

CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) E CINETINA (CIN) E TEMPOS DE CULTIVO NA MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA ‘THAP MAEO’

CONCENTRATIONS OF 6-BENZYLAMINOPURINE (BAP) AND KINETIN (KIN) AND GROWTH TIMES OF ‘THAP MAEO’ BANANA MICROPROPAGATION

GUSTAVO ALVES PEREIRA¹, APARECIDA CONCEIÇÃO BOLIANI², LUIZ DE SOUZA CORRÊA²

¹Pós doutorando UNESP/Ilha Solteira-SP. Av. Brasil, 56, Centro, DFTASE, email: gustavo_apereira@yahoo.com.br

²Docentes UNESP/Ilha Solteira-SP. Av. Brasil, 56, Centro DFTASE, email: boliani@agr.fesi.unesp.br, lcorrea@agr.feis.unesp.br

RESUMO

No Brasil, apesar da técnica de multiplicação *in vitro* de bananeira ser bastante difundida, percebe-se que há deficiência de trabalhos que buscam o aumento da taxa de multiplicação de algumas cultivares importantes, levando em consideração, além das variações somaclonais, os custos de produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar um protocolo para multiplicação *in vitro* para o genótipo de bananeira ‘Thap maeo’ (*Musa spp.*), utilizando diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (CIN). Os tratamentos utilizados foram: 0-Controle; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹. No processo de multiplicação efetuaram-se quatro tempos de subcultivos, sendo o 1º aos 25 dias; 2º aos 50; 3º aos 75 e o 4º aos 100 dias após o cultivo, realizando-se o cultivo das gemas laterais provenientes da subdivisão longitudinal dos explantes e, ou, do isolamento das brotações, com o corte das folhas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco potes contendo um explante cada. O maior número de brotos obtido foi na concentração de 4 mg L⁻¹ de cinetina e BAP, conseguindo em média 3,8 brotos por explantes aos 100 dias após o cultivo.

Termos para indexação: Cultura de tecidos, reguladores de crescimento, *Musa sp.*

ABSTRACT

In Brazil, although the technique of *in vitro* multiplication of banana is quite widespread, there are studies that seek to increase the multiplication rate of some important crops, considering somaclonal variation and production cost. The objective of this study was to evaluate a protocol for the *in vitro* multiplication of banana, genotype ‘Thap Maeo’ (*Musa spp.*) using different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) or kinetin (KIN). The treatments were: 0 Control; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 mg L⁻¹. In the process of multiplication, four subculture times, with the 1st at 25 days; 2nd at 50 days; 3rd and 4th at 75 and 100 days after cultivation, respectively, were evaluated on the cultivation of lateral buds extracted from the longitudinal subdivision of the explants, and/or isolated shoots, without leaves. The experimental design was completely randomized with five treatments, five replicates

with each replicate represented by pots with one explant each. The highest number of shoots was obtained using 4 mg L⁻¹ BAP and kinetin achieving an average of 3.8 shoots per explant at 100 days of cultivation.

Index terms: Tissue culture, growth regulators, *Musa sp.*

INTRODUÇÃO

A bananicultura é uma atividade de grande importância econômica e social em todo o mundo, sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial de bananas. Em 2009, a produção brasileira foi de 7,19 milhões de toneladas numa área plantada de 511,64 mil hectares (Singh et al. 2011). A grande maioria dos plantios é realizada utilizando-se mudas de bananeira obtidas pelo método convencional de propagação. Desse rizoma, uma ou mais gemas (apical ou laterais) irão brotar, e cada uma produzirá uma nova bananeira. Dentre os principais tipos de mudas obtidas de bananeiras podem-se destacar o chifão, o chifre e o chifrinho (Souza et al. 2000; Alves et al. 2004). No entanto, esse processo apresenta baixa taxa de multiplicação, além de resultar em mudas desuniformes, dificultando o manejo do pomar, e podendo ainda se constituir em um mecanismo de disseminação de pragas e doenças, tais como mal-do-panamá, moko, podridão-mole, broca, nematoides e vírus (Roels et al. 2005). A baixa taxa de multiplicação das bananeiras no campo tem demandado um grande interesse para o desenvolvimento de pesquisas para obter métodos de propagação vegetativa mais rápidos (Scarpere filho et al. 1998). Comparando-se, nos

