0 | 0,5 | 7,0 | 2,2 | 2,4 | 2,1 | 1,3 | 50,4 |
| 9 | 1,0 | 1,0 | 12,0 | 1,6 | 2,5 | 1,7 | 2,0 | 163,2 |
| 11 | 1,0 | 0,5 | 3,0 | 3,3 | 2,0 | 2,2 | 1,1 | 71,8 |
| 13 | 1,0 | 1,0 | 8,5 | 1,2 | 2,7 | 1,6 | 1,6 | 70,5 |
| 15 | 1,0 | 1,0 | 3,5 | 1,6 | 2,6 | 2,3 | 1,9 | 63,6 |
| Média | 1,0 | 0,7 | 6,1 | 2,1 | 2,4 | 2,2 | 1,7 | 79,2 |

*Taxa de multiplicação estimada.

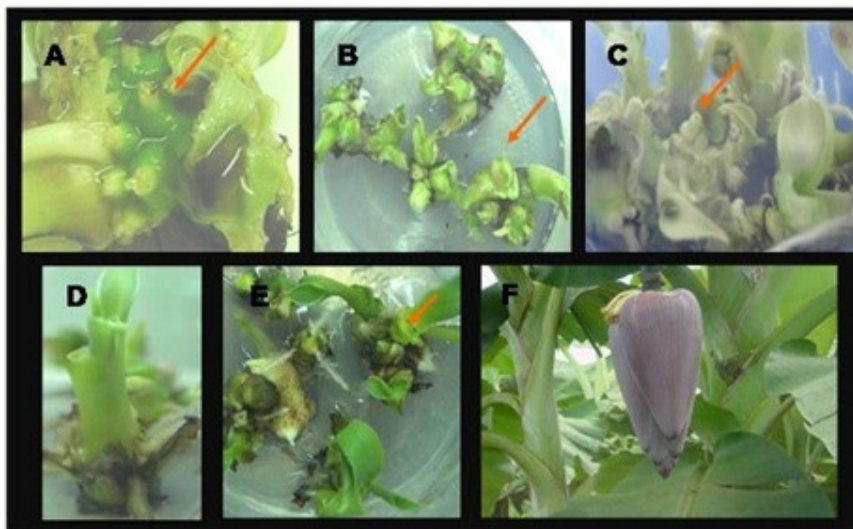


FIGURA 2 A- Brotações a partir de inflorescência no início do cultivo; B e C- Brotações de inflorescência a partir do 3° subcultivo; D e E- Inflorescências em 4 mg.L⁻¹ de BAP a partir do quinto subcultivo; F- Fonte de explante de ápice floral.

4.2 ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO DE MUDAS DE BANANEIRAS MICROPROPAGADAS NAS CONDIÇÕES DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL: EFEITO DE TIPOS DE SUBSTRATOS E RECIPIENTES

Pela análise dos substratos, pode-se observar aumento na umidade percentual e nos teores de carbono, nitrogênio, cálcio, fósforo e potássio à medida que a proporção de casca de arroz carbonizada nos substratos contendo esterco foi elevada (Tabela 5). É possível observar ainda que, quando foi feita a análise química do esterco bovino isoladamente, este apresentou os maiores teores de nutrientes, o que pode influenciar sobremaneira na disponibilidade de nutrientes nos substratos que o contêm (Tabela 5). Este fato corrobora com Almeida et al. (1988) e Matos et al. (2002), que afirmam que para uma correta interpretação dos resultados obtidos com o emprego de esterco em substratos, deve-se considerar a composição química do mesmo, uma vez que alterações na composição de substratos pelo uso de esterco proporcionam efeitos benéficos no crescimento vegetativo de mudas.

TABELA 5 Características químicas dos Substratos testados e de seus componentes

| Substrato | Cinzas | Umidade | Carbono | N | Ca | Mg | P | K |
|----------------|-------------|---------|---------|-------------------------------|------|------|------|-------|
| |%..... | | |g.Kg ⁻¹ | | | | |
| Esterco | 76,07 | 4,81 | 23,93 | 0,97 | 5,24 | 4,24 | 3,34 | 10,06 |
| CAC* | 35,72 | 7,59 | 64,28 | 0,79 | 3,93 | 2,24 | 2,60 | 10,37 |
| S1 | 90,15 | 2,70 | 9,85 | 0,30 | 2,02 | 0,74 | 0,61 | 1,86 |
| S2 | 88,56 | 2,46 | 11,44 | 0,34 | 2,42 | 1,09 | 0,98 | 2,65 |
| S3 | 87,49 | 2,40 | 12,51 | 0,32 | 2,24 | 0,74 | 0,67 | 2,19 |
| S4 | 85,62 | 2,68 | 14,38 | 0,40 | 2,70 | 1,16 | 1,07 | 2,93 |
| S5 | 82,13 | 3,13 | 17,87 | 0,49 | 2,73 | 1,62 | 1,19 | 2,67 |
| S6 | 76,46 | 3,70 | 23,54 | 0,55 | 3,04 | 0,97 | 1,37 | 8,12 |

Médias de três plantas/parcela. Resultado de N, Ca, Mg, K e P foram obtidos com base na matéria seca a 105 °C. Análises realizadas de acordo com Embrapa (1997). *CAC: Casca de arroz carbonizada; S1: Terra de encosta; S2: Terra de encosta + esterco bovino (3:1 v/v); S3: Terra de encosta + CAC (3:1 v/v); S4: Terra de encosta + esterco bovino + CAC (3:1:1 v/v); S5: Terra de encosta + esterco bovino + CAC (3:1:2 v/v) e S6: Terra de encosta + esterco bovino + CAC (3:1:3 v/v).

A sobrevivência das plantas não foi significativamente influenciada pelos diferentes substratos e tipos de tubetes utilizados (Tabela 6), tendo sido observada uma sobrevivência média superior a 91% (Figura 3C). Para a altura da parte aérea e diâmetro do pseudocaulo, o cultivo das plantas em tubetes de maior tamanho promoveu resultados significativamente superiores, com valores médios de 30,5 cm e 11,2 mm, respectivamente. Estes resultados estão em concordância com Neto et al. (2004), segundo os quais o tamanho do recipiente tem grande influência no desenvolvimento de mudas, por proporcionar um bom desenvolvimento do sistema radicular. Provavelmente, o maior volume de substrato nos tubetes maiores e, conseqüentemente, a maior disponibilidade de nutrientes ao longo do tempo e o maior espaço para o crescimento das raízes tenham favorecido positivamente os resultados de crescimento das plantas observados neste experimento (Figura 3B).

Apesar de o cultivo em tubetes pequenos (115 cm³) ter proporcionado resultados inferiores em crescimento das plantas que aqueles observados em tubetes de 180 cm³, não houve diferenças na sobrevivência das plantas, sugerindo que seu emprego poderia ser útil em curtos períodos de aclimatização. Constituem-se, portanto, numa alternativa para economia de material, pois uma menor quantidade de substrato é necessária para o preenchimento dos tubetes, além de requererem menor espaço físico, tempo na execução do trabalho e, conseqüentemente, menor custo na produção (Figura 3A).

Estudando a aclimatização de mudas de abacaxizeiro micropropagadas sob a influência de diferentes substratos e recipientes, Souza Júnior et al. (2001) não observaram superioridade do uso de tubetes grandes em relação a tubetes pequenos. De acordo com seus resultados, o cultivo em tubetes pequenos suplantou os tubetes grandes quanto às variáveis de crescimento da parte aérea e do sistema radicular, exceção observada apenas para o diâmetro do colo. No entanto, de acordo com Reis et al. (1989), a restrição do crescimento de raízes provocada pelo volume do recipiente pode promover o desequilíbrio da razão raízes: parte aérea, alterando as respostas fisiológicas das plantas cultivadas.

Avaliando-se os substratos, incrementos significativos em relação à altura da parte aérea, foram observados apenas entre o substrato S1 e S2 (desprovido e acrescido de esterco, respectivamente), muito embora os substratos contendo esterco bovino tenham apresentado as maiores médias. Já, quanto ao diâmetro de plantas, os melhores resultados foram obtidos nos substratos formulados com esterco bovino (S2, S4, S5 e S6), os quais não diferiram entre si, porém, foram estatisticamente superiores aos demais substratos (Tabela 6).

Diante desses resultados, pode-se inferir que a introdução de esterco bovino teve um efeito mais pronunciado sobre o crescimento e a formação de mudas micropropagadas de bananeira do que o incremento na proporção de casca de arroz carbonizada aos substratos. Além disso, entre os substratos contendo casca de arroz carbonizada, pouca contribuição foi observada com o aumento deste componente.

Resultados positivos pelo uso da matéria orgânica (esterco bovino) na composição de substratos para a produção de mudas têm sido reportados por vários autores (SOUSA, 1994; VERMA; ARYA, 1998). De acordo com Verma e Arya (1998), a matéria orgânica (esterco de curral) possui em seu peso seco basicamente: 0,4–1,5% N, 0,3–0,9% de P_2O_5 e 0,3–1,9% K_2O . Deste, metade é constituída de N ou K, e 1/6 do fósforo é prontamente solúvel e disponível para as plantas. Soma-se a estas características o fato do húmus ou da matéria orgânica possuírem ainda propriedades de natureza coloidal, decorrentes de sua estrutura orgânica complexa, aliada a uma fina subdivisão de partículas (RAIJ, 1991). Assim, podem-se obter efeitos benéficos quanto à fertilidade do solo e no estímulo ou não do desenvolvimento de fungos micorrízicos benéficos (JONER; JAKOBSEN, 1992; VEJSADOVA, 1992), além de promover melhor desenvolvimento das raízes (BRANZANTI et al., 1992).

Estudando os efeitos da utilização de fungos micorrízicos e da matéria orgânica na aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira cv. Nanicão (AAA), Matos et al. (2002) observaram que, no tratamento sem micorrizas, a presença de matéria orgânica incrementou todas as variáveis avaliadas (altura, diâmetro e número de folhas ativas) em relação a sua ausência, muito embora, para algumas variáveis, não tenham sido observadas diferenças estatísticas quando se adicionou 10% e 20% de matéria orgânica.

Trabalhando com mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola, Moreira et al. (2006) também evidenciaram efeitos positivos da composição de substratos com esterco bovino. Segundo estes autores, as variáveis analisadas relativas à parte aérea e, em menor intensidade, as raízes, foram favorecidas pelo uso deste tipo de matéria orgânica. Contrariamente, mudas cultivadas apenas em terra de subsuperfície apresentaram resultados inferiores quando comparados àqueles obtidos com substratos formulados com esterco bovino, evidenciando a necessidade da mistura deste tipo de componente orgânico aos substratos. Peixoto et al. (2006) notaram benefícios advindos da utilização de esterco bovino como componente de substratos para aclimatização de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) micropropagadas, em que as plantas cultivadas em substratos contendo solo e esterco, nas proporções de 1:1 e 2:1, aos 180 dias, apresentaram os melhores resultados, atingindo 27,8 cm e 25,5 cm de altura, além de apresentarem maior número de brotações, com 2,2 e 2,5 por planta, respectivamente.

Embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada entre os substratos formulados com terra de encosta e casca de arroz carbonizada e aqueles contendo apenas esterco, pesquisas relatam que a opção pela casca de arroz é, na maioria das vezes, atribuída a sua característica de aumentar a porosidade total do substrato, em razão de sua baixa densidade, permitindo, dessa forma, maior drenagem e aeração do sistema radicular da muda (HARTMANN et al., 1997), o que poderia acarretar maior desenvolvimento das raízes e crescimento da parte aérea. Além disso, seu baixo custo e sua grande disponibilidade em regiões onde a orizicultura se encontra presente, são fatores relevantes para que diversos autores o utilizem como constituinte na formulação de substratos (BELLÉ; KÄMPF, 1994).

Em relação à massa fresca de raízes, parte aérea e total, nenhuma diferença significativa foi verificada entre os substratos quando se empregaram tubetes pequenos (115 cm³). Por outro lado, observou-se comportamento distinto pelo uso de

tubetes maiores (180 cm³), em que resultados verificados nos substratos S1 e S3 foram estatisticamente inferiores àqueles observados em substratos que continham o esterco bovino em sua composição. Em geral, as maiores médias foram verificadas quando se utilizou tubetes grandes (180 cm³) e nos substratos contendo esterco bovino em sua composição (Tabela 7).

Para a massa seca de raízes, diferenças significativas entre os substratos só foram verificadas quando se utilizaram tubetes pequenos (115 cm³), embora o substrato contendo terra de encosta e casca de arroz carbonizada (S3) tenha apresentado a menor média. Já em relação à massa seca da parte aérea e total, não se verificou diferença estatística entre os substratos com o uso de tubetes pequenos (115 cm³). Entretanto, resposta significativa das mudas crescendo em diferentes substratos com o emprego de tubetes grandes (180 cm³) foi verificada, com menores médias para o substrato S1 e S3 (Tabela 8).

Avaliando-se as médias, observa-se que o cultivo de plantas de bananeira da cv. Grande Naine nos tubetes maiores e em substratos contendo esterco em sua composição, possibilitou os melhores resultados às variáveis avaliadas neste trabalho (Tabela 9). Observações semelhantes foram reportadas por Matos et al. (2002), segundo os quais, a massa seca de raízes de mudas de bananeira, cv. Nanicão, cultivadas na presença de matéria orgânica, tiveram valores 7,6 vezes superiores àquelas cultivadas sem a presença de matéria orgânica. Porém, observaram que, para a parte aérea e comprimento radicular específico, as maiores médias foram constatadas sem matéria orgânica. Outro efeito também notado por estes autores pelo uso da matéria orgânica refere-se ao conteúdo total de fósforo na planta, que foi estatisticamente superior na ausência de esterco no substrato.

TABELA 6 Taxa de sobrevivência, altura da parte aérea e diâmetro do pseudocaulo de mudas micropropagadas de bananeira, cv. Grande Naine, após 75 dias de aclimatização

| Substratos** | Sobrevivência (%) | | | Altura da parte aérea (cm) | | | Diâmetro (mm) | | |
|--------------|-------------------|--------------|--------|----------------------------|--------------|--------|---------------|--------------|--------|
| | TP*** | TG*** | Média* | TP | TG | Média* | TP | TG | Média* |
| S1 | 88,9 | 97,2 | 93,0a | 21,0 | 25,0 | 23,0 b | 8,2 | 9,4 | 8,8 b |
| S2 | 100 | 100 | 100 a | 23,0 | 34,0 | 28,8 a | 9,1 | 12,6 | 10,9a |
| S3 | 86,1 | 97,2 | 91,7a | 19,5 | 27,8 | 23,7ab | 7,6 | 10,0 | 8,8 b |
| S4 | 97,2 | 100 | 98,6a | 22,3 | 31,1 | 26,7ab | 8,5 | 11,7 | 10,1a |
| S5 | 100 | 100 | 100 a | 24,0 | 31,8 | 27,9ab | 9,2 | 12,1 | 10,6a |
| S6 | 100 | 100 | 100 a | 23,2 | 32,8 | 28,0ab | 8,9 | 11,2 | 10,1a |
| Média | 95,4A | 99,1A | | 22,2B | 30,5A | | 8,6B | 11,2A | |
| CV(%) | | 8,3 | | | 17,3 | | | 6,7 | |

*Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliado, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. **S1: terra de encosta; S2: terra de encosta + esterco bovino (3:1 v/v); S3: terra de encosta + casca de arroz carbonizada (3:1 v/v); S4: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:1 v/v); S5: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:2 v/v) e S6: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:3 v/v). ***TP - Tubetes Pequenos (115 cm³); TG - Tubetes Grandes (180 cm³).

