

OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL



**Anais da XVI Jornada  
de Iniciação Científica da  
Embrapa Amazônia Ocidental**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Anais da XVI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**

*Cláudia Majolo  
Inocencio Junior de Oliveira  
Jony Koji Dairiki  
Maria Geralda de Souza  
Ronaldo Ribeiro de Moraes  
Editores Técnicos*

**Embrapa**  
*Brasília, DF*  
2020

**Embrapa Amazônia Ocidental**  
Rodovia AM-010, Km 29,  
Estrada Manaus/Itacoatiara,  
Manaus, AM  
69010-970  
Caixa Postal 319  
Fone: (92) 3303-7800  
Fax: (92) 3303-7820  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Unidade responsável pelo  
conteúdo e edição**  
Embrapa Amazônia Ocidental

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente  
*Everton Rabelo Cordeiro*

Secretária-executiva  
*Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros  
*José Olenilson Costa Pinheiro, Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa e Maria Perpétua Beleza Pereira*

Revisão de texto  
*Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica  
*Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa*

Projeto gráfico e editoração eletrônica  
*Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição  
*Publicação digital (2020)*

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Amazônia Ocidental

---

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (16 : 2019 : Manaus).  
Anais da XVI Jornada Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / Claudia Majolo ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2020.  
PDF (130 p.) : il. color.

ISBN 978-65-86056-10-5

1. Iniciação científica. 2. Comunicação científica. 3. Pesquisa. I. Majolo, Cláudia. II. Título. III. Embrapa Amazônia Ocidental.

CDD 501

# Melhoramento Genético

## Micropropagação de bananeira Pacovan em biorretor de imersão temporária

Daniele Simões Araújo<sup>1</sup>

Cibelle Azamora dos Santos<sup>2</sup>

Eduardo José Dias da Silva<sup>1</sup>

Ricardo Lopes<sup>3</sup>

Pamela Keiko Harada<sup>4</sup>

**Resumo** – O uso de biorreatores de imersão temporária (BIT) podem ser mais eficientes em comparação à micropropagação em meio semissólido (MSS). O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de BIT na multiplicação *in vitro* de banana 'Pacovan'. Gemas de banana 'Pacovan' foram utilizadas para micropropagação em MSS e BIT, utilizando o meio de cultura MS + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose + 2,5 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), sem e com suplementação de 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ±2 °C e fotoperíodo de 16 horas. Realizaram-se quatro subcultivos a cada 30 dias e ao final comparou-se o número de

---

<sup>1</sup>Bolsista de Iniciação Científica, Pibic/CNPq/Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

<sup>2</sup>Bolsista de Iniciação Científica, Pibic/Fapeam/Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

<sup>3</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

<sup>4</sup>Engenheira de alimentos, mestra em Processos Biotecnológicos, analista da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

brotos obtidos. No MSS foi obtida maior produção de brotos, indicando a necessidade de otimização do BIT para que este seja mais eficiente. A adição de AIA não teve efeito no número de brotações independentemente dos ambientes de cultivo.

**Termos de indexação:** *Musa* sp., platano, propagação in vitro.

## **Micropropagation of banana Pacovan using temporary immersion bioreactors**

**Abstract** – The use of bioreactors of temporary immersion (BTI) may be more efficient than micropropagation in semisolid medium (SSM). The aim of this study was to evaluate the potential of BTI to micropropagation of 'Pacovan' banana. Gems 'Pacovan' banana were used to micropropagation in SSM and BIT, using MS culture medium with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 2.5 mg L<sup>-1</sup> benzylaminopurine (BAP), with and without supplementation of 0.25 mg L<sup>-1</sup> indolacetic acid (AIA). The cultures were kept in a growth room with temperature of 25 °C ± 2 °C and photoperiod of 16 hours. Four subcultures were conducted and, in the end, evaluated the total number of shoots obtained. In SSM a larger number of shoots was produced than BTI, this result indicates the need of improved in the BTI system so that it is more efficient. IAA addition had no effect in the number of shoots produced, regardless of the system cultive.

