

UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NA MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA CV. PIONEIRA¹

Keuder Magalhães da Silva²; Roberto Pedroso de Oliveira²;
Francisco Pinheiro de Araújo²; Valdecira Carneiro da Silva³

² Embrapa - Mandioca e Fruticultura, Caixa Postal: 007, CEP: 44380-000, Cruz das Almas-BA, Brasil. e-mail: keuder@cnpmf.embrapa.br

³ Embrapa - Clima Temperado, Caixa Postal: 403, CEP: 96001-970, Pelotas-RS, Brasil.

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito de antioxidantes na micropropagação de bananeira (*Musa sp. cv. Pioneira*, grupo AAAB). A desinfestação dos ápices caulinares foi realizada em soluções a base de álcool e hipoclorito de cálcio. O estabelecimento e a multiplicação (seis subcultivos) foram realizados em MS com 4,0 mg L⁻¹ BAP. Os tratamentos foram: 1) Estabelecimento dos ápices caulinares sob fotoperíodo de 16 h e 27,91 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 2) Estabelecimento no escuro; 3) Imersão dos ápices caulinares em 1,0 g L⁻¹ ácido ascórbico por 30 minutos; 4) Adição de 10 mg L⁻¹ ácido ascórbico no meio de cultura de estabelecimento; 5) Adição de 10 mg L⁻¹ ácido ascórbico nos meios de cultura até o sexto subcultivo; 6) Adição de 50 mL L⁻¹ caseína hidrolizada até o sexto subcultivo. Os quatro últimos tratamentos foram conduzidos sob fotoperíodo de 16 h e 27,91 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O nível de oxidação foi mais intenso no subcultivo 1, seguido pela fase de estabelecimento, sendo praticamente inexistente nos subcultivos 2 a 6. Na maioria dos tratamentos não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com relação ao número médio de plântulas obtidas por explante inicial em cada subcultivo. Desta forma, os tratamentos não são recomendados para a micropropagação em escala comercial.

Palavras-chave: ácido ascórbico, caseína hidrolizada, cultura de tecidos, *Musa sp.*, produção de mudas.

UTILIZATION OF ANTIOXIDANT SUBSTANCES FOR MICROPROPAGATION OF THE BANANA CV. PIONEIRA

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the effect of antioxidant substances on banana micropropagation (*Musa sp. cv. Pioneira*, group AAAB). Shoot-tips were disinfected in alcohol and calcium hypochlorite solutions. The explant establishment and multiplication (six subcultures) were carried out in MS medium with BAP, 4.0 mg L⁻¹. The treatments were: 1) Shoot-tips establishment under a 16 h photoperiod and 27,91 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 2) Shoot-tips establishment under dark conditions; 3) Shoot-tips immersion in ascorbic acid solution, 1.0 g L⁻¹ for 30 minutes; 4) Addition of ascorbic acid, 10 mg L⁻¹ in the establishment medium; 5) Addition of ascorbic acid, 10 mg L⁻¹ in the media until the sixth subculture; 6) Addition of hydrolyzed casein, 50 ml L⁻¹ in the media, until the sixth subculture. The four last treatments were carried out under a 16 h photoperiod and 27,91 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The oxidation level was higher during the 1st subculture, followed by the establishment phase. There was little oxidation from the 2nd to the 6th subculture. There were no statistical differences amongst the treatments, for the number of plantlets obtained per shoot-tip explant in each subculture. Therefore, the antioxidant treatments are not recommended for commercial micropropagation.

Key words: ascorbic acid, hydrolyzed casein, plantlets production, *Musa sp.*, tissue culture.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de banana do mundo, tendo uma produção aproximada de 5,6 milhões de toneladas em uma área cultivada de 528 mil hectares (FAO, 2000). Atualmente, existe uma grande demanda por mudas micropropagadas devido sua alta qualidade genética e fitossanitária. As mudas de bananeira micropropagadas apresentam as vantagens de serem produzidas em grande quantidade, em

qualquer época do ano, em pequeno espaço físico, com uniformidade e praticamente isenção de patógenos (Oliveira & Silva, 1997).