TABELA 7 Massa fresca de raízes, parte aérea e total de mudas micropropagadas de bananeira, cv. Grande Naine, após 75 dias de aclimatização

| Substratos** | Massa fresca de Raízes (g)* | | | Massa fresca da parte aérea (g)* | | | Massa fresca total* | | |
|--------------|-----------------------------|---------------|-------|----------------------------------|---------------|-------|---------------------|---------------|-------|
| | TP*** | TG*** | Média | TP | TG | Média | TP | TG | Média |
| S1 | 3,6aB | 6,9 bA | 5,3b | 8,0 aB | 17,1bA | 12,6b | 11,5aB | 24,1bA | 17,8b |
| S2 | 5,5aB | 11,5aA | 8,5a | 12,2aB | 29,6aA | 20,9a | 17,8aB | 40,7aA | 29,2a |
| S3 | 5,0aA | 6,8 bA | 5,9b | 8,6 aB | 18,5bA | 13,5b | 13,5aB | 25,2bA | 19,3b |
| S4 | 5,4aB | 12,9aA | 9,2a | 11,2aB | 11,2aA | 20,6a | 16,6aB | 42,9aA | 29,7a |
| S5 | 6,1aB | 13,2aA | 9,6a | 11,1aB | 34,0aA | 22,6a | 17,2aB | 41,3aA | 29,2a |
| S6 | 5,4aB | 11,6aA | 8,5a | 10,8aB | 27,8aA | 19,3a | 16,3aB | 39,4aA | 27,8a |
| Média | 5,2 B | 10,5 A | | 10,3 B | 26,2 A | | 15,5 B | 35,6 A | |
| CV(%) | | 23,1 | | | 15,5 | | | 22,3 | |

*Médias de três plantas/parcela. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliado, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. **S1: terra de encosta; S2: terra de encosta + esterco bovino (3:1 v/v); S3: terra de encosta + casca de arroz carbonizada (3:1 v/v); S4: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:1 v/v); S5: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:2 v/v) e S6: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:3 v/v). ***TP - Tubetes Pequenos (115 cm³); TG - Tubetes Grandes (180 cm³).

TABELA 8 Massa seca de raízes, parte aérea e total de mudas micropropagadas de bananeira, cv. Grande Naine, após 75 dias de aclimatização

| Substratos** | Massa seca de Raízes (g)* | | | Massa seca da parte aérea (g)* | | | Massa seca total (média)* | | |
|--------------|---------------------------|--------------|-------|--------------------------------|--------------|-------|---------------------------|--------------|-------|
| | TP*** | TG*** | Média | TP | TG | Média | TP | TG | Média |
| S1 | 0,9 aA | 0,7abA | 0,8 a | 1,3aA | 1,6 bA | 1,4ab | 1,6aB | 2,3abA | 2,0ab |
| S2 | 0,7abB | 1,1 aA | 0,9 a | 1,2aB | 2,3abA | 1,7ab | 1,6aB | 3,3abA | 2,5 a |
| S3 | 0,3 bA | 0,5 aA | 0,4 b | 0,8aB | 1,5 bA | 1,2 b | 1,1aB | 2,0 bA | 1,6 b |
| S4 | 0,4abB | 1,0abA | 0,7ab | 1,1aB | 2,7 aA | 1,9 a | 1,6aB | 3,7 aA | 2,6 a |
| S5 | 0,4abB | 1,0abA | 0,7ab | 1,1aB | 2,7 aA | 1,9 a | 1,5aB | 3,7 aA | 2,6 a |
| S6 | 0,4abB | 0,8abA | 0,6ab | 0,9aB | 2,2 aA | 1,6ab | 1,3aB | 3,0abA | 2,2ab |
| Média | 0,5 B | 0,9 A | | 1,1 B | 2,2 A | | 1,5 B | 3,0 A | |
| CV(%) | | 36,0 | | | 31,3 | | | 24,9 | |

*Médias de três plantas/parcela. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliado, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. **S1: terra de encosta; S2: terra de encosta + esterco bovino (3:1 v/v); S3: terra de encosta + casca de arroz carbonizada (3:1 v/v); S4: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:1 v/v); S5: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:2 v/v) e S6: terra de encosta + esterco bovino + Casca de arroz carbonizada (3:1:3 v/v). ***TP - Tubetes Pequenos (115 cm³); TG - Tubetes Grandes (180 cm³).



FIGURA 3 Aclimatização de mudas cv. Grande Naine no viveiro da Embrapa Acre; Comparação entre mudas aclimatizadas em: A - tubetes pequenos (115 cm³); B- tubetes grandes (180 cm³); C- Aspecto das mudas oriundas da micropropagação após 45 dias de aclimatização.

4.3 DIAGNOSE E CONTROLE DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES EM EXPLANTES DE BANANEIRAS

As estirpes bacterianas isoladas foram detectadas em explantes de bananeira de três diferentes cultivares: Preciosa, Maravilha e Thap Maeo. Os isolados encontrados com maior frequência foram de duas espécies: *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas hydrophila*, sendo nove estirpes pertencentes à primeira espécie, e apenas um da segunda espécie, onde somente na cultivar Maravilha houve a incidência de ambas as espécies identificadas.

Embora espécies do gênero *Aeromonas* sejam comumente relacionadas a trabalhos voltados para sua patogenicidade em humanos, e sua maior ocorrência esteja relatada em águas e peixes, este resultado não contrasta com os resultados obtidos por Brandi et al. (1996), que afirmam que o solo é um importante reservatório destas espécies, local onde suas cepas sobrevivem por longos períodos de tempo podendo ainda serem transmitidas através de material vegetal.

As colônias apresentaram uma cor creme para *K. pneumoniae* e cor creme clara para *A. hydrophila*. A espécie *K. pneumoniae* apresentou ainda os seguintes caracteres: bastonetes curtos, Gram negativa, anaeróbica facultativa, sem - motilidade, esporos ausentes, forma circular e elevada, superfície regular, lisa, brilhante, textura cremosa, catalase positiva, oxidase negativa (Tabela 9). Segundo Scherwinski-Pereira et al. (2003), este gênero, pertencente a família Enterobacteriaceae, está associado as perdas de materiais durante o cultivo *in vitro*. No entanto, apesar dos problemas ocasionados na cultura de tecidos, espécies de bactérias pertencentes a este gênero, são rotineiramente utilizadas como organismos modelo para os estudos de genética e bioquímica da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MARIN et al., 1999), indicando que a bananeira apresenta uma importante flora endofítica fixadora de nitrogênio no interior de seus tecidos.

Colônias da espécie do *A. hydrophila* caracterizam-se por apresentar borda irregular, superfície lisa e brilhante, textura cremosa, e com odor característico. Suas células apresentam bastonetes curtos e com forma convexo circular, além de ser Gram negativa, anaeróbica facultativa, móvel, não formar esporos, e apresentar catalase e oxidase positivas e uréase negativa (Tabela 9). Para a cultura de tecidos é um organismo considerado de difícil erradicação, por ser bastante resistente e difícil de se eliminar com hipoclorito (SISTI et al., 1998), componente muito utilizado na desinfestação de explantes nos cultivos *in vitro*.

Esses resultados corroboram com Niestche et al. (2006) que trabalhando com as cultivares de bananeira Prata Anã e SH36-40, afirmam que as maiores porcentagens de bactérias contaminante encontrados nos explantes de bananeira foram do tipo Gram negativa, com valores de 62,5% e 57,1% respectivamente. No entanto, bactérias de origem endofítica, ou seja, aquelas presentes no interior dos tecidos vegetais, sem causar aparentemente doenças (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003), podem aparecer no meio de cultura mesmo após uma desinfecção, já que esta é feita de forma superficial e, portanto, não atingem o interior dos tecidos onde se encontram estes

potenciais contaminantes. De acordo com Scherwinski-Pereira et al. (2003), além de serem as mais problemáticas, as contaminações bacterianas são agravantes pelo fato de serem difíceis de serem evidenciadas no início dos cultivos, sendo detectadas, geralmente, somente após algum tempo de manipulação, normalmente quando um grande número de plantas já está propagado.

Estes autores afirmam ainda, que por serem de difícil visualização, estas bactérias são facilmente transmitidas de um material para outro, durante os subcultivos dos explantes. Além disso, citam que quando as condições do meio de cultura (nutrição, pH) tornam-se favoráveis ao seu desenvolvimento, as bactérias passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos cultivos, podendo levá-los rapidamente à morte.

Assim, a identificação dos microrganismos contaminantes durante o cultivo *in vitro* é citada por Scherwinski-Pereira et al. (2003) como sendo uma condição para a seleção de agentes bactericidas que possam inibir o crescimento destes microrganismos no meio de cultura, evitando assim, a perda de materiais.

4.4 TESTES DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS BACTERIANOS A ANTIBIÓTICOS

Neste trabalho, as duas espécies de bactérias testadas foram consideradas sensíveis a antibióticos quando o diâmetro da zona inibitória foi maior que 8 mm (Tabela 10). Assim, verificou-se que os isolados de *K. pneumoniae* tiveram seu crescimento inibido por seis substâncias antimicrobianas: Vancomicina, Cloranfenicol, Cefotaxima, Cefoxetina, Tetraciclina e Cefaclor. Schmitz et al. (2000) verificaram que a Cefotaxima foi particularmente ativa para a família Enterobacteriaceae, incluindo organismos do gênero *Klebsiella*.

Já para *A. hydrophila* verificou-se que esta apresentou sensibilidade aos antibióticos: Cefalotina, Cloranfenicol, Cefotaxima, Ácido Nalidíxico, Eritromicina, Cefalexina, Tetraciclina e Cefaclor.

Estes resultados permitiram fazer uma seleção dos antibióticos a serem utilizados no estudo subsequente que determinou a concentração bactericida mínima inibitória (CBMI) dos contaminantes, uma etapa considerada de fundamental importância por Scherwinski-Pereira et al. (2003), que citam que o sucesso do trabalho com antibióticos em cultivos *in vitro* somente pode ser obtido após o isolamento,

...Continuação da Tabela 9

| | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Produção | | | | | | | | | | |
| H ₂ S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Nr |
| Indol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Nr |
| Oxidase | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Gelatinase | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| AÁcFC | | | | | | | | | | |
| L-prolina | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| L-alanina | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| L-histidina | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| DI-lactato | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| AÁcGFC | | | | | | | | | | |
| Acet. Sódio | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Gluconico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Propionico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| Heptanoico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| AAFC | | | | | | | | | | |
| D-manitol | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Trealose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Maltotriose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| NAG | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Myo-inositol | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Maltose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| D-manose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| D-galactose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Sacarose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Glicose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | + |
| Arabinose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| D-xilose | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| AÁcAFC | | | | | | | | | | |
| LÁcA | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| AÁc | | | | | | | | | | |
| β-HB | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| AÁcCarbFC | | | | | | | | | | |
| Azelaico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| Sebacico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| Subérico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| Adípico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| Cítrico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| Poritaconico | Nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | nr | - |
| Uréase | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| TSI | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Motilidade | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| <i>Identifi- Cacao**</i> | <i>K. pneu- moniae</i> | <i>K. pneu- moniae</i> | <i>K. pneu- moniae</i> | <i>K. pneu- moniae</i> | <i>K. pneu- moniae</i> | <i>K. pneu- moniae</i> | <i>K. pneu- moniae</i> | <i>K. pneu- moniae.</i> | <i>K. pneu- moniae</i> | <i>A. hydro- phila</i> |

(¹) Após 24 horas de cultivo em meio Ágar nutritivo a 28 °C, pH 7,0 ± 0,2; (²) nr: Teste não realizado. *Cr = Creme; CrC = Creme clara; CE= circular/elevada; CCB= circular/convexa baixa; In = Inteirar; Ir = Irregular; LB= lisa/brilhante; Super. = Superfície; Crm = Cremosa; TC= Tamanho da colônia; MC= Morfologia celular; Utili. O₂ = Utilização de O₂; Bast.= Bastonete; CT= curto; Ana. F= Anaeróbica facultativa; MGO= Metabolismo de glicose oxidativo; Fác.= Formação de ácido; Desa.= Desaminação; Desc.= Descarboxilação; MpH por acet.= Mudança de pH por acetamida; FC= Fermentação de compostos; Cresc. Poly B= Crescimento em Polymixina B; AÁcFC = Assimilação de ácido como fonte de Carbono; AÁcGFC = Assimilação de ácidos graxos como fonte e carbono; Acet. Sódio= Acetato de sódio; AAFC= Assimilação de açúcares como fonte de carbono; NAG = N-acetil-glicosamina; AÁcAFC = Assimilação de ácido aminoácido como fonte de carbono; LÁcA = L-ácido-aspártico; AÁc = Assimilação de ácido; β-HB = β-hidroxido-butirico; AÁcCarbFC = Assimilação de ácido carboxílico como fonte de carbono; TSI = Triplo-Ágar-Açúcar Ferro; ***K. pneumoniae* = *Klebsiella pneumoniae*; *A. hydrophila* = *Aeromonas hydrophila*.

TABELA 10 Sensibilidade de estirpes bacterianas isolados de banana cultivada *in vitro* a antibióticos*

| Antibióticos | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | <i>K. pneumoniae</i> (cm)** | <i>A. hydrophila</i> (cm)** |
|----------------|--|-----------------------------|-----------------------------|
| Cefalotina | 30,0 | 1,8 \pm 0,1s | 3,0 \pm 0,1s |
| Gentamicina | 10,0 | 1,1 \pm 0,0s | 1,5 \pm 0,1s |
| Rifampicina | 5,0 | 1,0 \pm 0,1s | 1,6 \pm 0,2s |
| Vancomicina | 30,0 | 2,0 \pm 0,4s | 1,9 \pm 0,2s |
| Penicilina | 10,0 | 0,0 \pm 0,0r | 1,3 \pm 0,2s |
| Cloranfenicol | 30,0 | 2,1 \pm 0,8s | 2,3 \pm 0,3s |
| Ampicilina | 10,0 | 0,6 \pm 0,4r | 0,6 \pm 0,7r |
| Cefotaxima | 30,0 | 2,9 \pm 0,3s | 2,7 \pm 0,8s |
| Estreptomicina | 10,0 | 1,3 \pm 0,1s | 1,6 \pm 0,1s |
| Novobiocina | 5,0 | 1,2 \pm 0,1s | 1,3 \pm 0,7s |
| Ác. Nalidixico | 30,0 | 1,9 \pm 0,1s | 2,9 \pm 0,1s |
| Amoxicilina | 10,0 | 0,0 \pm 0,0r | 1,7 \pm 0,1s |
| Eritromicina | 15,0 | 0,2 \pm 0,4r | 2,0 \pm 0,3s |
| Sulfonamida | 300,0 | 0,0 \pm 0,0r | 0,2 \pm 0,4r |
| Cefalexina | 30,0 | 1,7 \pm 0,1s | 3,1 \pm 0,4s |
| Cefoxitina | 30,0 | 2,6 \pm 0,3s | 1,9 \pm 0,1s |
| Oxacilina | 1,0 | 0,8 \pm 0,1s | 1,2 \pm 0,6s |
| Amicacina | 30,0 | 1,3 \pm 0,1s | 1,7 \pm 0,1s |
| Tetraciclina | 30,0 | 2,0 \pm 0,1s | 2,1 \pm 0,2s |
| Cefaclor | 30,0 | 2,6 \pm 0,2s | 3,9 \pm 0,4s |

*A sensibilidade dos isolados foi determinada após 24 horas de incubação, determinando-se o tamanho do halo de inibição (mm). Foram considerados suscetíveis aos antibióticos, os isolados que apresentaram a formação de um halo de inibição de 0,8 cm, conforme metodologia de Wilson e Power (1989) onde s = susceptível e r = resistente.

***Klebsiella pneumoniae*; *Aeromonas hydrophila*.

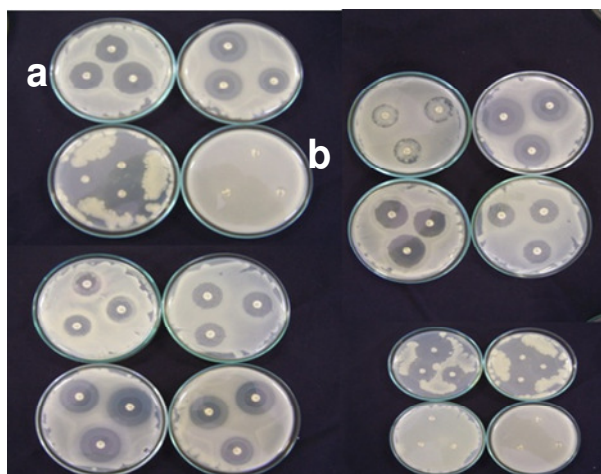


FIGURA 4 Biotestes de sensibilidade de contaminante bacteriano de banana a antibióticos, mostrando sensibilidade (a) ou não (b) ao agente antimicrobiano testado.