(Recebido em 12 de dezembro de 2013 e aprovado em 14 de abril de 2014)

diferentes métodos de propagação vegetativa, o número de mudas obtidas e o tempo gasto na produção delas, verifica-se que a micropropagação é muito superior aos demais métodos. De acordo com Santos-Serejo et al. (2009), dependendo do genótipo utilizado, o processo convencional necessita de 12 meses para obter de 10 a 30 mudas, enquanto cerca de dez vezes mais mudas são obtidas em quase metade do tempo mediante a micropropagação.

No Brasil, apesar da técnica de multiplicação *in vitro* de bananeira ser bastante difundida, a deficiência de trabalhos que visam o aumento da taxa de multiplicação de algumas cultivares importantes, levando em consideração, além das variações somaclonais, os custos de produção (Lemos et al. 2001). Além disso, ainda hoje, há falta de domínio dessa tecnologia para cultivares novas e algumas cultivares regionais de bananeira, sendo responsável pela colocação de mudas de qualidade duvidosa no mercado, trazendo prejuízos aos agricultores.

O BAP é a citocinina mais recomendada para a micropropagação da bananeira. Entretanto, a concentração ideal é genótipo-dependente, sendo as maiores taxas de multiplicação obtidas entre 2,5 mgL⁻¹ e 5,0 mgL⁻¹ (Scherwinski-Pereira et al. 2009). O melhor desempenho do BAP em relação às outras citocininas, na indução da formação de brotações múltiplas em culturas de ápices caulinares, tem sido relatado para várias cultivares de bananeira (Ikram-Ul-Haq; Dahot, 2007). Os efeitos superiores dessa citocinina podem ser atribuídos à sua alta estabilidade nas culturas *in vitro*, tendo em vista não ser degradada com facilidade, persistindo, assim, no meio de cultura por mais tempo (Resmi; Nair, 2011). Embora já existam protocolos variados, faz-se necessário avaliar a qualidade do sistema comercial de multiplicação *in vitro*, uma vez que esta é influenciada por diversos fatores como taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimação

(Oliveira et al. 2001). O aprimoramento constante dos processos de multiplicação *in vitro* e o controle da qualidade das mudas, aliados à redução de custos, são essenciais (Assis et al. 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar um protocolo para multiplicação *in vitro* para o genótipo de bananeira ‘Thap maeo’ (*Musa spp.*), utilizando diferentes concentrações 6-Benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micropropagação da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Ilha Solteira. Os explantes utilizados foram obtidos de plantas matrizes originadas de clones de *Musa sp.* ‘Thap maeo’ cultivada na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da UNESP, Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria-MS, no período de 10 de abril a 10 de agosto de 2011. Após a obtenção dos rizomas, os mesmos foram lavados para retirar o excesso de solo e raiz. Em seguida, as bainhas foram seccionadas com uma faca estéril, permitindo assim a redução de seu tamanho a 5 mm.

Os explantes foram isolados e desinfestados por imersão em cloro ativo a 1% durante vinte minutos e sob agitação constante. Na sequência, os ápices caulinares passaram por três lavagens consecutivas em água esterilizada. Em câmara de fluxo laminar, os mesmos foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog 1962), pH 5,8 (ajustado antes da autoclavagem) e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,3 g L⁻¹ de Phytigel.

Os tratamentos consistiram da adição de forma separada ao meio de cultura de 6-Benzilaminopurina (BAP) ou Cinetina (CIN) em diferentes concentrações (0-controle; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mgL⁻¹). Quatro semanas após a inoculação, os ápices caulinares foram divididos em duas partes para que o meristema fosse colocado em contato com o meio de cultura MS, pH 5,8 (ajustado antes da autoclavagem), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,3 g L⁻¹ de phytigel.