**Index terms:** *Musa* sp., plantain, in vitro propagation.

## **Introdução**

Biorreatores são equipamentos para cultivo sob imersão temporária ou permanente de células, gemas, embriões ou qualquer tipo de propágulo que possa ser utilizado na micropropagação de plantas (Teixeira, 2002). A adaptação dessa tecnologia para as fábricas de produção massal de plantas (biofábricas) ocorreu por motivo de

problemas enfrentados na produção de mudas *in vitro* pelo processo tradicional em meio semissólido, no qual se utilizam frascos de vidro pequenos e selados. Dentre as vantagens relacionadas ao uso de biorreatores citam-se diminuição dos custos, aumento da qualidade das plantas produzidas, diminuição de mão de obra e aparelhos. Além disso necessita-se de espaço reduzido para os cultivos, há aumento significativo da taxa de multiplicação, menor estresse gasoso e mecânico, maior uniformidade das plantas produzidas e facilidade na aclimatização dos materiais cultivados. Como desvantagem tem-se a ocorrência de contaminação, que leva à perda de grande número de plantas e ao alto custo inicial de instalação do biorreator (Barrueto Cid, 2014; Gerald; Lee, 2014).

Dentre os diversos modelos de biorreatores desenvolvidos para o cultivo vegetal destacam-se os de imersão temporária, que são equipamentos fundamentados no princípio de que as plantas se desenvolvem melhor e mais rapidamente quando cultivadas em intervalos regulares de imersão em meio líquido seguido de drenagem (Debergh, 1982). Muito embora existam protocolos de micropropagação para várias culturas via sistema convencional (meio semissólido), tal como a bananeira, a automação desse processo com a adoção de biorreatores requer ajustes dos meios nutritivos no regime de imersão, nas dosagens específicas de oxigênio, nitrogênio e de gás carbônico, entre outros. De acordo com Lemos (1996), a composição do meio de cultura, o contato do meio com os tecidos e a sua oxigenação parecem influir fortemente na capacidade micropropagativa dos explantes.

De acordo com os resultados relatados na literatura, referentes ao uso de biorreatores para micropropagação da bananeira, justifica-se o desenvolvimento de protocolo específico para a multiplicação da bananeira Pacovan, amplamente produzida e consumida no Amazonas.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, em esquema fatorial simples, com dois ambientes de cultivo (biorreator e meio semissólido) e duas composições de meio (com e sem ácido indolacético) no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada unidade experimental representada por um frasco com oito explantes.

Como explantes foram utilizadas gemas laterais e apicais retiradas de mudas de banana 'Pacovan' do tipo chifrinho. O material coletado no campo foi levado ao laboratório para limpeza inicial, eliminando-se camadas externas até reduzir os explantes para dimensões aproximadas de 3 cm a 4 cm de pseudocaule e 3 cm a 4 cm de rizoma. Os explantes foram limpos em água com detergente comercial, lavados em água corrente e levados em recipiente contendo água estéril para a câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada. A desinfestação foi feita com álcool 70% + Tween 20 por 2 minutos, seguida de tratamento com solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% por 10 minutos, depois lavagem em água destilada estéril. Em seguida foi realizada a redução dos explantes retirando-se as bainhas de folhas até a obtenção de gemas com 1,5 cm a 2,0 cm, que permaneceram imersos em solução antioxidante até o momento de serem inoculados no meio de cultura.

O estabelecimento dos explantes (subcultivo 0) foi feito em meio de cultura basal composto por sais e vitaminas do meio MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e geleificado com 0,6% de ágar e pH ajustado a 5,8, previamente autoclavados a 121 °C por 15 minutos e 1,2 atm de pressão. Nos 10 primeiros dias, os explantes foram mantidos em ambiente escuro em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2 °C, sendo ao final contabilizados e eliminados aqueles contaminados e/ou oxidados. Após 20 dias, as culturas foram transferidas para ambiente com lumi-

nosidade de 30-40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtida com lâmpadas LED e fotoperíodo de 16 horas. O subcultivo 0 foi conduzido por 30 dias, quando foi iniciada a fase de multiplicação nos diferentes tratamentos.