4.4.1 Determinação da concentração bactericida mínima inibitória (CBMI)

Dos seis antibióticos testados apenas três inibiram o crescimento das bactérias: Ácido Nalidixico, Cefaclor e Vancomicina. No entanto, o Ácido Nalidixico foi eficiente apenas para uma das estirpes em estudo, apresentando efeito bactericida apenas nos tratamentos que continham a maior concentração testada (1.024 mg.L^{-1}), enquanto que o cefaclor e a vancomicina inibiram o crescimento de ambos os isolados já na metade dessa concentração, ou seja, 512 mg.L^{-1} (Tabela 11).

De modo geral, apesar de ambos os isolados apresentarem sensibilidade apenas para as maiores concentrações testadas (512 e 1.024 mg.L^{-1}), observou-se que o crescimento de *K. pneumoniae* (BMA3) também foi inibido em meio contendo Cefaclor na concentração de 256 mg.L^{-1} , demonstrando assim, ser um microrganismos mais suscetível que *A. hydrophila* (BMA5) para este produto.

Na Tabela 12 pode ser observado os resultados do teste que confirma a eliminação das bactérias pelos antibióticos durante o teste da CBMI. Com exceção do gênero *Klebsiella* tratado com o antibiótico Cefaclor na concentração de 256 mg.L^{-1} , cujo teste da CBMI foi negativo para crescimento bacteriano, de maneira geral, os resultados obtidos no teste da CBMI foram confirmados quando os tratamentos não turvados foram cultivados em meios semi-sólido (Figura 5). Ressalte-se assim, que apesar da maioria dos resultados terem confirmado os testes da CBMI, é importante destacar que além do tipo de antibiótico a ser utilizado, outro fator a ser cuidadosamente definido é a concentração adequada do antibiótico para que este tenha efeito bactericida e não bacteriostático durante os tratamentos *in vitro*.

TABELA 11 Concentração bactericida mínima inibitória (CBMI) dos antibióticos Ácido Nalidixico, Cefaclor, Cefalexina, Cloranfenicol, Vancomicina e Cefalotina para as diferentes estirpes bacterianas isoladas de banana sob micropropagação

| CBMI (mL ⁻¹) | Ác. Nal** | | Cefac | | Cefale | | Cloran | | Vanco | | Cefalo | |
|-----------------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | BM A3* | BM A5 | BM A3 | BM A5 | BM A3 | BM A5 | BM A3 | BM A5 | BM A3 | BM A5 | BM A3 | BM A5 |
| 0 | +*** | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 16 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 32 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 64 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 128 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 256 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 512 | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + |
| 1.024 | + | - | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + |

*BMA3= *Klebsiella pneumoniae*; BMA5= *Aeromonas hydrophila*; **Ac. Nal.=Ácido Nalidixico; Cefac=Cefaclor; Cefale=Cefalexina; Cloran=Cloranfenicol; Vanco=Vancomicina; Cefalo=Cefalotina. ***(+): crescimento; (-): ausência de crescimento.

TABELA 12 Teste de confirmação da inibição do crescimento em placas de petri de colônias de bactérias das concentrações que não apresentaram turvação no meio, após dois dias

| Antibióticos* | Concentração em mg.L ⁻¹ | | | | | |
|----------------|---|-----|-------|--|-----|-------|
| | 256 | 512 | 1.024 | 256 | 512 | 1.024 |
| | <i>Aeromonas hydrophila</i> | | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | |
| Ác. nalidixico | x | x | - | x | x | x |
| Cefaclor | x | - | - | + | - | - |
| Vancomicina | x | - | - | x | - | - |

*(x) concentração não avaliada; (-) ausência de crescimento bacteriano; (+) presença de crescimento bacteriano.

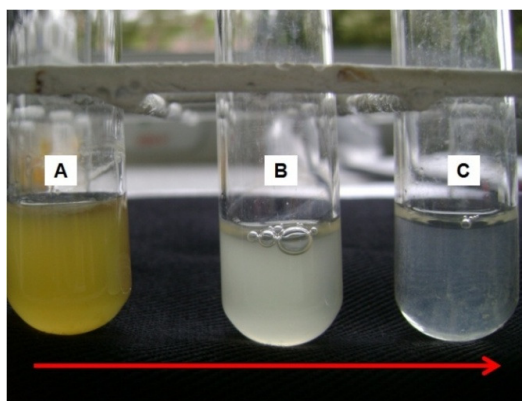


FIGURA 5 Escala ilustrativa de turbidez no meio líquido inoculado com bactérias contaminantes, isoladas de explantes de bananeira micropropagados, contendo diferentes concentrações de antibióticos: A- meio turvo com 256 mg.L⁻¹; B- meio turvo com 512 mg.L⁻¹; C- meio não turvo com 1.024 mg.L⁻¹.

4.4.2 Fitotoxicidade de antibióticos para uso no cultivo *in vitro* de bananeira

Dos seis antibióticos testados no teste da CBMI (item 4.4.1), apenas três foram pré selecionados para a realização do bio-ensaio de fitotoxicidade em explantes de bananeira durante a micropropagação: Cefaclor, Ácido Nalidíxico e Vancomicina nas concentrações de 512 e 1.024 mg.L⁻¹. De maneira geral, as taxas de sobrevivência do material propagativo sob cultivo *in vitro* foi superior a 90%, sendo observado efeito fitotóxico apenas no tratamento T3 composto por 1.024 mg.L⁻¹ de cefaclor que ocasionou a morte de 65% do material inoculado inicialmente (Tabela 13).

Quanto à multiplicação, o tratamento T3 foi o único que apresentou diferenças estatísticas em relação aos demais, com uma taxa de 0,25 brotos por explante, valor significativamente inferior aos demais tratamentos que alcançaram taxas de multiplicação entre 1,30 e 2,95 brotos por explante. Resultados semelhantes também foram observados por Lima e Moraes (2006) trabalhando com explantes de bananeira da cv. Caipira, onde a adição do antibiótico Rifampicina ao meio de cultura MS reduziu a taxa de multiplicação ao longo dos subcultivos de 2,9 brotos por explante para aproximadamente 1,5.

Na média, os tratamentos apresentaram valores de multiplicação em torno de 2,0 brotos por explante, número semelhante aos resultados obtidos por Costa et al. (2006) e Oliveira et al. (2008a) em experimentos de multiplicação de bananeiras, sugerindo que a seleção e uso dos antibióticos pré-selecionados podem ser medidas eficientes para o controle de contaminações durante o cultivo de bananeira, por serem efetivos no controle e não apresentarem efeito fitotóxico sobre o cultivo (Tabela 13). Além disso, visualmente, não foram observados sintomas de fitotoxidez (aumento de oxidação, diferenças morfológicas) nas plantas cultivadas em meio MS contendo antibióticos, independentes das concentrações utilizadas.

A Rifampicina é um dos antibióticos mais utilizados no cultivo *in vitro* de plantas, tanto para estudos de multiplicação, como transformação. Segundo Torres et al. (1998), este antibiótico é capaz de controlar bactérias endógenas, além de ter amplo espectro de ação, tanto para bactérias Gram positivas (POLLOCK et al. 1983) quanto Gram negativas (HALDEMAN et al. 1987). No entanto, outros antibióticos como Ampicilina, Amoxicilina, Cefatoxima, Gentamicina, Eritromicina, Estreptomicina, Tetraciclina também são bastante utilizados em trabalhos de diversas espécies, como cana-de-áçúcar (DONATO et al., 2005) e batata (SCHERWINSKI-PEREIRA et al.,

2003). Entretanto, antibióticos como Vancomicina, Cefaclor e Ácido Nalidixico não são freqüentemente utilizados, embora não existam na literatura inferências sobre a toxicidade destes em plantas.

TABELA 13 Taxa de multiplicação e sobrevivência de explantes de bananeira cv. Preciosa, sob diferentes concentrações de Cefaclor, Ácido Nalidixico e Vancomicina em meio semi-sólido contendo 4 mg.L⁻¹ de BAP, após 30 dias de cultivo

| Tratamento* | Taxa de multiplicação | Taxa Sobrevivência (%) |
|---------------|-----------------------|------------------------|
| T1 | 2,25 a | 100 a |
| T2 | 1,30 a | 100 a |
| T3 | 0,25 b | 35 b |
| T4 | 2,95 a | 100 a |
| T5 | 2,55 a | 100 a |
| T6 | 2,15 a | 100 a |
| T7 | 2,62 a | 100 a |
| CV (%) | 24,57 | 17,80 |

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliados diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *T1: Testemunha (meio de cultura desprovido de antibiótico); T2: Cefaclor (512 mg.L⁻¹); T3: Cefaclor (1.024 mg.L⁻¹); T4: Ácido Nalidíxico (512 mg.L⁻¹); T5: Ácido Nalidíxico (1.024 mg.L⁻¹); T6: Vancomicina (512 mg.L⁻¹); T7: Vancomicina (1.024 mg.L⁻¹).

Apesar de onerosa, a adição de antibióticos no meio de cultura podem proporcionar resultados eficientes no que se refere a redução da perda de material vegetal. Lima e Moraes (2006) observaram redução de até 66,6% da contaminação bacteriana quando adicionaram antibióticos ao meio MS durante o cultivo de bananeiras cv. Caipira. Embora, níveis de contaminação abaixo de 2%, nos subcultivos, são usualmente considerados como o mínimo requerido para garantir sucesso na produção (LEIFERT; WOODWARD, 1998), Scherwinski-Pereira e Fortes (2003) afirmam que os índices devem ser mínimos ou inexistentes para evitar perdas importantes na produção de mudas *in vitro*. Além disso, citam que os maiores problemas na maioria dos trabalhos *in vitro*, é a freqüência de descontaminação que geralmente não é total e, portanto, podem comprometer o trabalho e as taxas de multiplicações nos subcultivos subsequentes.

A forma e o espectro de ação dos antibióticos podem interferir na sua eficiência no controle das bactérias. A Vancomicina por exemplo, é pertencente ao grupo dos glicopeptídios e atuam como inibidores da síntese da parede celular bacteriana, tornando-as deficientes e ocasionando a morte das bactérias (PEREIRA, 2001). Apesar

de seu espectro de ação ser restrito a bactérias Gram positivas e ser usado, geralmente em altas concentrações, neste trabalho, a Vancomicina foi eficiente no controle de *K. pneumoniae* e *A. hydrophila*, bactérias Gram negativas. Isso indica que o espectro de ação deste bactericida pode ser potencializado quando sua concentração é aumentada, o que está de acordo com Scherwinski-Pereira e Fortes (2003), que afirmam ser comum a necessidade de aumento das concentrações de antibióticos quando adicionados ao meio de cultivo, devido a interferência da solidificação do meio de cultura no transporte dos princípios ativos.

Assim como a Vancomicina, o Cefaclor também atua como inibidor da síntese da parede celular bacteriana. Este bactericida é pertencente ao grupo das cefalosporinas e pode ser eficiente tanto para bactérias Gram positivas como Gram negativas, e apesar de ter ação positiva no controle de bactérias durante o cultivo *in vitro* (GOLCMAN et al., 1997), neste trabalho, o potencial bactericida do Cefaclor apresentou efeito negativo no desenvolvimento dos explantes de bananeira quando adicionado em altas concentrações ao meio de cultura. Já o Ácido Nalidixico, pertencente ao grupo dos quinolonas, agem impedindo a replicação bacteriana, por atuarem na síntese do DNA da bactéria. Este antibiótico é citado como ativo contra bactérias Gram negativas (LESCHER et al., 1962), sendo eficiente contra espécies do gênero *Klebsiella*, embora Minarini (2008) tenha relatado em seus estudos, alguns mecanismos que conferem resistência da espécie *Klebsiella pneumoniae* às quinolonas, incluindo o Ácido Nalidíxico.

Muitos fatores devem ser previamente observados quando o controle dos contaminantes *in vitro* é feito pela adição de antibióticos ao meio de cultura. Além da concentração adequada, a forma e espectro de ação do bactericida e a fitotoxicidade devem ser observados (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003). Entretanto, os resultados contrastantes encontrados na literatura quando antibióticos são utilizados em meio MS, permitem inferir que um fator que pode influenciar na taxa de fitotoxidez do produto é o genótipo. Lima e Moraes (2006), trabalhando com o antibiótico Rifampicina, não verificaram anomalias em plantas de bananeira da cv. Caipira propagadas em meio MS, enquanto Carneiro et al. (2000), trabalhando com este mesmo produto, detectou efeito fitotóxico em plantas da cv. Maçã, evidenciado por deformações na parte aérea e redução do tamanho final das brotações, em concentrações equivalentes do produto.

4.5 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM GENÓTIPOS DE BANANEIRAS

4.5.1 Contagem e Isolamento

Foi verificada presença de bactérias diazotróficas por meio da formação de película nas amostras de solo rizosférico e raízes a partir dos meios de cultura semi-sólidos LGI e JNFb. De um total de 60 amostras (30 de raízes e 30 de solo) foram isolados 150 estirpes formadoras de película que segundo Cavalcante e Döbereiner (1988), é uma característica típica do crescimento de bactérias diazotróficas em meios semi-sólidos.

Após duas repicagens sucessivas para novos meios de cultura semi-específicos e purificação das estirpes em meios semi-sólidos, o número de isolados que permaneceram apresentando formação de película característica desse grupo de microrganismos foi reduzido para 67. Uma das hipóteses capaz de explicar essa drástica redução no número de isolados inicial, pode ser de que os organismos ao longo das repicagens foram reduzindo sua capacidade de crescer utilizando as fontes nutritivas dos meios de cultura utilizados, o que está de acordo com Perin (2007) quando afirma que os meios de cultivo desenvolvidos para bactérias diazotróficas são muito seletivos e podem não representar o ambiente de vida de alguns organismos, além disso, sabe-se que menos de 1% dos microrganismos são cultiváveis, já que a mudança do interior da planta para um meio de cultura nutricionalmente limitado diminui a possibilidade de crescimento das bactérias (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Destes 67 isolados obtidos ao final do processo de isolamento, um total de 35 (52,24%) foram isolados das amostras de raízes e 32 (47,76%) das amostras de solo rizosférico. Este resultado corrobora com Perin (2007), que trabalhando com os meios LGI e JMV também detectou as maiores populações de bactérias em amostras de rizosfera e raízes de cana-de-açúcar afirmando que isso se deve principalmente as substâncias como carboidratos, ácidos orgânicos e vitaminas exsudadas das plantas e aos macro e micronutrientes do solo o que possibilita, geralmente, maior desenvolvimento de bactérias em regiões bem próximas as raízes.

Na contagem de bactérias diazotróficas feitas em meio semi-sólidos semi-específicos (livre de N) realizada em amostras de raízes e solo, verificou-se que as maiores concentrações de células bacterianas foram observadas nas raízes quando inoculadas em meio JNFb contendo malato como fonte de carbono, num total que variou de não detectado à 140×10^5 células por grama de massa fresca (Tabela 14). Resultado semelhante foi encontrado por Weber (1998) usando meio NFB que, entretanto, possuía a mesma fonte de carbono do meio JNFb utilizado neste estudo. Além disso, a presença de maior população de bactérias também foi observada neste meio de cultura, num total de 51 isolados, representando 76,12% do total de estirpes obtidas, sendo que deste total, 26 estirpes foram isoladas das amostras de solo e 25 das amostras de raízes.

De maneira geral, em meio de cultura semi-sólido LGI contendo sacarose como fonte de carbono, observou-se os menores índices de células bacterianas isoladas (Tabela 14), e conseqüentemente, a ocorrência do menor número de populações de bactérias diazotróficas crescidas em ambas as amostras de solo e raiz analisadas, num total de 6 e 10 isolados respectivamente, totalizando 16 estirpes bacterianas (23,88% do total de estirpes isoladas) (Figura 6). Esse resultado corrobora com Weber (1998) que trabalhando com bananeiras e abacaxizeiros relatou que as menores populações de bactérias diazotróficas foram encontradas em meio LGI para ambas as fruteiras durante o período de frutificação. Ainda segundo o autor, durante o período de frutificação a população bacteriana foi similar nos meios NFb (mesma fonte de carbono do meio JNFb) e LGI, indicando que a diversidade das espécies pode variar ainda em relação ao estágio de desenvolvimento das plantas.