No processo de multiplicação efetuaram-se quatro tempos de subcultivos, sendo o primeiro aos 25 dias; o segundo aos 50; o terceiro aos 75 e o quarto aos 100 dias após a inoculação, realizando-se o cultivo das gemas laterais provenientes da subdivisão longitudinal dos explantes e, ou, do isolamento das brotações, com o corte das folhas sempre que possível. No final de cada subcultivo, os brotos foram isolados e reinoculados em meio de cultura MS.

Os explantes, durante as fases de estabelecimento e de multiplicação foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, sob iluminação artificial de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz.

No início de cada cultivo, foi avaliado o número total de explantes produzidos por frasco, para a obtenção da taxa de multiplicação para cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco potes contendo um explante cada. Os dados foram submetidos a análise de regressão através do SISVAR (Ferreira 2008). A partir destes dados, foi realizada a análise de regressão polinomial para estudar a taxa de multiplicação em função da concentração de BAP e CIN.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as análises de variância, verificou-se que houve diferença significativa entre as doses dos reguladores BAP para a taxa de multiplicação sendo a variável número de brotos emitidos por explantes ($P < 0,05$). A análise de regressão indicou equações de segundo grau, como melhor ajuste para todas as variáveis.

A taxa de multiplicação *in vitro* variou de 1,30 a 3,8 brotos por explante inicial, em função das concentrações de BAP, ao longo do tempo. Aos 25 dias após a inoculação verificou-se que houve uma tendência de aumento do número de brotos até a concentração de 3 mg L^{-1} com 1,6 brotos. Com aumento da dose de BAP para $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi observado redução no número de brotos apresentando valor médio de 1,4 brotos ocasionado pela vitrificação verificada nos explantes. (Figura 1A).

Esse índice difere de Banerjee e De Langhe (1985) que obtiveram taxa de multiplicação entre duas e dez plântulas por cultivo de quatro a cinco semanas. Provavelmente, este fato deve-se ao acúmulo de BAP no explante, cujo excesso inibe a multiplicação. Uma das maneiras de tentar maximizar a produção de brotos seria alternar concentrações altas e baixas de BAP no meio de cultura, nos diferentes subcultivos.

A menor taxa de multiplicação de explantes foi a dose de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP nos quatro tempos de subcultivos ao qual verificou-se taxa média variando de 1,0 a 1,4 brotos por explante inicial. (Figuras 1B e 1C).

A maior taxa de multiplicação foi obtida na concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, aos 100 dias após o cultivo, com média de 3,8 brotos por explante inicial (Figura 1D).

Os resultados obtidos são superiores aos encontrados por Braga et al. (2001), para variedade Caipira, que teve média de 2,58 e por Oliveira et al. (2001), para a variedade FHIA-01, com média de 2,44.

Oliveira et al. (2001) obtiveram a maior taxa de multiplicação absoluta, 4,96, na concentração de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, no quinto subcultivo de brotos de bananeira FHIA 01. Contudo, Lima e Moraes (2006), ao avaliarem a taxa de multiplicação absoluta em FHIA 01, verificaram que a maior taxa foi obtida na concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no terceiro subcultivo. Outro estudo publicado por Oliveira e Silva (1997) demonstrou que as maiores taxas de multiplicação *in vitro* das cultivares triplóides, Nanicão e Grande Naine, foram obtidas no terceiro e quarto subcultivos.

Os diferentes resultados existentes na literatura podem ser explicados pela influência do genótipo, número de subcultivos, concentrações e tipos de citocininas na taxa de multiplicação (Mendes *et al.* 1996; Braga *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2001).

As taxas de multiplicação tendem a reduzir a partir dos 10 dias após o cultivo, tal fato se deve muito provavelmente ao acúmulo de citocininas nos explantes,

cujos excessos podem inibir a multiplicação (Banerjee e De Langhe 1985). Sendo assim, é recomendável que durante o processo de multiplicação *in vitro* ocorra alternância de concentrações de citocininas nos diferentes subcultivos (Lima e Moraes 2006).