Na literatura existem inúmeros trabalhos sobre micropropagação de bananeira (Cronauer & Krikorian, 1984; Wong, 1986; Vuylsteke et al., 1988; Oliveira & Silva, 1997), sendo esta metodologia utilizada comercialmente na Costa Rica, Cuba, França, Israel, Venezuela e no Brasil.

A oxidação de compostos fenólicos liberados pelas

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada à UFBA/Escola de Agronomia, Cruz das Almas-BA.

células durante a micropropagação consiste num dos principais problemas da cultura de tecidos *in vitro*. Em bananeira trata-se de um fator limitante para a taxa de multiplicação das plântulas (Banerjee & De Langhe, 1985; Jarret et al., 1985; Vuylsteke & De Langhe, 1985; Acuña, 1995). Diversos autores relataram o emprego de substâncias antioxidantes como eficientes na redução do nível de oxidação em propagação de bananeira (Banerjee & De Langhe, 1985; Jarret et al., 1985; Novak et al., 1986; Grattapaglia & Machado, 1990; Acuña, 1995). No entanto, ainda não foi quantificado o efeito do emprego dessas substâncias.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de substâncias antioxidantes na micropropagação de bananeira, buscando uma metodologia economicamente viável para ser utilizada na produção comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foi a cultivar Pioneira (*Musa* sp., grupo AAAB), sendo coletadas 72 mudas com diâmetro médio da base do pseudocaule de 10 cm. A limpeza do material foi realizada por meio de uma série de cortes, removendo-se parte do rizoma e pseudocaule até o tamanho aproximado de 5,0 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro. A desinfestação foi realizada imergindo grupos de cinco explantes em álcool 70% por 5 minutos, seguindo-se a imersão em solução de hipoclorito de cálcio 6%, contendo algumas gotas de Tween 20, por 10 minutos, sob agitação. Em seguida, foram realizadas três lavagens com água destilada esterilizada em câmara de fluxo laminar e reduzidos os explantes, com auxílio de pinça e bisturi, até o tamanho final aproximado de 0,6 cm de altura por 0,4 cm de diâmetro.

O estabelecimento do material foi feito em meio nutritivo MS básico (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,8 g L⁻¹ de 'Phytigel', em pH 5,7. A multiplicação dos explantes (subcultivos um a seis) foi efetuada no mesmo meio de cultura. Os explantes foram dispostos em frascos plásticos autoclaváveis de dimensões de 82 mm x 80 mm x 80 mm, contendo 60 mL de meio de cultura, utilizando-se quatro explantes por frasco.

O processo de multiplicação foi realizado por meio de subcultivos das gemas axilares, sendo efetuada a subdivisão longitudinal dos explantes sempre que possível. Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias. A multiplicação *in vitro* ocorreu sob condições de temperatura de 24 ± 4°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 27,91 mmol.m⁻².s⁻¹.

Os tratamentos foram: 1) Estabelecimento dos ápices caulinares sob as mesmas condições de luminosidade da fase de multiplicação (luz); 2) Estabelecimento dos ápices caulinares no escuro (escuro); 3) Imersão dos ápices caulinares em solução 1,0 g L⁻¹ de ácido ascórbico esterilizada a frio, por 30 minutos, após a desinfestação (ácido ascórbico I); 4)

Adição de 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico no meio de cultivo de estabelecimento (ácido ascórbico II); 5) Adição de 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico nos meios de cultivo até o sexto subcultivo (ácido ascórbico III); 6) Adição de 50 mL L⁻¹ de caseína hidrolizada nos meios de cultivo até o sexto subcultivo (caseína hidrolizada). Os quatro últimos tratamentos foram conduzidos sob fotoperíodo de 16 horas e 27,91 mmol.m⁻².s⁻¹. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado. Na fase de estabelecimento foram utilizadas 12 repetições por tratamento e na fase de multiplicação todas as plântulas obtidas nos subcultivos anteriores, sendo que cada explante consistiu em uma repetição.