A ocorrência do maior número de bactérias em meio JNFb se comparado ao LGI, pode estar relacionado à fonte de carbono, uma vez que as diferentes fontes de carbono utilizadas na composição dos meios de cultura, possibilitam, geralmente, a ampliação das chances de isolamento bacteriano, pela maior versatilidade nutricional dos meios em promover o crescimento ou maior especificidade das estirpes bacterianas a determinadas fontes de carboidrato.

TABELA 14 Número de células ($\times 10^5$) por grama de peso fresco de bactérias diazotróficas associadas às raízes e solo rizosférico de 30 cultivares de bananeira coletadas no Estado do Acre

| Cultivares | RAÍZ | | SOLO | |
|----------------|------------------|-------|-------|-------|
| | Meios de cultura | | JNFb | LGI |
| | JNFb | LGI | JNFb | LGI |
| Pacovan Ken | 4,5 | 2,5 | 4,5 | 2,0 |
| Prata Local | 110,0 | 110,0 | 2,5 | 4,5 |
| Nanicão | 6,5 | 3,5 | 25,0 | 45,0 |
| Zulu | 110,0 | 110,0 | 4,5 | 25,0 |
| Ambrosia | 4,5 | 2,5 | 4,5 | 45,0 |
| Maravilha | 3,5 | 3,5 | 0,9 | 15,0 |
| Caipira | 1,4 | 0,9 | 2,5 | 4,0 |
| Grande Naine | ND* | 0,4 | 45,0 | 140,0 |
| SH36-40 | 140,0 | 140,0 | 4,5 | 4,0 |
| Terrinha | 4,5 | 0,9 | 0,4 | ND |
| Preciosa | 45,0 | 140,0 | 25,0 | 2,5 |
| Terra Maranhão | 7,5 | 140,0 | 9,5 | 4,5 |
| FHIA 02 | 25,0 | 0,9 | 0,4 | 0,4 |
| Branca Roxa | 2,5 | 45,0 | 0,7 | 0,4 |
| Thap Maeo | 110,0 | 110,0 | 9,5 | 3,0 |
| D' Angola | 45,0 | 2,5 | 25,0 | 2,0 |
| FC06-02 | 140,0 | 3,0 | 20,0 | 45,0 |
| Red Yade | 140,0 | 15,0 | 25,0 | 1,5 |
| Terra | 110,0 | 15,0 | 110,0 | 110,0 |
| PA42-44 | 25,0 | 2,5 | 15,0 | 15,0 |
| Japira | 110,0 | 3,5 | 2,5 | 4,5 |
| Inajá | 140,0 | 2,5 | 9,5 | 9,5 |
| Pelipita | 110,0 | 15,0 | 4,5 | 4,5 |
| Maçã | 110,0 | 20,0 | 2,5 | 4,5 |
| FHIA 21 | 25,0 | 2,5 | 0,7 | 7,5 |
| Buccaner | 140,0 | 140,0 | 4,5 | 2,0 |
| ST12-31 | 20,0 | 1,1 | 9,5 | 45,0 |
| Calypso | 110,0 | 140,0 | 2,5 | 4,5 |
| Pacovan | 110,0 | 4,0 | 9,5 | 4,5 |
| Prata Anã | 110,0 | 15,0 | 9,5 | 45,0 |

*Não detectado (ND).

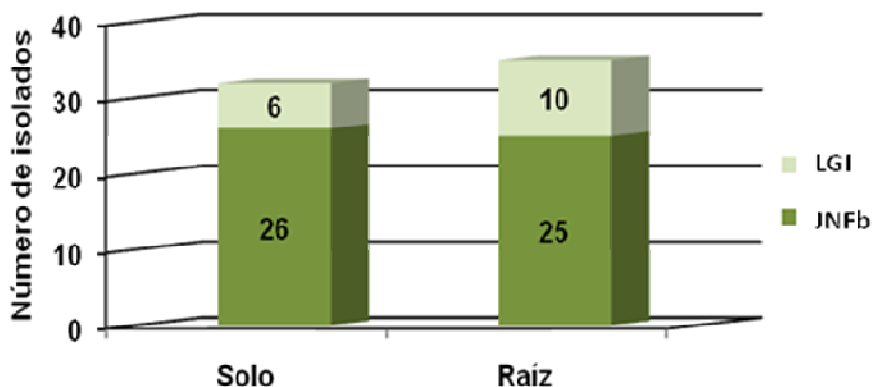


FIGURA 6 Número de isolados obtidos de amostras de raiz e solo rizosférico de cultivares de bananeiras em meios de cultura JNFb e LGI.

Das 30 cultivares de bananeira analisadas, as maiores populações de bactérias isoladas (4 a 6 isolados) foram observadas nas cultivares Nanicão, Zulú, Ambrosia, Preciosa, Terra Maranhão, D'Angola, Maçã e Buccaner, independentemente do meio de cultura utilizado. Apesar do maior número de isolados terem sido obtidos da cultivar D'Angola estes foram isolados apenas das amostras de raízes. Já a cultivar Terra Maranhão apresentou o maior número de isolados oriundos das amostras de solo. Não foi detectada presença de bactérias diazotróficas em cinco das 30 cultivares: Pacovan Ken, PA42-44, ST12-31, Calypso e Pacovan (Figura 7). No entanto, a utilização de plantas em diferentes idades, onde eram desconhecidos os dados de tipos de manejo e informações nutricionais do solo, dificultaram definir melhor qual fator pode ter sido responsável por essa variação populacional de bactérias entre as amostras estudadas.

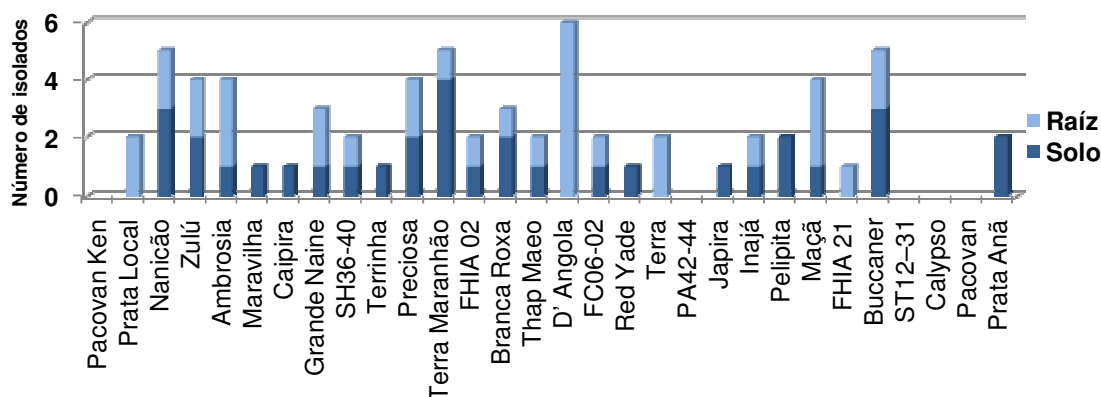


FIGURA 7 Número de isolados obtidos de cultivares de bananeira através dos meios JNFb e LGI em ambos os tipos de amostras (solo e raiz): amostras coletadas em Rio Branco, Acre.

Outro fator observado durante o cultivo foram as películas formadas nos meios semi-sólidos, que de um modo geral, apresentaram-se finas, de coloração branca e localizada aproximadamente 2-3 mm abaixo da superfície, aos sete dias após a inoculação em meio JNFb. Em alguns poucos casos, também se verificou películas mais densas, com coloração creme e atingindo a superfície. Entretanto, para ambos os casos, ocorreu alcalinidade do pH dos meios que pode ser

observado pela alteração na coloração conforme figura 8A. Já em meio LGI as películas formadas eram finas, geralmente apresentando crescimento de isolados de coloração creme, brancos ou amarelados, localizadas geralmente a 2-3 mm abaixo da superfície que devido ao crescimento destas bactérias promoveu a acidificação do meio de cultura caracterizado pela coloração amarelada do meio devido ao indicador de pH azul de brometimol conforme pode ser observado na Figura 8B.

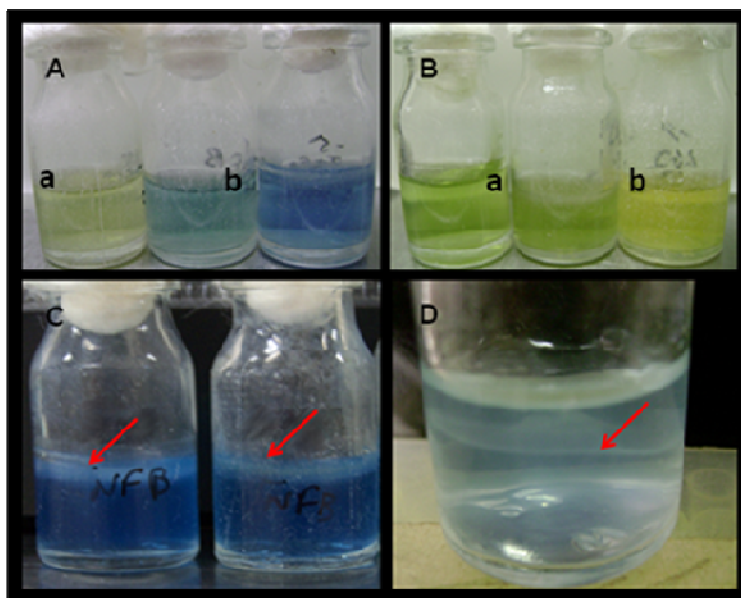


FIGURA 8 Isolados diazotróficos bacterianos de bananeiras inoculados em meios semi-sólidos após sete dias de cultivo; A – Escala gradual da mudança de pH do meio JNFb devido ação das bactérias: a – meio sem alteração de pH, b – meio em transição para pH básico; B – Escala gradual da mudança de pH do meio LGI devido ação das bactérias: a – meio sem alteração de pH, b – meio em transição para pH ácido; C – aspecto da película densa característica do crescimento bacteriano em meio semi-sólido e; D – aspecto da película fina subsuperficial característica.

4.5.2 Caracterização morfo-fisiológica dos isolados

4.5.2.1 Aspecto morfológico das culturas

O dendograma de similaridade construído a partir das características morfológicas das culturas agrupou os 67 isolados de raízes e solo de cultivares de bananeira estudadas neste trabalho (Figuras 9 a 12).

De modo geral, em todos os agrupamentos formados e tipos de meio de cultura utilizados com diferentes fontes de carbono (LGI - sacarose, NFB_{3x} - malato, JMV –manitol e Batata - malato e sacarose) observou-se a formação de dois grande grupos que se subdividiram formando inúmeros pequenos grupos, onde a menor similaridade observada entre eles variou de 63% a 67%.

A partir de 90% de similaridade, independente do tipo de meio utilizado, observou-se a formação do maior número de agrupamentos, onde foi verificado um total de 22 grupos no meio NFB_{3x} seguidos de 19 grupos para os meios LGI e Batata e 17 grupos no meio JMV (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Em meio LGI sólido foram avaliados 67 isolados com 5 padrões de comparação. Destes, apenas 58 isolados e 2 padrões (PRJ55 e CBAmC) foram caracterizados por apresentarem crescimento aparente nesta fonte nutritiva. Dos 19 grupos formados com 90% de similaridade, os que incluíram maior número de isolados foram os grupos G9, G10 e G13 com 7, 8 e 11 isolados respectivamente (Figura 9). Contudo, o agrupamento feito a partir dos dados coletados em meio LGI, revelou que poucos isolados foram semelhantes aos padrões testados, onde somente o agrupamento G1 apresentou 2 isolados similares a 92% do padrão PRJ55 (gênero *Azospirillum*). Ressalte-se, entretanto, que essa distancia de 8% na similaridade devido a algumas características divergentes não torna possível afirmar que estes organismos pertençam ao mesmo gênero do padrão utilizado no estudo sendo necessários, portanto, outros testes confirmatórios.

No meio JMV foram observados 17 grupos com 90% de similaridade, onde 8 destes foram formados por apenas 1 isolado (Figura 10). Os grupos G1, G5, G12 e G13 foram os que apresentaram maior quantidade de isolados em meio JMV. Além disso, no agrupamento G5 observou-se ainda, uma similaridade de 100% entre os isolados, a uma distância de 10 grupos do agrupamento G15, no qual encontrava-se o padrão testado (M130) e onde apenas um único isolado apresentou similaridade a este (Figura 10).

Apesar de poucos isolados serem similares ao padrão neste estudo, Weber (1998) e Cruz et al. (2001) trabalhando com cultivares de bananeira e abacaxizeiro, conseguiram identificar isolados do gênero *Burkholderia* associados a estas culturas.

Em meio NFB_{3x}, os isolados foram agrupados juntamente com os padrões SP7 (*Azospirillum brasilense*) e HCR 54 (*Glucona acetobacter*). Estirpes do gênero *Azospirillum* em meio NFB cresceram formando colônias pequenas e de cor creme

clara. Entretanto, em meio NFB_{3x} elas adquiriram coloração azulada por absorverem o corante azul de brometamol que é adicionado em dosagem três vezes maior neste meio (características observadas). Agrupados ao padrão SP7 estão os isolados 64 e 108 com 100% de similaridade (Figura 11).

Outros quatro agrupamentos também apresentaram 100% de similaridade entre seus isolados, muito embora não tenham sido agrupados a nenhuma estirpe com informações previamente conhecidas, sendo estes os grupos G3, G10, G16 e G18. As principais características similares observadas entre as colônias dos isolados destes grupos foram: cor branca brilhante e transparente com borda inteira e forma circular com elevação do tipo lente de superfície lisa e textura gomosa no G3; cor creme brilhante com borda inteira e forma circular com elevação do tipo lente de superfície lisa e textura gomosa no G10; cor branca opaca e transparente com borda inteira e forma irregular com elevação do tipo plana de superfície lisa e textura seca com colônias medindo aproximadamente 2 mm no G16 e; cor branca opaca e transparente com borda inteira e forma circular com elevação plana de superfície lisa e textura seca no G18.

A exceção para este estudo foi o meio Batata que, por ter várias fontes de carbono, proporcionou o crescimento de todos os padrões utilizados como referência. Verificou-se ainda uma ramificação e formação de 19 agrupamentos com 90% de similaridade, onde a maioria dos isolados apresentaram maior similaridade com os padrões M130 e SP7 (isolados do gênero *Burkholderia* e *Azospirillum*, respectivamente), embora a menor similaridade encontrada tenha sido de cerca de 98% entre alguns isolados e o padrão HCR 54 (gênero *Herbaspirillum*) (Figura 12).