Na micropropagação de bananeiras, o uso da citocinina BAP permite a multiplicação de plantas em larga escala (Cid 2000). Vários autores relatam o efeito das citocininas sobre a quebra da dominância apical e o favorecimento da emissão das novas brotações, mas em contrapartida são observados também efeitos na inibição do alongamento em virtude do acúmulo destes reguladores nos tecidos (Grattapaglia e Machado, 1990; Diniz *et al.* 2004; Costa *et al.* 2006).

Aos 50, 75 e 100 dias após o cultivo, a concentração de 4 mg L⁻¹ também foi a que apresentou melhor resultado

apresentando média de 3,6 brotos, sendo esta concentração podendo ser recomendada para a multiplicação comercial da bananeira ‘Thap maeo’.

Com relação ao regulador de crescimento cinetina verificou-se que a taxa de multiplicação *in vitro* variou de 1,30 a 3,8 brotos por explante inicial, em função das concentrações de cinetina, ao longo do tempo.

Aos 25 dias após a inoculação verificou-se tendência de aumento do número de brotos até a concentração de 4 mg L⁻¹ com 2,6 brotos. A taxa de multiplicação *in vitro* variou de 1,30 a 3,8 brotos por explante inicial, em função das concentrações de cinetina, ao longo do tempo de cultivo. A menor taxa de multiplicação de explantes foi a concentração de 1,0 mg L⁻¹ nos quatro cultivos ao qual verificou-se 1,4 brotos por explante inicial. (Figuras 2A, 2B e 2C).