Em cada subcultivo foram avaliados o nível de oxidação e o número de plântulas maiores que 2 cm, obtidas por explante inicial. O nível de oxidação foi avaliado visualmente, sendo classificado como: praticamente sem oxidação (0); pouco oxidado (1); medianamente oxidado (2); e muito oxidado (3). As médias do número de plântulas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos resultados, observou-se que o nível de oxidação dos compostos fenólicos liberados na superfície cortada dos explantes quando da repicagem foi maior durante o primeiro subcultivo, não havendo, no entanto, diferenças visuais entre os tratamentos (Tabela 1). A oxidação também ocorreu na fase de estabelecimento, embora com menor intensidade. Nessa fase, observou-se que a intensidade de oxidação foi menor no tratamento com imersão dos ápices caulinares por 30 minutos em solução 1,0 g L⁻¹ de ácido ascórbico. Nos subcultivos dois a seis não foram observadas diferenças entre os tratamentos, cujas plântulas multiplicaram-se rapidamente. Nesse período, os explantes apresentaram-se ligeiramente oxidados somente na primeira semana de cultivo, adquirindo, em seguida, a coloração verde intenso, à medida que foram se desenvolvendo. Banerjee & De Langhe (1985) já haviam relatado que a intensidade de oxidação em tecidos de bananeira diminui consideravelmente após algumas subculturas.

Neste trabalho, verificou-se também que o nível de oxidação pode, por vezes, funcionar como indicador de contaminação bacteriana, quando esta não se apresenta visível. Explantes considerados muito oxidados num subcultivo mostraram-se contaminados no seguinte, indicando que devem ser imediatamente eliminados. Desta forma, as interações entre bactérias endógenas fitopatogênicas e os explantes também consistem em uma causa de oxidação (Oliveira et al., 2000). Segundo Vuylsteke et al. (1988), o descarte de explantes de bananeira muito oxidados durante a fase de multiplicação é também recomendado para evitar o surgimento de variantes somaclonais.

Os tratamentos de cultivo dos ápices caulinares

Tabela 1 - Nível de oxidação de compostos fenólicos, ao final de cada subcultivo, durante a micropropagação de bananeira (*Musa sp.*, cv. Pioneira).

Tratamentos	Nível médio de oxidação em diferentes fases ¹						
	Estabelecimento	1º Sub-cultivo	2º Sub-cultivo	3º Sub-cultivo	4º Sub-cultivo	5º Sub-cultivo	6º Sub-cultivo
Luz	1	2	0	0	0	0	0
Escuro	1	2	0	0	0	0	0
Ác. ascórbico I	0	2	0	0	0	0	0
Ác. ascórbico II	1	2	0	0	0	0	0
Ác. ascórbico III	1	2	0	0	0	0	0
Caseína hidrolizada	1	2	0	0	0	0	0

¹ 0: praticamente sem oxidação; 1: um pouco oxidado; 2: medianamente oxidado; 3: muito oxidado.

sob condições de escuro (Grattapaglia & Machado, 1990), imersão dos ápices caulinares em solução 1,0 g L⁻¹ de ácido ascórbico por 30 minutos (Acuña, 1995), adição de 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico no meio de cultura na fase de estabelecimento (Banerjee & De Langhe, 1985), adição de 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico em todos os subcultivos (Vuylsteke & De Langhe, 1985) e adição de 50 ml L⁻¹ de caseína hidrolizada em todos os subcultivos (Jarret et al., 1985) mostraram efeitos significativos no número de plântulas obtidas por explante inicial da cv. Pioneira nos subcultivos dois, três, cinco e seis (Tabela 2).

Porém, como essas pequenas diferenças não ocorreram paralelamente ao nível médio de oxidação (Tabela 1), podem ser atribuídas ao efeito da matriz na micropropagação. Oliveira & Silva (1997) relataram que podem ser obtidas variações de até 700% na taxa de multiplicação, após seis subcultivos, em função apenas da matriz. No presente trabalho, este efeito foi amenizado pelo uso de 12 repetições por tratamento.