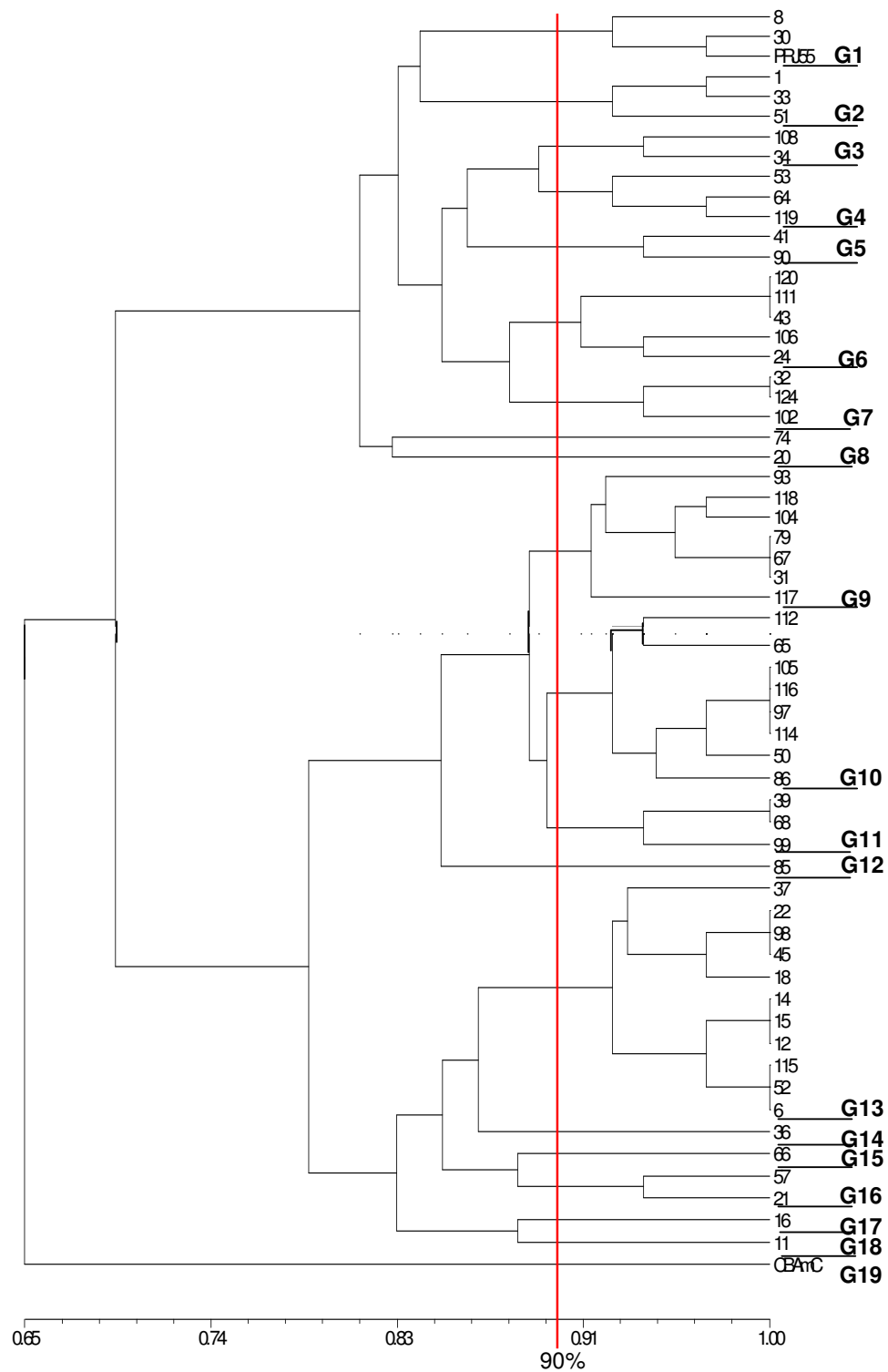


FIGURA 9 Grupos de isolados bacterianos diazotróficos obtidos de bananeiras formados por dendrograma de similaridade para o meio LGI, a partir de dados analisados pelo programa NTSYS, índice SM.

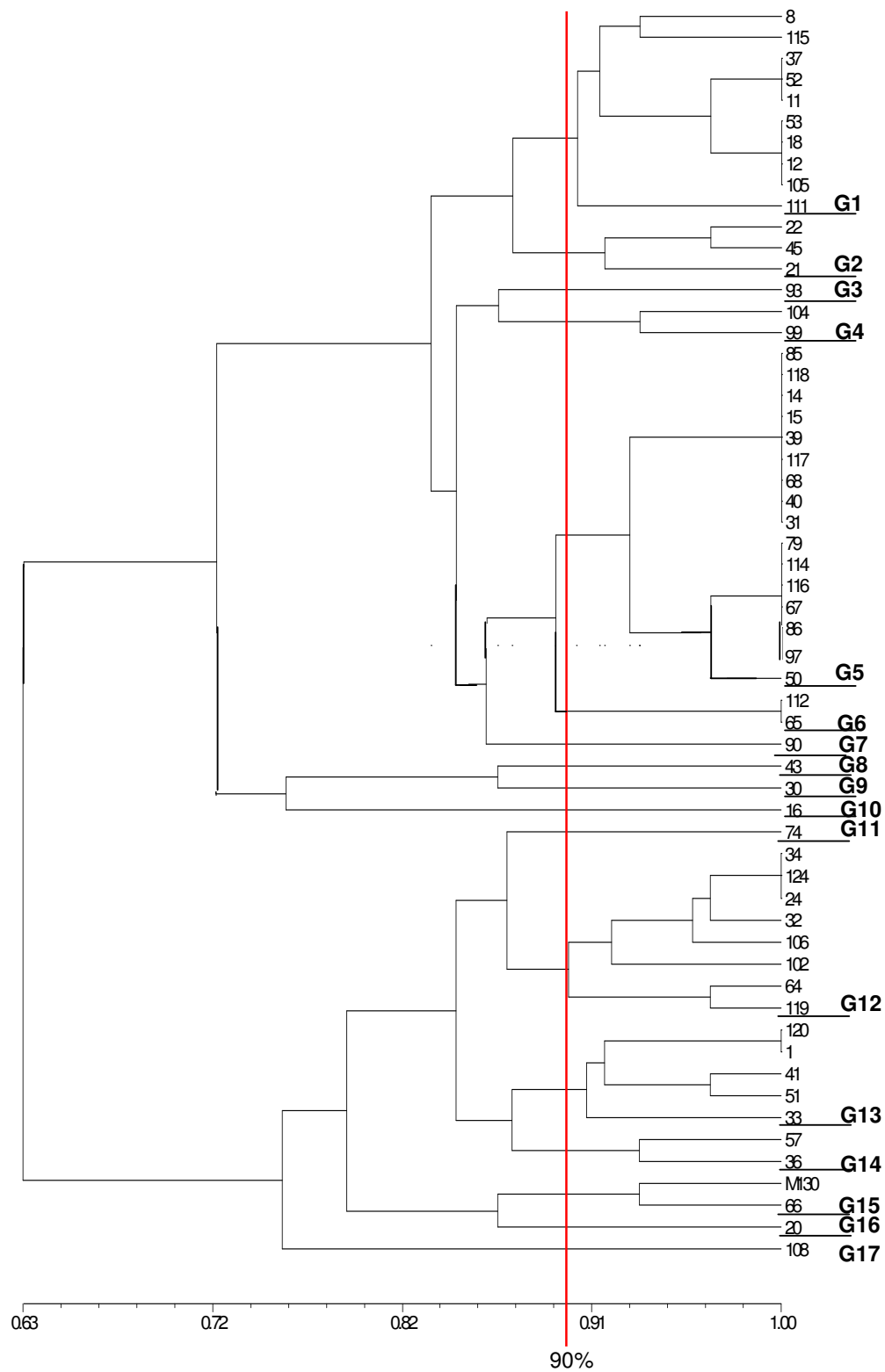


FIGURA 10 Grupos de isolados bacterianos diazotróficos obtidos de bananeiras formados por dendograma de similaridade para o meio JMV a partir de dados analisados pelo programa NTSYS, índice SM.

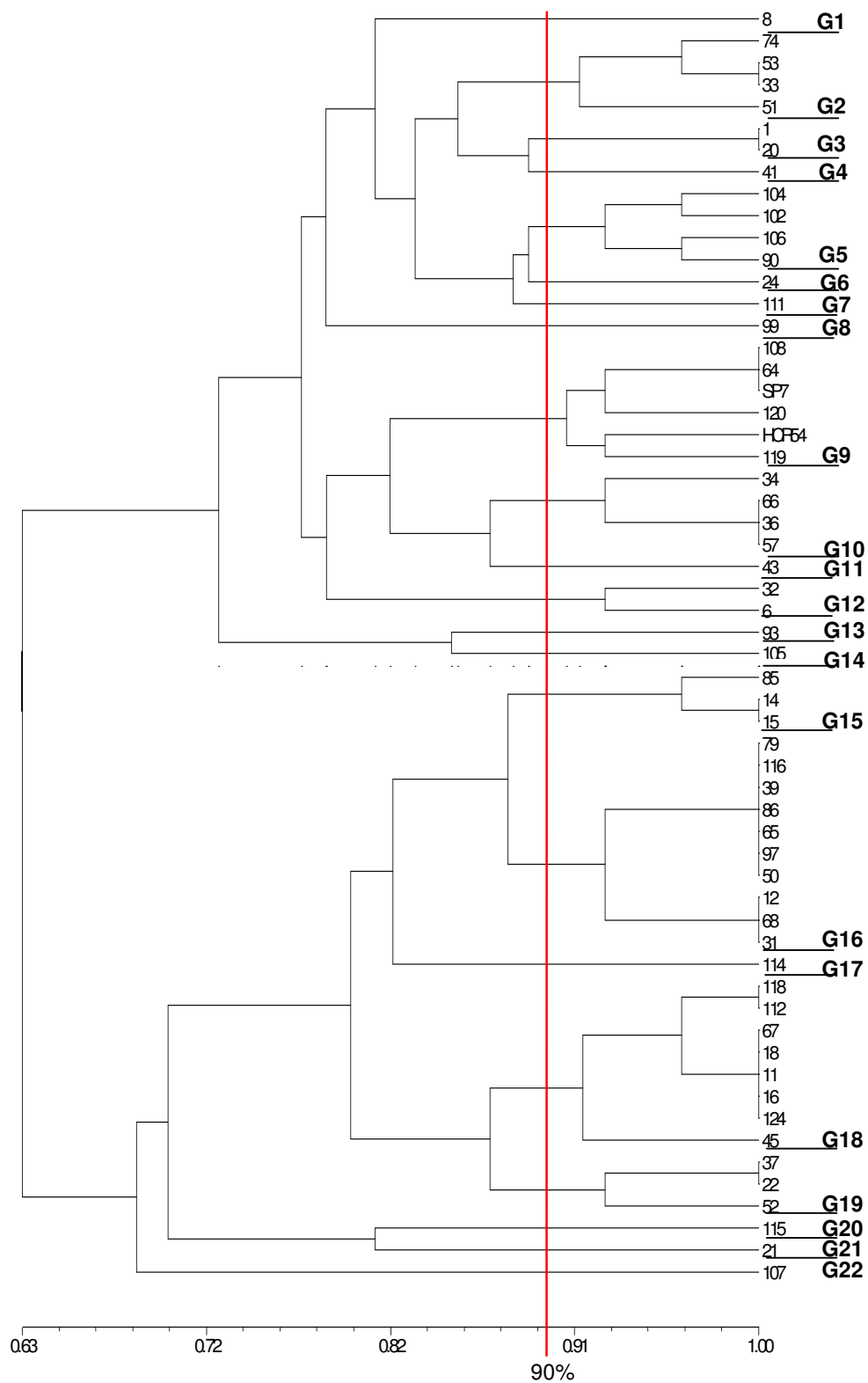


FIGURA 11 Grupos de isolados bacterianos diazotróficos obtidos de bananeiras formados por dendograma de similaridade para meio NFB_{3x} a partir de dados analisados pelo programa NTSYS, índice SM.

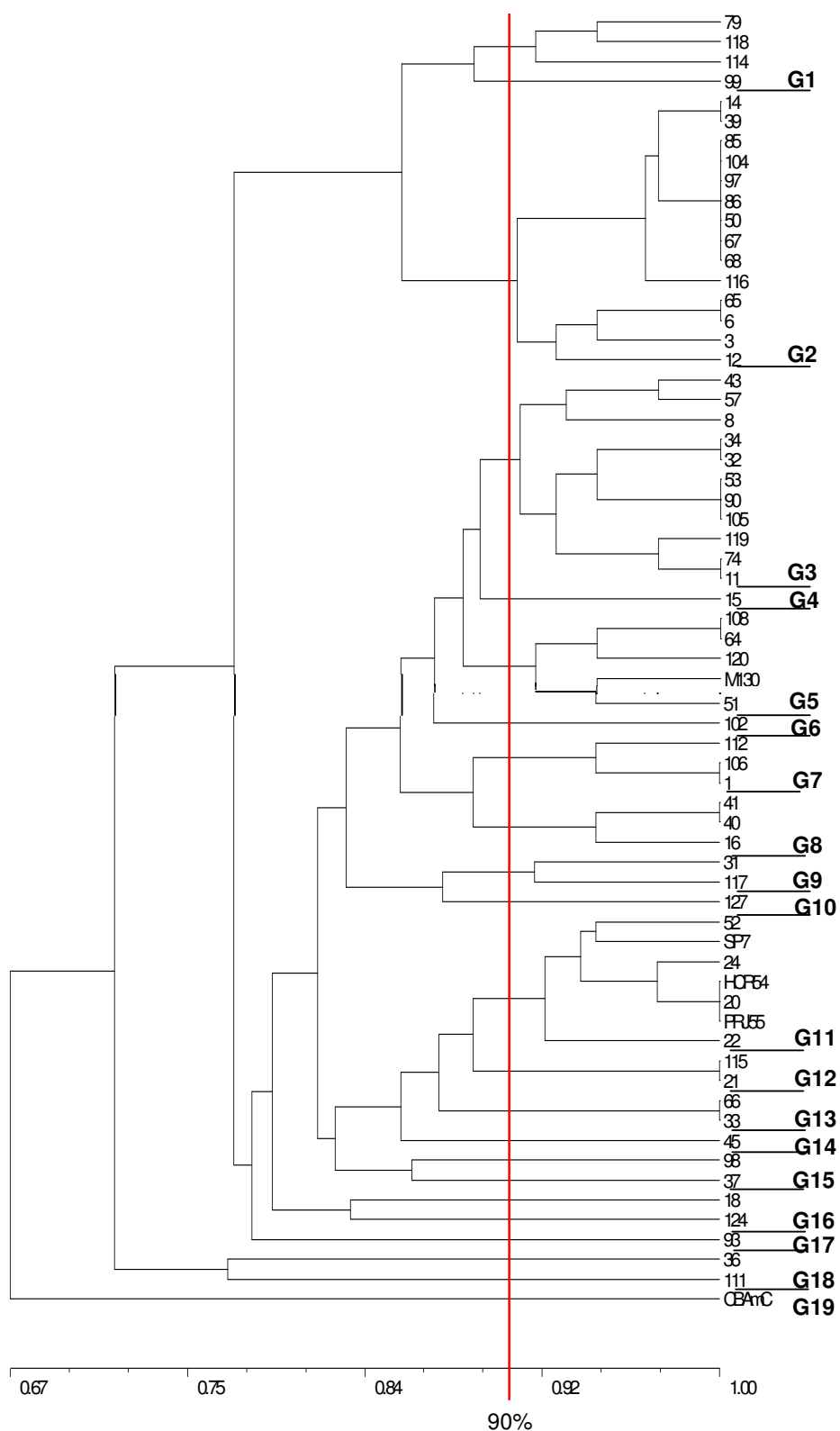


FIGURA 12 Grupos de isolados bacterianos diazotróficos obtidos de bananeiras formados por dendograma de similaridade para meio Batata, a partir de dados analisados pelo programa NTSYS, índice SM.

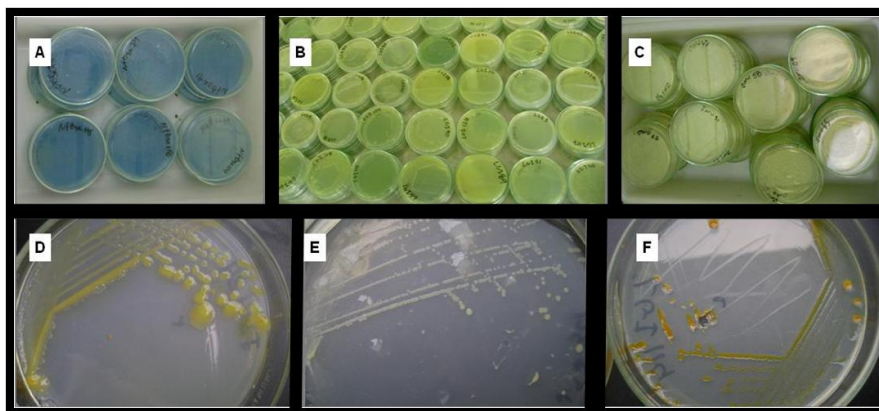


FIGURA 13 Isolados bacterianos diazotróficos crescidos em meio semi-sólido para caracterização morfológica: A - NFB_{3X}; B – LGI; C – JMV e D, E e F: aspecto das colônias puras de três tipos distintos de isolados de bananeira.

4.5.2.1 Aspectos fisiológicos das culturas

4.5.2.1.1 Produção de Ácido Indolacético (AIA)

A promoção do crescimento de plantas associadas a microrganismos diazotróficos esteve durante muito tempo relacionada a sua capacidade de colonizar e fixar nitrogênio atmosférico no interior dos tecidos. No entanto, mais recentemente tem-se considerado a produção de hormônios tais como o ácido-3-indol-acético (AIA), gibberelinas e citocininas, e muitos estudos tem revelado que muitos microrganismos diazotróficos, tais como o *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* associadas a diversas culturas como Cana-de-açúcar (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988), batata-doce, capim-elefante (DÖBEREINER et al., 1993), café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997), abacaxi (TAPIA-HERNANDEZ et al., 2000) com capacidade de produzir hormônios, em especial AIA, e tem evidenciado seus efeitos positivos na promoção do crescimento vegetal, na sobrevivência das plântulas, e no aumento do comprimento e volume radicular (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; REIS et al., 1994; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999, 2002; OLIVEIRA et al., 2002; MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003).