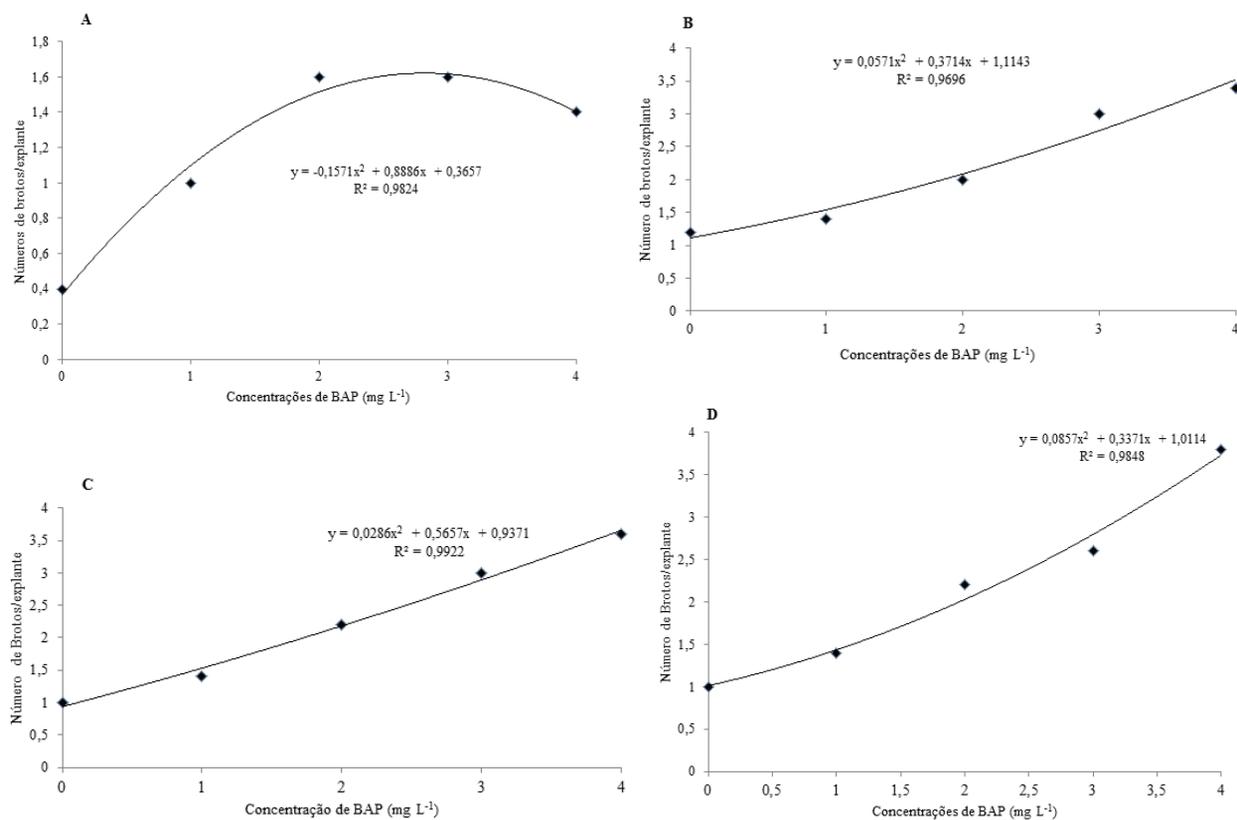


FIGURA 1 – Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira ‘Thap maeo’ (A)- após 25 dias de cultivo, (B)-Após 50 dias de cultivo, (C) Após 75 dias de cultivo e (D) após 100 dias de cultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP.

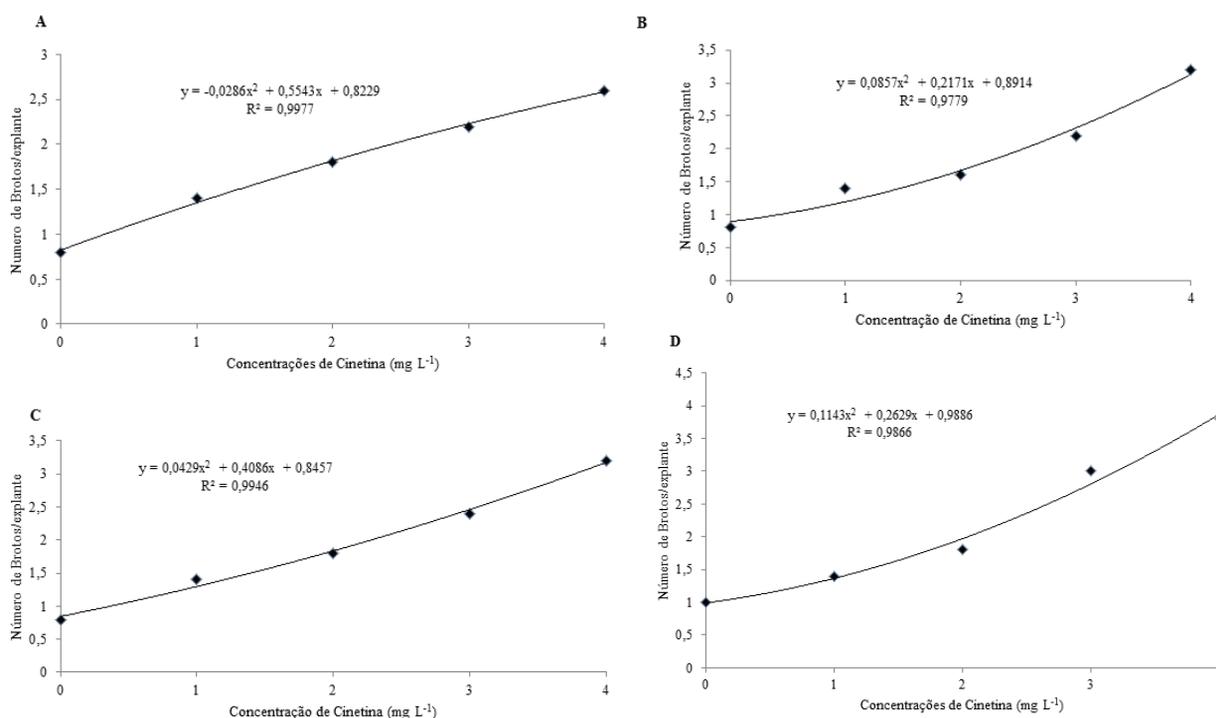


FIGURA 2 – Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira ‘Thap maeo’ (A)- após 25 dias de cultivo, (B)-Após 50 dias de cultivo, (C) Após 75 dias de cultivo e (D) após 100 dias de cultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina.