Para multiplicação os explantes foram transferidos para dois ambientes de cultivo: (1) frascos de biorreatores de imersão temporária contendo meio líquido e (2) frascos com meio de cultura semissólido. Em ambos os ambientes de cultivo foi utilizado o meio MS suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 4,5 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), sem e com a suplementação de 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA). No meio semissólido foi utilizado o agente geleificante ágar (0,6%).

No sistema de biorreatores foi utilizado frasco de vidro com volume de 2,5 L e 200 mL a 400 mL de meio MS líquido de acordo com a fase de cultivo. O aumento no volume do meio foi necessário, pois, com a multiplicação dos explantes, o volume inicial se tornou insuficiente para nutrição adequada dos brotos gerados. No cultivo em meio semissólido, no primeiro e segundo subcultivos foram utilizados frascos de vidro com volume de 1,3 L e 200 mL de meio MS, no terceiro e quarto subcultivos foram utilizados frascos de vidro com volume de 0,2 L e 40 mL de meio de cultura.

O tempo de imersão dos explantes no biorreator foi de 10 minutos com intervalos de 4 horas. Foram realizados quatro subcultivos com duração de 30 dias nos dois primeiros subcultivos e de 15 dias nos dois subsequentes. O tempo de subcultivo foi reduzido devido à oxidação dos explantes; e o aumento no consumo do meio, devido ao aumento do número de brotações. No momento da transferência do material para os subcultivos, as brotações emitidas foram individualizadas.

Após os subcultivos da fase de multiplicação, as brotações de ambos os sistemas (MSS e BIT) foram transferidas para meio de enraizamento semissólido em frascos. Nessa fase foi utilizado o meio

MS com metade da concentração de sais/nutrientes do meio completo. Na transferência do meio de multiplicação para o de enraizamento foi contabilizado o número total de brotos obtidos a partir de cada unidade experimental. Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ).

## Resultados

Os resultados da análise de variância indicaram efeito significativo para ambiente de cultivo, ou seja, que existe diferença entre os tratamentos biorreator de imersão temporária (BIT) e meio semissólido (MSS), contudo não foram significativos os efeitos da adição do AIA no meio de cultivo, bem como da interação entre ambiente de cultivo e AIA (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resumo da Anova para número de brotos de bananeira Pacovan obtido a partir da micropropagação em dois ambientes de cultivo (meio semissólido e meio líquido em biorreator) utilizando meio de cultura MS com benzilaminopurina, sem e com a adição de ácido indolacético (AIA).

Fonte de variação	GL	QM	F	Probabilidade
Ambiente de cultivo (AC)	1	421673	5,9696	0,04036 *
AIA (A)	1	2545	0,0360	0,85419 ns
ACxM	1	19373	0,2743	0,61468 ns
Resíduo	8	70637	CV = 70,87%	

\* e ns, respectivamente, significativo e não significativo pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

O número de brotações de bananeira Pacovan obtido por unidade experimental em MSS (533,4) foi estatisticamente superior ao obtido no BIT (153,2), já as médias referentes aos tratamentos com (357,6) e sem (392,3) AIA não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 2).

**Tabela 2.** Comparação do número médio de brotações de bananeira Pacovan obtido a partir do cultivo em meio líquido em biorreator e em meio semissólido.