Para este estudo, a produção de auxinas foi avaliada através do método colorimétrico por ser a forma mais simples e rápida de detecção deste hormônio. De modo geral, pode-se observar que todos os 67 isolados testados foram capazes de produzir AIA (Tabela 15).

De acordo com Loper e Schorth (1986), cerca de 80% das espécies de bactérias isoladas da rizosfera possuem a capacidade de produzir AIA. Ainda segundo Rodrigues et al. (2007), muitos organismos associados as plantas são capazes de sintetizar hormônios, principalmente auxinas. Estes são chamados de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e podem afetar o desenvolvimento das plantas de vários modos, por produzirem substâncias que atuam diretamente sobre o vegetal, com diversos efeitos sobre o metabolismo e crescimento das plantas, podendo ainda, estimular o crescimento radicular e, conseqüentemente, melhorando a absorção de água e minerais (ANTÔNIO et al., 2007).

Os isolados 18 e 66 foram os que apresentaram maior produção de AIA, numa concentração de 4,03 mM/mL. Este resultado corrobora Rodrigues et al. (2007) que selecionando mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* observaram a produção de até 592 μ M de AIA. Antonio et al. (2007) trabalhando com 28 isolados de cana-de-açúcar obtiveram resultados que variaram de 0,66 a 11,77 μ M/mL de AIA.

Verificou-se que 75% dos isolados possuíram capacidade de produção de AIA. Os valores das concentrações de auxina entre os 67 isolados avaliados variou entre 3,99 a 4,03 mM/mL, valores estatisticamente superior aos das estirpes padrão utilizadas neste estudo (Tabela 15).

TABELA 15 Atividade de produção de Ácido Indolacético por bactérias diazotróficas isoladas de bananeiras e estirpes de referência

| Isolados | AIA mM/mL* | Isolados | AIA mM/mL* | Isolados | AIA mM/mL* |
|---------------------------|------------|----------|------------|----------|------------|
| 1 | 4,00d | 41 | 4,01c | 99 | 4,01c |
| 3 | 4,00d | 43 | 4,00d | 102 | 3,99e |
| 6 | 4,01c | 45 | 4,00d | 104 | 4,02b |
| 7 | 4,01c | 50 | 4,02b | 105 | 4,01c |
| 8 | 4,00d | 51 | 4,00d | 106 | 4,00d |
| 11 | 4,01c | 52 | 3,99e | 107 | 4,02b |
| 12 | 4,01c | 53 | 3,99e | 108 | 4,00d |
| 14 | 3,99e | HCR54 | 4,00d | 111 | 4,01c |
| 15 | 4,00d | PRJ55 | NA** | 112 | 4,01c |
| 16 | 4,00d | 57 | 4,00d | 114 | 4,00d |
| 18 | 4,03a | 64 | 4,00d | 115 | 3,99e |
| 20 | 4,00d | 65 | 4,00d | 116 | 3,99e |
| 21 | 4,00d | 66 | 4,03a | 117 | 4,00d |
| 22 | 4,00d | 67 | 3,99e | 117 (1)A | 4,00d |
| 24 | 3,99e | 68 | 4,00d | 118 | 4,00d |
| 30 | 4,00d | 74 | 4,00d | 118 A | 4,00d |
| 31 | 4,00d | 79 | 4,00d | 119 | 4,00d |
| 32 | 3,99e | 85 | 3,99e | 120 | 4,00d |
| 33 | 4,00d | 86 | 4,02b | 124 | 4,00d |
| 34 | 3,99e | CBAmC | 3,99e | 126 A | 3,99e |
| 36 | 4,00d | 90 | 4,01c | 127 | 4,00d |
| 37 | 4,01c | 93 | 4,00d | M 130 | 3,99e |
| 38 | 4,00d | 93 A | 3,99e | 15 (1) A | 4,00d |
| 39 | 4,01c | 97 | 3,99e | SP7 | 4,00d |
| 40 | 4,00d | 98 | 3,99e | - | - |
| Média geral = 4,00 | | | | | |
| CV = 0,09% | | | | | |

* n = 3; **NA: Não avaliado. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliado diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott Knott.

4.5.2.1.2 Redução de acetileno (ARA)

A análise da atividade de redução de acetileno (ARA) é uma ferramenta poderosa na detecção e quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas, não só pela sua simplicidade como pelo baixo custo e alta sensibilidade (HARDY et al., 1968).

A leitura de redução de acetileno foi realizada quando a película formada atingiu a superfície, após sete dias de incubação à 30 °C. Dos 67 isolados apenas três não tiveram seus valores de ARA definidos por não terem apresentado formação de película sobre o meio de cultura.

Todos os 64 isolados avaliados e as estirpes padrões utilizadas apresentaram capacidade de redução de acetileno pela técnica de ARA em meios de cultura LGI e

JNFb. Observou-se ainda, uma grande variabilidade na atividade da nitrogenase entre os isolados variando entre 0,16 a 641,27 nm de etileno o que parece ser algo comum entre isolados segundo Perin (2007). Estes resultados corrobora com Reis Junior (2002) que também relatou grande variabilidade entre isolados do gênero *Azospirillum* de pastagens de *Brachiaria* spp. e ainda, Rodrigues (2004), com isolados de *A. amazonense* obtidos de plantas de arroz.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre 42,2% dos isolados e os padrões HCR54, M130 e SP7 que apresentaram valores de 231,36, 282,55 e 265,23 nm de etileno reduzido, respectivamente (Tabela 16).

Isolados como o 3, 18, 20, 31, 38, 51, 74 e 118 apresentaram valores inferiores a 2 nm de acetileno, e apesar de serem valores considerados baixos, também foram observados por Rodrigues et al. (2006) entre estirpes do gênero *Herbaspirillum* isolados de plantas de arroz. Isolados do gênero *Burkholderia* obtidos de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil e Austrália (BODDEY, 2002) e milho e café cultivados no México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) também apresentaram grandes variações nos valores de acetileno.

Alguns isolados apresentaram valores altos de redução do acetileno. No entanto, os mesmos valores obtidos em culturas puras podem não serem produzidos pelas bactérias quando no interior das plantas, já que outros fatores podem estar influenciando nessa reação, como por exemplo, o número de bactérias colonizando o interior das plantas e a qualidade nutricional do solo. Esses fatores foram comprovados por Han e New (1998), que em seus trabalhos, demonstraram que determinadas estirpes não apresentaram o mesmo desempenho de alto potencial de redução de ARA em culturas puras quando estas foram inoculadas em raízes de trigo. O mesmo ocorreu quando estirpes altamente promissoras na redução de acetileno foram inoculadas em explantes micropropagados de bananeira da cv. Preciosa em trabalhos realizados na Embrapa Acre por Oliveira e Scherwinski-Pereira em 2006 (dados ainda não publicados).

TABELA 16 Atividade de redução de acetileno de bactérias diazotróficas isoladas de bananeiras e estirpes de referência, após sete dias de incubação à 30 °C

| Isolados | ARA moles C ₂ H ₄ /h/cultura (nm)* | Isolados | ARA moles C ₂ H ₄ /h/cultura (nm) | Isolados | ARA moles C ₂ H ₄ /h/cultura (nm) |
|-----------------------------|--|----------|---|-----------|---|
| 1 | 576,16a | 41 | 274,28a | 99 | 119,18b |
| 3 | 1,41 c | 43 | 11,99 c | 102 | 151,75b |
| 6 | 177,74b | 45 | 236,77a | 104 | 215,59a |
| 7 | 328,87a | 50 | 490,30a | 105 | 372,25a |
| 8 | 307,39a | 51 | 0,53 c | 106 | 159,54b |
| 11 | 433,11a | 52 | 602,41a | 107 | 202,74b |
| 12 | 20,82 b | 53 | 85,73 b | 108 | 146,95b |
| 14 | 10,47 c | HCR54 | 231,36a | 111 | 203,42a |
| 15 | 3,37 c | PRJ55 | NA** | 112 | 90,58b |
| 16 | 543,29a | 57 | 169,80b | 114 | 433,50a |
| 18 | 0,45 c | 64 | 114,40b | 115 | 152,44b |
| 20 | 0,42 c | 65 | 116,44b | 116 | 252,60a |
| 21 | 315,75a | 66 | 40,85 b | 117 | 291,86a |
| 22 | 2,43 c | 67 | 117,94b | 117 (1) A | 349,88a |
| 24 | 3,06 c | 68 | 148,05b | 118 | 0,31 c |
| 30 | NA** | 74 | 0,19 c | 118 A | 51,48b |
| 31 | 0,65 c | 79 | 101,96b | 119 | 231,88a |
| 32 | 221,65a | 85 | 70,58 b | 120 | 159,11b |
| 33 | 334,67a | 86 | 120,80b | 124 | 566,81a |
| 34 | 6,32 c | CBAmC | 36,86 b | 126 A | 292,02a |
| 36 | 11,60 c | 90 | 141,64b | 127 | 194,46a |
| 37 | 116,19b | 93 | NA** | M 130 | 282,55a |
| 38 | 0,16 c | 93 A | 321,24a | 15 (1) A | 641,27a |
| 39 | 561,08a | 97 | 181,33b | SP7 | 265,23a |
| 40 | 146,32b | 98 | 215,68a | - | - |
| Média geral = 194,11 | | | | | |
| CV (%) = 49,89 | | | | | |

*n = 6. **NA: Não Avaliado. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliado diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott Knott.

5 CONCLUSÕES

- Partindo-se de gemas caulinares de bananeira das cultivares Preciosa, Japira, Maravilha e Pacovan Ken o maior número de brotações acumuladas *in vitro* no decorrer de sucessivos subcultivos é obtido na concentração de 4 mg.L⁻¹ de BAP;
- Ápices florais constituem uma alternativa viável como fonte de explante para a propagação *in vitro* de cultivares de bananeira FHIA 02 e Preciosa;
- As melhores taxas de multiplicação são observadas a partir do terceiro subcultivo para todas as cultivares de bananeira testadas;
- Perdas por contaminação bacteriana são maiores quando se usa ápices florais em comparação ao uso de ápices caulinares de banana durante o cultivo *in vitro*;
- A utilização de tubetes de 115 cm³ e 180 cm³ não influencia na sobrevivência (> 95%) de mudas de bananeira micropropagadas cv. Grande Naine na fase de aclimatização nas condições da Amazônia Sul-Ocidental;
- Plantas de bananeira micropropagadas cultivadas em tubetes de 180 cm³ de capacidade apresentam maior crescimento em altura, diâmetro e massa durante a aclimatização das mudas em viveiro;
- O substrato composto de terra de encosta, casca de arroz carbonizada e esterco bovino (3:1:1 v/v), devidamente esterilizado, pode ser utilizado na aclimatização promovendo maior crescimento de mudas de bananeira;
- Foram identificadas duas espécies de bactérias endofíticas contaminantes durante a micropropagação de bananeira: *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas hydrophila*;
- Os antibióticos Ampicilina e sulfonamida apresentam menor eficiência no controle de *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas hydrophila* *in vitro*;
- O crescimento bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas hydrophila*, contaminantes da cultura da bananeira *in vitro*, é inibido com o uso do antibiótico Vancomicina a partir da concentração de 512 mg.L⁻¹;
- A taxa de multiplicação dos explantes de banana da cv. Preciosa não é afetada pela adição dos antibióticos Vancomicina e Ácido Nalidíxico ao meio de cultura MS, até a concentração de 1.024 mg.L⁻¹;

- Foram obtidos 67 isolados com características de FBN associados ao solo e raízes de genótipos da coleção de trabalho de bananeira da Embrapa Acre;
- As características morfológicas das bactérias dizotróficas isoladas de bananeiras permitiu o agrupamento dos isolados em grupos menores facilitando assim futuros testes de identificação;
- Detectou-se produção de ácido indolacético (AIA) em todos os 67 isolados obtidos de genótipos de bananeiras, em concentrações que variaram de 3,99 a 4,03 mM/mL.
- Foi evidenciada a presença de microrganismos com potencial de fixação de nitrogênio isolados de raízes e solo de 30 genótipos de bananeira da coleção de trabalho da Embrapa Acre.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muito embora os estudos de micropropagação possam auxiliar de forma fundamental na obtenção e manutenção de espécies de alta qualidade genética, estes trabalhos no Estado do Acre ainda são recentes e, principalmente no que se refere a cultura da bananeira ainda há muito a ser feito. A micropropagação pode contribuir fundamentalmente por proporcionar uma produção acelerada de mudas de alta qualidade genética em curto espaço de tempo e espaço físico e, ainda, possibilitar o uso de propágulos alternativos como as inflorescências para a produção de mudas.

No entanto, duas questões são sempre citadas como preocupantes quando se trata da aplicação da técnica: a não acessibilidade dos produtores da região ao método e o elevado custo destas mudas para o setor local. Apesar disso, são inumeráveis e vantajosos os benefícios da utilização de mudas micropropagadas, já que as mudas obtidas por meio desta técnica, podem ainda promover: alta produtividade, tolerância, uniformidade na produção e colheita, além de menor impacto ambiental causado pela redução da aplicação de defensivos agrícolas. Pensando nisso, uma biofábrica está sendo montada na Embrapa Acre em parceria com o governo do Estado, visando a produção massal de mudas de bananeiras resistentes a doenças e selecionadas para plantios na região para serem distribuídas aos produtores locais. Essa iniciativa pode não apenas promover o acesso facilitado do produtor com um produto diferenciado, como também, proporcionar a fixação do homem no campo e, ainda, reestabelecer bananais, perdidos devido às principais doenças que afetam a cultura.

Além disso, estudos visando substituição do Ágar, o mais caro componente do meio de cultura, por geleificantes alternativos e mais baratos já foi publicado por Costa et al. (2007) em trabalhos realizados nas condições locais, onde foram obtidos resultados promissores que podem contribuir para a redução do custo de produção destas mudas.

As técnicas biotecnológicas utilizadas neste trabalho permitiram ainda, avaliar a interação entre estudos de micropropagação de genótipos e a seleção de isolados diazotróficos associados a esta cultura, e que possuíam capacidade de fixar N_2 atmosférico e produzir hormônios promotores de crescimento. Muito embora, seja importante salientar que muito ainda se tem a fazer até a identificação destes

isolados, estes microrganismos apresentam um grande potencial na produção de hormônios e fixação de N_2 , podendo servir para futuros estudos de produção de inoculantes bacterianos.

O uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de N_2 e promotoras de crescimento podem representar, aos produtores locais, uma alternativa de insumo capaz de reduzir custos com adubos nitrogenados, um dos mais caros e exigentes da cultura. E ainda, no que se refere a micropropagação, esses inoculantes bacterianos podem ser estudados conjuntamente com os substratos selecionados visando verificar sua contribuição no aumento do crescimento das mudas em viveiro durante a fase de aclimatização e, conseqüentemente, acelerar o processo de adaptação das mesmas.

O conhecimento sobre as características fisiológicas dos isolados e que aqui foram discutidos também podem servir de suporte para estudos posteriores, uma vez que estudos desses microrganismos com bananeira são incipientes. Por isso, é imprescindível que se conheça melhor a interação planta e bactéria, e como estes compostos são sintetizados por algumas das espécies de diazotróficas, bem como seus efeitos na promoção do crescimento, ajudando a compreender melhor os mecanismos fisiológicos que atuam na promoção do crescimento das plantas devido essa interação.

Assim, a continuidade dos estudos com os isolados aqui obtidos, até sua identificação e uso, pode ser de grande valia para a comunidade científica, pois novos organismos podem estar sendo descobertos, uma vez que estudos de diversidade diazotróficas em fruteiras são muito escassos, ressaltando-se o ineditismo deste trabalho em solos acreanos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. L. de; SANTOS, G. de A.; DE-POLLI, H. **Manual de adubação para o Estado do Rio de Janeiro**. Itaguaí:Universidade Rural, 1988. 179p. (Série Ciências Agrárias, 2).

ALVARES, M. do C.; CALDAS, L. S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 415-420, 2002.

ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J Vasc Br**, v. 3, n. 2, 2004.

ANTONIO, C. S.; SANTOS, C. L. R.; HIPOLITO, G. S.; PEREIRA, W.; PERIN, L.; REIS, V. M. Avaliação da Capacidade de Produção de AIA por Bactérias Diazotróficas Isoladas em Associação com Cana-de-Açúcar. In: XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, CONQUISTAS E DESAFIOS DA CIÊNCIA DO SOLO BRASILEIRA, 2007, Gramado RS. **XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2007.

ARAÚJO, L. H. A.; CARVALHO, J. M. F. C. de. **Técnicas de cultivo *in vitro***. Areia: UFPB/ Centro de Ciências Agrárias, 2005. (Programa de Pós-Graduação).

BAKRY, F.; ROSSIGNOL, L. Analyses des capacités de callogénés et d'organogénés obtenues à partir de différents tissus de bananiers (*Musa spp.* Musáceas). **Fruits**, Paris, v. 40, n. 11, p. 697-698, 1985.

BAKKER, A. W.; SHIPPER, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* ssp. Mediated plant growth stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 451-457, 1987.

BALAKRISHNAMURTHY, G.; SREE RANGASAMY, S. R. Regeneration of banana plantlet from *in vitro* culture of floral apices. **Current Science**, Bangalore, v. 57, n.5, p. 270-272, 1988.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOIS, R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BFN with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, p.911-922, 1997.

BALDANI, V. L. D. **Efeitos da inoculação de *Herbasirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Rio de Janeiro, 1996. 238p. (Tese de doutorado de Licenciatura em ciencias agrícolas) –Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica : UFRRJ, 1996.

BALDANI, V. L. D. ; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology e Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crants). **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 34, n. 7, 1999.

BARBOZA, S. B. S. C. ; GRACIANO-RIBEIRO, D. ; TEIXEIRA, J. B. ; PORTES, T. A. ; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.

BARROS, M. A. B. ; LOPES, G. M. B. ; WANDERLEY, M. de B. Cadeia produtiva da banana : consumo, comercialização e produção no Estado de Pernambuco. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 39, n. 1, 2008.

BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, v. 4, p. 351-354, 1985.

BELLÉ, S.; KAMPF, A. N. Utilização de casca de arroz carbonizada como condicionador hortícola para um solo orgânico. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 29, n. 8, p. 1265-1271, 1994.

BENCHIMOL, R.; CHU, E. Y.; YUITIMUTO, R.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência resposta morfológica. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1343-1348, 2000.

BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacea* MC17 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 225-231, 1998.

BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M. V.; DEL-GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, Reading, Grã-Bretanha, v.140, p.1069-1077, 1994.

BEZERRA, F. C.; ROSA, M. F. **Utilização do pó da casca de coco verde como substrato para produção de mudas de alface**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002, 4 p. (Comunicado Técnico, 71).

BIASI, L. A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacaxizeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p. 251-256, 1995.

BODDEY, L. H. **Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, isolada de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil**. 2002. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica : UFRRJ, 2002.

BOMFIM, G. V. do. **Efeitos de lâminas e freqüências de irrigação e tipos e volumes de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental**. 2006. 167 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G.; SOUZA, L. da S. Solos, nutrição e adubação. In: Alves, E. J. et al... (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 1 ed. Brasília: Embrapa/SPI, 1997, v., p. 585.

BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L. de; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 23, n. 2, p.25-219, 2001.

BRANDI, G.; SISTI, M.; SCHIAVANO, G. F.; SALVAGGIO, L.; ALBANO, A. Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. **J Appl Bacteriol**, v. 81, p. 439-440, 1996.

BRANZANTI, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S.; PREDIERI, S.; BARALDI, R. Influence of artificial substrat on mycorrhization of micropropagated fruit

trees in a horticultural system. In: READ, D. J.; LEWIS, D. H.; FITTER, A. H.; ALEXANDER, I. J. (Eds.). **Mycorrhizas in ecosystems**. Oxford: CAB, 1992. p. 373-374.

BRASIL, M. S. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras nativas e exóticas cultivadas no Pantanal da Nhecolândia**. 2001. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001.

BRASIL, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Evolução do mercado mundial de frutas**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/menu_lateral/agricultura_pecuaria/estudos_publicacoes/estudo_mercado_frutas/capitulo_3.PDF>. Acesso em: 25 fevereiro 2006 às 14h.

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

CASSELLS, A. C.; TAHMATSIDOU, V. The influence of local plant growth conditions on non fatidios bacterial contamination of meristem tips of *Hydrangea* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**, Dordrecht, v. 47, p. 15-26, 1996.

CALVETE, E. O. Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv. Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). **Substrato para plantas - a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, p. 257-264, 2000.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.

COJHO, E. H.; REIS, V. M.; SCHENBERG, A. C. C.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiol. Letters** 106:341-346, 1993.

COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; PASQUAL, M. CASTRO, E. M. de; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2009.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; SANTOS, A. M. dos; CASTRO, E. M. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Modificações na anatomia foliar de bananeiras durante o processo de micropropagação. **Interciencia**, v. 33, p. 663-667, 2008.

COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n.1, p. 41-46, 2007.

COSTA, F. H. da S. **Micropropagação da bananeira: características fitotécnicas, fisiológicas e anatômicas**. 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, 2007.

COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grande Naine (AAA). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 28, p. 280-283, 2006.

CRONAUER-MITRA, S. S.; KRIKORIAN, A. D. Determinate floral buds of plantain (*Musa* AAB) as a site of adventitious shoot formation. **Annals of Botany**, London, v. 61, n. 4, p. 507-512, 1988.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa* spp.) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DANTAS, A. C. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Descontaminação e efeito do fungicida benomil sobre a multiplicação do porta-enxerto de macieira M. 9. **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 245-252, 2000.

DEBIASI, C.; ZAFFARI, G. R.; SALERNO, A. R.; GUERRA, M. P. Correlação entre a capacidade proliferativa *in vitro* e a dominância apical *in vivo* da bananeira cvs. Grande Naine e Nanicão. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, p. 597-600, 2002.

DHED'A, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B.; VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). **Fruits**, Paris, v. 46, n. 2, p. 125-135, 1991.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. E BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas endofíticas em plantas não leguminosas**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; Brasília, D. F.: EMBRAPA-SPI, 60 p., 1995.

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; PAULA, M. A. de; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. (Ed.) **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1993. p. 671-676.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciênc. e Cult.**, São Paulo, V. 44, P. 310-313, 1992.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. *Estudos Avançados*, v. 4, n. 8, p. 144-152, 1990.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madson: Springer – Verlag, 1987, 155 p.

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

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado: propagação sexuada e assexuada** – resultados de pesquisa. 2 ed. Pelotas, Editora UFPel, 1995, 179 p.

FAO, 2007. **Food and agriculture organization of the united nations**. Disponível em: < www.faostat.fao.org > Acesso em: 03 de janeiro 2009 às 20h17.

FASOLIN, L. H.; ALMEIDA, G. C. de; CASTANHO, P. S.; NETTO-OLIVEIRA, E. R. Biscoitos produzidos com farinha de banana: avaliações química, física e sensorial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 524-529, 2007.

FERREIRA, E. Banana se firma no gosto do Acreano. **Agência de Notícias do Acre**. Disponível em: <www.noticiasdoacre.gov.br>. Acesso em: 15 de outubro 2008 às 16h10.

FLORES, P. S. **Propagação *in vitro* e *in vivo* de *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae)**. 2003, 154f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2003.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1: the technology**. 2 ed. Edington: Exegetics, 1993. 786 p.

GHAI, S. K.; THOMAS, G. V. Occurrence of *Azospirillum* spp. in coconut-based farming systems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 114, p. 235-241, 1989.

GOLCMAN, B.; GOLCMAN, R.; GONZALEZ, M. de A.; TUMA, S. R.; SCHALKA, S. Eficácia e segurança do cefprozil e cefaclor nas infecções cutâneas leves e moderadas. **Anais brasileiro de Dermatologia**. Rio de Janeiro. v. 72, n. 1, p. 79-82, 1997.

GOMES, E. W. F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. S.; CAMARA, T. R. Variedades de bananeira tratadas com água salinizada em fase inicial de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, (Suplemento), p. 31-36, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, p.183-260, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, EMBRAPA-CNPH, p. 99-169, 1990.

GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 28, p. 355-361, 2004.

HABIBA, U.; REZA, S.; SAHA, M. L; KHAN, M. R; HADIUZZAMAN, S. Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of banana: identification and prevention. **Plant Tiss Cult**, v. 12, p. 117-124, 2002.

HALDEMAN, J. H., THOMAS, R. L.; MCKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **HortScience**, v. 22, n. 2, p. 306-307, 1987.

HAN, S. OO; NEW, P. B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 193-201, 1998.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. **Plant and physiology**, Rockville, v. 43, p. 1185-1207, 1968.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T. Plant propagation: principles and practices. 6 ed. New Jersey: **Prentice Hall**, 1997. 700 p.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HERMAN E. B. Recent advances in plant tissue culture viii. Microbial contaminants in plant tissue cultures: solutions and opportunities 1996–2003. **Agritech Consultants, Inc.**, Shrub Oak, USA, 2004.

IBGE, 2006. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Estudo da produção agrícola, lavouras permanentes: Banana. Disponível em: <www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php>. Acesso em: 12 de outubro de 2008 às 17h11.

ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; LAHAV, C. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 71-88, 1991.

JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPERANZA, A. M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

JAMES, E. K. GYANESHWAR, P.; BARRAQUIO, W. L.; MATHAN, N.; LADHA, J.K. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: de BRUIJIN, F. J.; LADHA, J. K. (eds), Proceedings the third meeting of the rice BNF working group. **Internacional Rice Research institute**, Manila, p. 119-123, 1999.

JESUS, O. N. **Caracterização morfológica e molecular de cultivares de bananeira**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

JONER, E. J.; JAKOBSEN, I. Enhanced growth of external VA mycorrhizal hyphae in soil amended with straw. In: READ, D. J.; LEWIS, D. H.; FITTER, A. H.; ALEXANDER, I. J. (Eds). **Mycorrhizas in ecosystems**. Oxford:CAB, 1992, 387 p.

KENNEDY, I. R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of assymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 41, p. 447-457, 2001.

KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G. W.; WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance – historical precedence. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 136-137, 1997.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 7, p. 39-44, 1989.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 139-144, 1992.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; BYOUNG, R. J. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

LEGGATT, I. V.; WAITES, W. M.; LEIFERT, C.; NICHOLAS, J. Characterization of micro organisms isolated from plants during micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 93-102, 1988.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In vitro cell Dev Biol Plant**, v. 37, p. 133–138, 2001.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITES, W. M. Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 153-160, 1992.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRINGHT, S. M.; WAITES, B.; CHEYNE, V. A.; WAITES, W. M. Elimination of *Lactobacillus plantum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Jornal of Applied Bacteriology**, London, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requeriment for microbiological quality assurance. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 52, n. 1-2, p. 83-88, 1998.

LEIFERT, C.; WAITES, W. M. NICHOLAS, J. R. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 67, p. 353-361, 1989.

LEMOS, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.

LESCHER, G. Y.; FROELICH, E. J.; GRUETT, M. D.; BAILEY, J. H.; BRUNDAGE, R. P. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapy agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 5, p. 1063-1068, 1962.

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

LONG, R. D.; CURTIN, T. F.; CASSELLS, A. C. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal cultures. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 83-91, 1988.

LOPER, J. E.; SCHROTH, M. N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopatology**, v. 76, p. 386-389, 1986.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anuais da academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MALIK, K. A.; BILAL, R.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MIRSA, M. S.; ALI, M. S. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 37-44, 1997.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; Mc KEE, R. A. Princípios da Biotecnologia em Plantas – uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. 1994, 344 p.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA K. R. dos S.; BALDANI, J. I. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**. Embrapa Agrobiologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>> Acesso em: 22 de janeiro de 2008 às 15h07.

MATOS, R. M. B.; SILVA, E. M. R. da; BRASIL, F. da C. Micorriza arbuscular e matéria orgânica na aclimatização de mudas de bananeira, cultivar Nanicão. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 3, p. 277- 283, 2002.

MATSSURA, F. C. A. U.; COSTA, J. I. P. da; FOLEGATTI, M. I. S. Marketing de banana: preferências do consumidor quanto aos atributos de qualidade dos frutos. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, p. 48-52, 2004.

MENDES, B. M. J.; MENDES, F. J.; TULMANN NETO, A.; DEMÉTRIO, C. G. B.; PUSKE, O. R. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 31, n. 12, p. 863-867, 1996.

MINARINI, L. A. da R. **Estudo dos mecanismos de resistência às quilononas em enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros**. São Paulo, 2008. 128f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.

MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G. de; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras. v. 27, n. 5, p. 1002-1006, 2003.

MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G. de; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. da. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**, 2 edição revisada e ampliada, Lavras, editora UFLA, 2006, 279 p.

MOREIRA, R. S. **Banana: Teoria e Prática de Cultivo**. Campinas, Fundação Cargill, 1987.

MUÑOZ ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Glucnacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, New York, v. 46, p. 454-464, 2003.

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

MUSSON, G.; McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 5, p. 407-416, 1995.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of nitrogen fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. From Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of soils**, Berlin, v. 29 p. 157-164, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 137-145, 2002.

NETO, C. P. C. T.; HERNANDEZ, F. F. F.; BEZERRA, F. C.; SOUSA, R. F. de; AVALCANTI, M. L. F. Efeito de diferentes substratos na aclimatação *ex vitro* de mudas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 4, n. 2, 2004.

NIEDS, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and field grown trees. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, New York, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.

NIETSCHKE, S.; MARQUES, S. V.; PEREIRA, M. C. T.; SALLES, B.; XAVIER, A. A.; FRANÇA, A. C.; LIMA, C. de; SILVA, L. S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 989-991, 2006.

OKKELS, F. T.; PEDERSEN, M. G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 199-207, 1988.

OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Ocidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 31, p. 459-465, 2008.

OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagación y estimativa de producción de mudas de bananos para la Amazonia Occidental. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1429-1432, 2008a.

OLIVEIRA, T. K. de; LESSA, L. S.; SILVA, S. O. e; OLIVEIRA, J. P. de. Características agronômicas de genótipos de bananeira em três ciclos de produção em Rio Branco, AC. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1003-1010, 2008b.

OLIVEIRA, C. A. P. de; PEIXOTO, C. P.; SILVA, S. de O. e; LEDO, C. A. da S.; SALOMÃO, L. C. C. Genótipos de bananeira em três ciclos na zona da Mata Mineira. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 173-181, 2007.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVEIRA D. G.; SILVA, S. de O. e. Concentração de BAP e a eficiência da micropropagação de bananeira tetraplóide (Grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, v. 58, n.1, p. 73-78, 2001.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. da S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVA, S. de O. e. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 32, p. 415-420, 1997.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.

PEIX, A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELASQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacea* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1927-1935, 2001.

PEIXOTO, M. J. A.; CARNEIRO, M. S. de S.; SOUZA, P. Z.; DINIZ, J. D. N.; SOUTO, J. S.; CAMPOS, F. de A. P. Desenvolvimento de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., em diferentes substratos, após micropropagação in vitro. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n.1, p.17-20, 2006.

PEREIRA, J. Ganhando resistência: a resistência bacteriana aos antibióticos. **Alert@Saúde na internet**, MNI – Médicos na internet, 2001. Disponível em: <<http://www.alert-online.com>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2009 às 15h08.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. Rio de Janeiro, 2007. 103f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia. Seropédica-RJ, 2007.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. Rio de Janeiro, 2003. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. Seropédica – RJ, 2003.

POLLOCK, K. D.; BARFIELD, G.; SHIELD, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Rep.**, v. 2, n. 1, p. 36-39, 1983.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 42, p. 481-497, 1999.

POULSEN, G. B. Elimination of contaminating microorganisms from meristem culture of apple rootstock M26. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 193-197, 1988.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishing, p. 71-93, 1991.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres/Potafos, 1991. 343 p.

RANGEL, A.; PENTEADO, L. A. C.; TONET, R. M. **Cultura da banana**, 2 ed. Campinas, CATI, 2002. 91 p. ilustr. 21 cm (Boletim Técnico, 234).

RAO, N. S. S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 863-866, 1983.