Embora o tratamento correspondente à adição de 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico nos meios de cultivo até o

sexto subcultivo tenha apresentado, em média, um melhor desempenho (Tabela 2), este não foi constante e significativamente superior ao tratamento testemunha (luz) em todos os seis subcultivos. O efeito do uso de substâncias antioxidantes foi minimizado pelo uso de práticas adequadas durante o cultivo *in vitro*, como tratamento eficiente de desinfestação; destreza manual durante as repicagens, realizando-se a limpeza e subdivisão dos explantes por meio de cortes contínuos sem superfícies enrugadas e com rapidez para evitar a desidratação dos explantes; transferências frequentes dos explantes, diminuindo o efeito tóxico dos produtos da oxidação; meio de cultura balanceado nutricional e hormonalmente; e temperatura, umidade relativa do ar e luminosidade adequadas durante o desenvolvimento dos explantes.

CONCLUSÃO

Nas condições em que este trabalho foi conduzido pode-se concluir que os tratamentos com substâncias antioxidantes a base de ácido ascórbico e caseína

Tabela 2 - Efeito de substâncias antioxidantes ao final de cada subcultivo na taxa de multiplicação *in vitro* de bananeira (*Musa sp.*, cv. Pioneira).

Tratamentos	Número médio de plântulas/explante inicial em diferentes fases ¹						
	Estabelecimento	1º Sub-cultivo	2º Sub-cultivo	3º Sub-cultivo	4º Sub-cultivo	5º Sub-cultivo	6º Sub-cultivo
Luz	1	1	3,88 b	5,54 abc	6,35 a	14,78 ab	24,82 ab
Escuro	1	1	3,45 b	2,22 c	5,31 a	11,67 b	27,41 ab
Ác. ascórbico I	1	1	3,89 b	2,75 bc	7,22 a	23,72 a	28,96 a
Ác. ascórbico II	1	1	3,89 b	5,52 a	9,06 a	25,10 a	32,65 a
Ác. ascórbico III	1	1	5,23 a	6,30 a	8,83 a	21,00 ab	28,62 a
Caseína hidrolizada	1	1	4,04 b	5,09 ab	6,06 a	14,56 ab	13,32 b
CV (%)	-	-	9,15	21,82	18,90	23,31	24,30

¹ Médias originais, embora para a análise estatística tenham sido transformadas para $\sqrt{x+0,5}$; médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

hidrolizada e o estabelecimento dos explantes *in vitro* sob condições de escuro não devem ser recomendados para a micropropagação de bananeira cv. Pioneira como redutores do nível de oxidação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, P.I. Micropropagación de banano a partir de ápices vegetativos. **Cobana**, San José, v.17, p.9-12, 1995.
- 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**, Heidelberg, v.4, p.351-354, 1985.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A. D. Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.2, p.234-235, 1984.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Rome, 2000 FAOStat Database.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 1990. p.99-169.
- JARRET, R.L.; RODRIGUEZ, W.; FERNANDEZ, R. Evaluation, tissue culture, propagation and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' plantains in Costa Rica. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.25, p.137-147, 1985.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; PHADVIBULYA, V.; HERMELIN, T.; BRUNNER, H.; DONINI, B. Micropropagation and radiation sensitivity in shoot-tip cultures of banana and plantain. In: Nuclear Techniques and *In Vitro* Culture for Plant Improvement, 1986, Vienna. **Proceedings**, Vienna, IAEA, 1986. p. 167 - 174
- OLIVEIRA, R.P.; SILVA, S.O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.4, p.415-420, 1997.
- OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S.O. Efeito da desinfestação e do uso de meios indicadores de contaminação na micropropagação de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.57-61, 2000.
- VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.62, n.4, 1985.
- VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; WILSON, G.F.; DE LANGHE, E. Phenotypic variation among *in vitro* propagated plantain (*Musa* sp., cultivar AAB). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 36, p. 79-84, 1988.
- 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**, Dordrecht, v.6, n.2, p.159-166, 1986.