Ambiente de cultivo		Composição do meio de cultivo	
Biorreator	53,2 b	MS+BAP	392,3 a
Semissólido	533,4 a	MS+BAP+AIA	357,6 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

## Discussão

O número médio de brotações obtido no cultivo em MSS foi superior ao BIT, diferente dos resultados da literatura, que indicam que a taxa de multiplicação de brotos de bananeira em BIT é superior à obtida em MSS (Lemos et al., 2001; Debiasi, 2014). Esse resultado, divergente da literatura, pode ser devido à necessidade de ajustes no sistema de cultivo no biorreator, por exemplo: tempo de imersão, intervalo entre tempo de imersão, tempo de subcultivo e volume de meio. Diferente do sistema de cultivo em biorreator, a metodologia para micropropagação in vitro da bananeira Pacovan utilizando meio semissólido foi anteriormente otimizada no laboratório (Façanha et al., 2017, 2018).

Na primeira tentativa de cultivo no biorreator, todas as unidades experimentais foram perdidas por contaminação, por isso foi preciso reinoculação dos explantes para realização do experimento. A contaminação decorreu do excesso de manipulação dos frascos do sistema do biorreator, isso devido a vazamentos de ar, o que exigiu a troca de tampas e conexões, aumentando assim o risco de contaminação. Destaca-se que o sistema utilizado não é comercial, e sim construído no laboratório, e necessita de aperfeiçoamento. Durante o experimento foram realizadas melhorias no sistema de vedação das conexões, reduzindo vazamentos e evitando maior manipulação para reparos, o que refletiu na redução da contaminação das unidades amostrais. A perda final de unidades amostrais foi de 37,5% no sistema de biorreator e de 12,5% no cultivo em meio semissólido.

Recomenda-se que os próximos experimentos sejam realizados com variação no tempo de imersão dos explantes e no tempo de intervalo entre os períodos de imersão, bem como ajuste no volume de meio de cultura utilizado nos frascos.

## Conclusão

O meio semissólido foi superior na indução de brotações em relação ao biorreator. Variáveis do cultivo em biorreator, como tempo de imersão, volume do meio e tempo de subcultivo, precisam ser ajustadas para obter maior taxa de multiplicação.

O regulador de crescimento AIA não teve efeito no número de brotações obtido, independentemente do ambiente de cultivo.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica do Programa Pibic; à assistente do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental Rosimar Fernandes de Souza, pelo apoio nas atividades de laboratório; e à Fazenda Amazônia, por disponibilizar as mudas utilizadas para obtenção dos explantes.

## Referências

BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325 p.

DEBERGH, P. C. Physical properties of culture media. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 5., 1982, Tokyo. **Plant tissue culture 1982**; proceedings. Tokyo: Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982. p. 135-136.

DEBIASI, C. Utilização de biorreatores de imersão temporária em uma biofábrica de cultura de tecidos vegetais. In: GERALD, L. T. S. **Biofábricas de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 2014. p. 100-117.

FAÇANHA, D. C.; MOTTA, D. N.; PEREIRA, M. C. N.; QUISEN, R. C. Uso de BAP e metatopolina na indução e proliferação de brotações in vitro da bananeira cultivar Pacovan. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 14., 2017, Manaus. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 57-66. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/185542/1/XIV-Jornada-IC-57.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2020.

FAÇANHA, D. C.; QUISEN, R. C.; MOTTA, D. N.; PEREIRA, M. C. N. Multiplicação in vitro de bananeira cv Pacovan: citocininas e pré-multiplicação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 21.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 8., 2017, Bonito. **Anais...** [S.l.]: SBFP: ABCTP, 2017. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/168908/1/MULTIPLICACAO-IN-VITRO-DE-BANANEIRA-CV-PACOVAN-CITOCININAS-E-PRE-MULTIPLICACAO.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2020.

GERALD, L. T. S.; LEE, L. L. Biofábrica de plantas: por que biorreator? In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 2014. p. 14-31.

LEMOS, E. E. P. **Experimentos em micropropagação e organogênese na graviola (*A. muricata* L.)**. Maceió: EDUFAL, 1996.

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

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

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, p. 36-41, 2002.