A maior taxa de multiplicação foi obtida na concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ no 4º subcultivo aos 100 dias de cultivo, com 3,8 brotos por explante inicial (Figura 2D).

Os resultados obtidos foram superiores aos conseguidos por Muhammad et al. (2007) que obtiveram média de 1,8 brotos em bananeira Basrai - Sub grupo AAA. Em concentrações maiores pode haver um decréscimo no número de brotos possivelmente pelo excesso de regulador o que poderia ocasionar vitrificação dos explantes e assim formação de calos, como também aumentar a possibilidade de ocorrer variação somaclonal posteriormente a nível de campo, possibilitando o uso deste regulador na micropropagação. Porém para este regulador estudos ainda são escassos para micropropagação de bananeira.

Estudos com uso de cinetina ainda precisam serem aprofundados com relação a variação somaclonal e estudos das plantas micropropagadas a nível de campo.

CONCLUSÕES

Para os reguladores BAP ou cinetina a melhor concentração foi de 4 mg L^{-1} , apresentando média 3,8 brotos por explantes aos 100 dias após o cultivo.

REFERENCIAS

ALVES, É. J. et al. Propagação. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Org.). **A cultura da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 59-86.

ASSIS, M.; PAIVA, M.; ARAMANI, O. C. Micropropagação de plantas: histórico de uma empresa comercial. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte v. 21, n. 204, p.124-126, 2000.

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

- BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa* sp.) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticaval, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.
- CID, L. P. B. Citocinina. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.
- COSTA, F. H. S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e 6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.
- DINIZ, J. D. N. et al. Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1385-1391, 1999.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa. CNPH, 1990. p. 99-169.
- IKRAM-UL-HAQ; DAHOT, M. U. Micro-propagation efficiency in banana (*Musa* sp.) under different immersion systems. **Pakistan Journal of Biology Sciences**, v.10, n.5, p. 726-733, 2007.
- LEMOS, E. E. P. et al. Micropropagação de clones de banana cv. terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.
- LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p.13-19, 2006.
- MENDES, B. M. J. et al. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 12, p. 863-867, 1996.
- MUHAMMAD, A.; RASHID, H.; HUSSAIN, I. Proliferation-rate effects of BAP and kinetin on banana (*Musa* spp. AAA Group) 'Basrai'. **HortScience**, Netherlands, v. 42, n. 5, p. 1253-1255, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, R. P.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n.1, p.73-78, 2001.
- OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 415-420, 1997.
- ROELS, S. et al. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, n. 1, p. 57-66, 2005.
- RESMI, L.; NAIR, A. S. Differential effect of cytokinins in the micropropagation of diploid and triploid *Musa* cultivars. **International Journal of Integrative Biology**, v. 11, n.1, p. 35-38, 2011.
- SANTOS-SEREJO, J. A. et al. Micropropagação da bananeira. In: JUGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 237-255.
- SCARFAPARE FILHO, J. A. et al. Estudo do primeiro ciclo produtivo da bananeira 'Nanicão' (*Musa* sp.) desenvolvida a partir de diferentes tipos de mudas. **Scientia Agrícola**, v.55, n.1, p. 86-93, 1998.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. da S.; OLIVEIRA, J. P. de. Micropropagação de bananeira visando à produção massal de mudas de elevado padrão genético e fitossanitário. In: GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. de (Org.). **Embrapa: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do sudoeste da Amazônia**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2009, v. 1, p. 253-290.
- SINGH, H. P.; SELVARAJAN, S. U.; KARIHALOO, J. L. **Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific**. Nova Delli: APCoAB/APAARI, 2011, 94p.
- SOUZA, A da S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. Produção de mudas. In: CORDEIRO, Z.J.M (Org.). **Banana. Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000, p. 39-46.