RAPS, A.; VIDAL, S. Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant herbivorous insect interaction. **Oecologia**, Berlin, v. 114, p. 541-547, 1998.

READ, P. E.; FELLMAN, C. D. Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 166, p. 15-20, 1985.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, Katia Regina dos Santos . Fixação Biológica de Nitrogênio - Estado da Arte. In: Adriana Maria de Aquino; Renato Linhares de Assis. (Org.). *Processos Biológicos do Sistema Solo-Planta*. 1 ed. Brasília: SPI, Embrapa, v. 1, p. 151-180, 2005.

REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; MAESTRI, M.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. M. Crescimento de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis* e *E. cloeziana* sob diferentes níveis de restrição radicular. **Revista Árvore**, Viçosa, v.13, n.1, p.1-18, 1989.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 401-405, 1994.

REIS JUNIOR, F. B. **Ecologia e diversidade do gênero *Azodipirillum* em associação com pastagem de *Brachiaria* spp.** 2002. 98 f. Tese (Doutorado e Agronomia – Ciências do solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”: alterações morfoanatômicas.** 2005, 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, 2005.

RODRIGUES, E. P.; OLIVEIRA, A. L. M. de; VIDAL, M. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J. I. **Obtenção e seleção de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com alterações na produção de auxinas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1516-2311;27).

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na Cultura do Arroz inundado. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, p. 275-284, 2006.

RODRIGUES, E. P. **Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inoculado.** 2004, 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciências do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédca, 2004.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, 1986, 16 p.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 57-66, 2005.

ROHLF, F. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system:** version 2.10. New York, USA, 2000.

ROSS-KARSTENS, G. S.; EBERT, G.; LUDDERS, P. Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Oxford, v. 4, p. 21-27, 1998.

SÁ, M. E. L. de; BRAGA, M. F. Avaliação de um protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* sp.) cv. Prata-Anã (Subgrupo AAB). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, n.1, p. 236-239, 2002.

SAGI, L.; GREGORY, D. M.; REMY, S.; SWENNEN, R. Recent developments in biotechnological research on bananas (*Musa* spp.). **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 313-317, 1998.

SALEHI, H.; KHOSH-KHUI, M. A simple procedure for disinfection of “baby masquerade” miniature rose explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, p. 145-148, 1997.

SANTANA, R. A. S. **Estabelecimento das condições de cultivo *in vitro* da bananeira (*Musa sp.*) cultivar ‘Pacovan’**. 1999. 72 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 1999.

SANTOS, D. S. dos. **Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno**. 2009. 133 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SANTOS, C. C. C. dos; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan, **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 282-285, 1995.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A. CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1235-1237, 2001.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Produção de mudas pré-básicas de batata por estaquia a partir de plantas micropropagadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 185-191, 2004.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. de L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, p. 827-834, 2003.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. de L. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de batata em meios semisólido e líquido. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, n. 11, p. 1273-1279, 2003.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. da. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 89-95, 2001.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Desfolhamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada de crescimento durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 135-145, 2000.

SCHMITZ, J. A. K.; SOUZA, P. V. D.; KAMPF, A. N. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 937-944, 2002.

SCHMITZ, F. J.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. and the SENTRY Participants Group. Prevalence of Aminoglycoside Resistance in 20 European University Hospitals Participating in the European SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.18, p. 414-421, 2000.

SCORTICHINI, M.; CHIARIOTTI, A. *In vitro* culture of *Prunus persica* var. Laevis Gray (nectarine): detection of bacterial contaminants and possibility of decontamination by means of antibiotics. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 109-118, 1988.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v. 7, p. 153-156, 1993.

SEBRAE. **Banana: Estudo de mercado SEBRAE/ESPM 2008 – Relatório completo**. Disponível em: <www.sebrae.com.br/uf/acre/acesse/biblioteca-on-line> Acesso em: 28 de setembro de 2008 às 22h48.

SETUBAL, J. W.; NETO, A. F. C. Efeito de substratos alternativos e tipos de bandejas na produção de mudas de pimentão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 593-594, 2000.

SENDIN, A. P. P. M. **Micropropagação de bananeira dos cultivares Maçã e Grande Naine visando a produção de mudas de baixo custo**. 2001. 72 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Liz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SISTI, M.; ALABANO, A.; BRANDI, G. Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp in drinking supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. **Let Appl Microbiol**, v. 26, p. 347-350, 1998.

SILVA, R. M. dos S.; SOUZA, C. D. de; LEMOS, E. E. P. de; REZENDE, L. de P. Controle de contaminantes fúngicos na micropropagação de Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 3, p. 191-197, 2007.

SILVA, E. A. da; BOLIANI, A. C.; CORRÊA, L. de S. Avaliação de cultivares de bananeira (*Musa* sp) na região de Selvíria – MS. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal – SP, v. 28, n. 1, p. 101-103, 2006.

SILVA, J. V.; BEZERRA, F. C.; HERNANDEZ, F. F. F.; CORDÃO TERCEIRO NETO, C. P.; LEAL, F. R. R. Efeito do substrato na aclimatização de mudas micropropagadas de antúrio. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 4., 2004. Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2004. 364 p.

SILVA, S. O.; PASSOS, A. R.; DONATO, S. L. R.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V.; LIMA NETO, F. P.; LIMA, M. B. Avaliação de genótipos de bananeira em diferentes ambientes. **Ciênc. Agrotec.**, v. 24, p. 737-748, 2003.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. Melhoramento da bananeira para resistência: resultados obtidos pelo melhoramento convencional. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA E WORKSHOP DO GENOMA MUSA, 5., 2003, Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilização, p. 28-34, 2003.

SILVA, A. B. da.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. de R.; MOREIRA, M. A.; DUTRA, L. F. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1190-1196, 2002.

SIVIERO, A.; OLIVEIRA, T. K.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; SA, C. P.; SILVA, S. O. E. **Cultivares de banana resistentes à sigatoka-negra recomendadas para o Acre**. Rio Branco: Embrapa, 2006 (Documento Técnico).

SMITH, M. K.; SEARLE, C.; LANGDON, P. W.; SCHAFFER, B.; WHILEY, A. W. Comparison between micropropagated banana (*Musa* AAA; 'Williams') and conventional planting material during the first 12 months of development. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.76, n.1, p. 83-87, 2001.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H de; SANTOSEREJO, J. A. dos; SOUZA, F. V. D. SILVA, S. de O. e. Micropropagação de bananeira “Grande Naine” via gemas florais. XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRULTICULTURA, Belém. **Anais...** 2002.

SOBRAL, J. K. A Comunidade Bacteriana Endofítica e Epifítica de Soja (*Glycine max*) e Estudo da Interação Endófito-Planta. 2004. Disponível em: <www.biotaneotropica.org.br>. Acesso em 19 de junho de 2006 às 21h.

SOUSA, H. U. de. **Efeito de composições e doses de superfosfato simples no crescimento e nutrição de mudas de bananeira (Musa sp.) cv. Mysore obtidas por cultura de meristemas.** 1994. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.

SOUZA JÚNIOR, E. E. de; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] cv. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 1, n. 2, p. 147-151, 2001.

SOUZA, M. L. de. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 21, p. 28-31, 2001.

SOUZA, J. da S.; TORRES FILHO, P. Mercado. In: **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais.** Brasília: EMBRAPA-SPL, p. 525-543, cap. 18, 1997.

SOUZA, A. O. **Bactérias endofíticas de milho (*Zea mays* L.) e sua variabilidade genética analisada por RAPD.** 1996. 83 p. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1996.

STANNIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **General microbiology.** London: MacMillan, 1987. 689 p.

STROSSE H.; VAN DEN HOUWE. I.; PANIS, B. **Banana cell and tissue culture-a review.** In: JAIN S. M.; SWENNEN, R. (eds) *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/ae216e/ae216e00.html>>. Acesso em: 14 de setembro de 2005 às 17h28.

SUBERER, D. A. Soil and rhizosphere aspects of N₂-fixing plant microbe associations. In: LINCH, J. D. (Ed.) **The rizosphere**. Chichester: John Wiley e Sons., p. 317-353, 1990.

TANAKA, M.; KUMURA, M.; GOI, M. Surface-sterilization for *in vitro* culture of phalaenopsis flowerstalk cutting using antimicrobials. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 131, p. 321-328, 1983.

TAPIA-HERNANDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M. R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, p. 45-55, 2000.

TENG, W. L.; NICHOLSON, L. Pulse treatments of penicillin and Streptomycin minimize internal infections and have post treatment effects on the morphogenesis of ginseng root culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 531-535, 1997.

THOMAS, P.; SWARNA, G. K.; PATIL, PRAKASH, P.; RAWAL, R. D. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 93, p. 39-54, 2008.

THOMAS P. Isolation and identification of five alcohol defying *Bacillus* spp. covertly associated with *in vitro* culture of seedless watermelon. **Curr Sci**, v. 92, p. 983-987, 2007.

THOMAS, P. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. **Curr Sci**, v.87, p. 67-72, 2004.

THOMÉ, G. C. H.; GRESSLER, P. D.; SANTOS, G. dos. Propagação *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., via organogênese. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p. 197-202, 2004.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. 72 p. (Boletim Técnico, 174).

TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/CNPH, v. 1, 1998, 864 p.

VASIL, I. K.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of cereal and grasses. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994, 593 p.

VEJSADOVA, H. The influence of organic and inorganic fertilization on development of indigenous VA fungi in roots of red clover. In: READ, D. J.; LEWIS, D. H.; FITTER, A. H.; ALEXANDER, I. J. (Eds). **Mycorrhizas in ecosystems**. Oxford: CAB, p. 406-407, 1992.

VERMA, R. K.; ARYA, I. D. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates and organic manure on growth and mycorrhization of micropropagated *Dendrocalamus asper* plantlets and on spore production in their rhizosphere, **Mycorrhiza**, Dijon, v.8, p.113-116, 1998.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74 p. (**Documentos/Embrapa Agrobiologia**, ISSN 1517-8498, 234).

VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; DE LANGHE, E. Somaclonal variation in plantains (*Musa* spp., AAB group) derived from shoot-tip culture. **Fruits**, Paris, v. 46, n.4, p. 429-439, 1991.

VUYLSTEKE, D. **Shoot-tip culture for the propagation, conservation, and exchange of *Musa* germplasm**. Rome : IBPGR, 1989. 56p. (IBPGR. Practical manual for handling crop germplasm *in vitro*, 2).

VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 62, n. 4, p. 323-328, 1985.

WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Mount Vernon, v. 108, n. 3, p. 386-389, 1983.

WEBER, O. B. **Ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em bananeiras (*Musa* spp.) e abacaxizeiros (*Ananas comosus* (L) Merrill) e seus efeitos no crescimento de mudas micropropagadas**. 1998. 192 p. Tese (Doutorado) - UFRRJ, Seropédica, RJ, 1998.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p. 103-113, 1999.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 35, p. 2277-2285, 2000.

WEBER, O. B.; CRUZ, L. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. erbaspirillumlike bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 201-205, 2001.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais: cultivo *in vitro* de vegetais**. UFRPE, Departamento de Química, Laboratório de Pesquisa Cultura de Tecidos Vegetais, 2005. Disponível em: <<http://ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 27 de maio de 2006 às 20h02.

WILSON, Z.; POWER, J. B. Elimination of systemic contamination in explants and protoplast cultures of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, p. 622-625, 1989.

WONG, W. C. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.); initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, p.159-166, 1986.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.20, n.1, p.9-16, 1996.

YOKOTA, S.; KARIM, M. Z.; AZAD, M. A. K.; RAHMAN, M. M. EIZAWA, J.; SAITO, Y.; ISHIGURI, F.; LIZUKA, K.; YAHARA, S.; YOSHIZAWA, N. Histological observation of changes in leaf structure during successive micropropagation stages in *Aralia elata* and *Phellodendron amurense*. **Plant Biotechnology**, v.24, p. 221-226, 2007.

YEPES, M. L.; ALDWINCKLE, H. S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotic on proliferation. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 15, p. 55-67, 1994.

ZAFFARI, G. R.; SOLIMAN FILHO, L. F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra da dominância apical sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira *in vitro*. **Rev. Bras. Frutic.**, v.17, p. 37-42, 1995.

ANEXOS

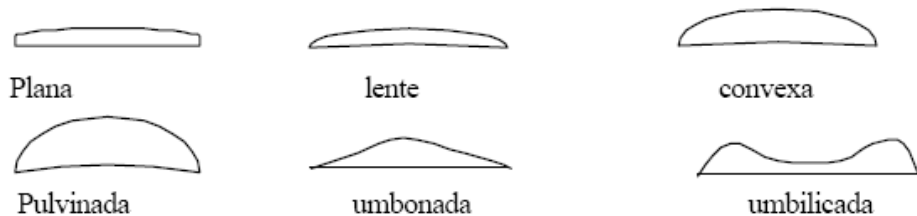
ANEXO A - Tabela da composição de meios de cultura semi-específicos usados para isolamento de bactérias diazotróficas.

| Componentes/L | Meios de Cultura | | | | | |
|---|------------------|-----------|--------|-------|-----------|-----------|
| | NFB | LGI | JNFb | Dyg's | JMV | Batata |
| Acido Málico | 5,0 g | - | 5,0 g | 2,0 g | - | 2,5 g |
| Açúcar cristal | - | 5,0 g | - | - | - | 2,5 g |
| Glicose | - | - | - | 2,0 g | - | - |
| Manitol | - | - | - | - | 5,0 g | - |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g | 0,2 g | 0,6 g | 0,5 g | - | - |
| KH ₂ PO ₄ | - | 0,6 g | 1,8 g | - | 0,6 g | - |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g | 0,5 g | 0,2 g | - |
| NaCl | 0,1 g | - | 0,1 g | - | 0,1 g | - |
| NaCl ₂ .2H ₂ O | - | - | - | - | - | - |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,02g | 0,02 g | 0,02g | - | 0,2 g | - |
| FeEDTA a 1,64% | 4,0 mL | 4,0 mL | 4,0 mL | - | 4,0 mL | - |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | - | 0,002g | - | - | - | - |
| Azul de Brometamol a 0,5% em 0,2 N de KOH | 2,0 mL | 5,0 mL | 2,0 mL | - | 2,0 mL | - |
| Micronutrientes para meio de cultura** | 2,0 mL | - | 2,0 mL | - | 2,0 mL | 2,0 mL |
| Vitamina para meio de cultura*** | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL | - | 1,0 mL | 1,0 mL |
| KOH | 4,5 g | - | 4,5 g | - | - | - |
| Extrato de levedura | 50 mg* | - | 20 mg* | 2,0 g | 100 mg* | - |
| Peptona bacteriológica | - | - | - | 1,5 g | - | - |
| Ácido glutâmico | - | - | - | 1,5 g | - | - |
| Batata | - | - | - | - | - | 200 g |
| pH | 6,5 | 6,0 – 6,2 | 5,8 | 6,0 | 5,0 – 5,4 | 6,8 – 7,0 |
| Ágar (semi-sólido) | 1,3 g | 1,4 g | 1,7 g | - | - | - |
| Ágar (sólido) | 15 g | 15 g | 17 g | 15 g | 25 g | 15 g |
| Ágar (líquido) | - | - | - | 0 g | - | - |

*somente em meio sólido; **micronutrientes para meio de cultura: 0,04 g CuSO₄.5H₂O; 1,2 g ZnSO₄.7H₂O; 1,4 g H₃BO₃; 1,0 g Na₂MoO₄.2H₂O; 1,175 g MnSO₄.H₂O; ***vitaminas para meio de cultura: 100 mg biotina; 200 mg piridoxol-HCl.

ANEXO B - Ilustração dos diferentes parâmetros de avaliação das características morfológicas das colônias de bactérias diazotróficas isoladas de bananeiras de Rio Branco Acre em meio sólido.

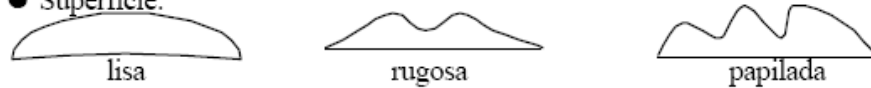
- Tamanho: menor que 1 mm, puntiforme e maior que 1 mm, anotar dimensão
- Forma: circular ou irregular
- Elevação:



- Bordo:



- Superfície:



Fonte: Perin, 2003.