

EFEITO DE AGENTES DESINFESTANTES E ANTIOXIDANTES NO ESTABELECIMENTO DE ÁPICES CAULINARES *IN VITRO* DE CULTIVARES DE BANANEIRA

LACERDA¹, Fernando da Costa Brito, LEMOS², Oriel Filgueira

INTRODUÇÃO

A propagação de bananeira é feita tradicionalmente, a partir de rebrotos ou perfilhos que surgem lateralmente à planta mãe no campo. Em geral, esse processo demanda tempo, baixo taxa de multiplicação e favorece a disseminação de doenças e pragas para outras áreas. Diante disso, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de controlar a propagação em massa de mudas, utilizando-se de técnicas biotecnológicas modernas, especificamente a micropropagação ou multiplicação *in vitro* (Dhed'a et al., 1991).

A micropropagação, comumente usada na produção de mudas de novas cultivares de bananeira desenvolvidas por programas de melhoramento genético, consiste em isolar ápices vegetativos de plantas selecionadas e cultivá-los em condições assépticas que propiciem a multiplicação de brotos a partir do material inoculado (Quisen et al., 2002). Apresentando vantagens como alta taxa de multiplicação, uniformidade fisiológica do material, disponibilidade de propágulos livres de doenças durante o ano inteiro, uniformidade nas brotações, entre outras (Arias, 1992).

Contudo, existem alguns fatores que limitam a micropropagação da bananeira, sendo eles as altas taxas de oxidações, resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro* precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado (Van Winkle et al., 2003) o que compromete a absorção de metabólicos pelo explante; e a grande incidência de contaminação fúngica e/ou bacteriana, proveniente do explante ou do meio ambiente.

Comumente utilizam-se substâncias antioxidantes em meios de cultura para reduzir as taxas de oxidação. Dentre as mais usadas, destaca-se o carvão ativado como eficiente, entretanto, não se tem bom entendimento de seus efeitos. Ebert et al. (1993); Pan & Van Standen (1998), observaram que além de metabólicos tóxicos, como os fenólicos, o carvão ativado pode absorver hormônios (auxinas e citocininas) e produtos do metabolismo da planta (exudados).

Os agentes contaminantes (fungos e bactérias) agem de forma indireta comprometendo o desenvolvimento normal dos cultivos pela competição por nutrientes e vitaminas do meio de cultura e pela produção de metabólitos fitotóxicos como os ácidos láctico e acético, e o cianeto (Lima e Moraes et al., 2006).

1 Bolsista do PIBIC/EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. Acadêmico do curso de Engenharia Florestal 7º Semestre UFRA

2 Pesquisador Dr. Embrapa Amazônia Oriental

VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA Amazônia Oriental/2008

A maior incidência de contaminações ocorre na fase de estabelecimento do explante. Braga et al. (2001), por exemplo, observaram que em experimentos com cultivar Caipira, as perdas podem chegar a 75% dos explantes na fase de estabelecimento, o que pode inviabilizar a multiplicação em nível comercial, por onerar os custos de produção.

O controle dessas contaminações é feito com o uso de fungicidas e antibióticos (ação bacteriostática ou bactericida) que irão atuar sob contaminantes superficiais e endógenos presentes nos explantes, sendo esses últimos os que representam maior problema no estabelecimento *in vitro* de bananeiras.

O presente estudo teve por objetivo estabelecer a fase de estabelecimento de explantes de diferentes cultivares de bananeira submetidas por meio de processo de assepsia com o fungicida sistêmico Derozol (Grupo dos Benzimidazóis) e o antibiótico Cefalexina como estratégias de controle da contaminação fúngica e bacteriana, e com a utilização de substâncias antioxidantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da EMBRAPA Amazônia Oriental, em Belém-PA. Para o fornecimento de explante, utilizaram-se rizomas de mudas do tipo chifrinho com aproximadamente 30 cm de altura das seguintes variedades: Caipira, Thap maeo, IAC 2001, PV 0376, Pacovan Ken, Pacovan ken II, Caprichosa e Preciosa. A coleta foi realizada no banco de germoplasma de bananeiras da Embrapa.

Logo após a coleta, os rizomas passaram por um processo de assepsia que iniciou no local onde foram coletados, sendo submetidos a uma limpeza mecânica, removendo-se as raízes e o pseudocaule.

No laboratório, sob condições mais assépticas, os rizomas foram lavados com sabão neutro e água corrente e seccionados a um volume de aproximadamente 2,5cm³ e em seguida imersos a uma solução de Derozol a 500 ppm por 15 minutos, iniciando o processo de desinfestação.

Na câmara de fluxo laminar os rizomas foram imersos em álcool a 70% por 60 segundos e por 15 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5%, sendo imediatamente lavados quatro vezes em água destilada autoclavada.

Depois de lavados, os rizomas foram mais uma vez seccionados passando medir cerca de 1,5cm (0,5 cm de rizoma e 1 cm de primórdios foliares), sendo imersos agora a uma solução de cefalexina a 100 ppm por 15 minutos, objetivando o controle de bactérias endofíticas dos explantes .

Os explantes foram inoculados em frascos de 300ml contendo 40ml de meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementados pelos seguintes tratamentos:

- T1: BAP (benzilaminopurine) 5mg/l + Carvão Ativado 0,2%;
- T2: BAP (benzilaminopurine) 5mg/l + PVP (Polivinilpyridina) 0,2%.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem que foi realizada por 20 minutos a 123°C e 1,3 atm. Os rizomas foram mantidos por três dias no escuro e depois em sala de crescimento na temperatura de $24 \pm 3^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16h luz branca fria e irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A avaliação foi feita semanalmente, durante 30 dias de cultivo, utilizando-se como variáveis a taxa de oxidação e contaminação e o número de brotações emitidas por ápice caulinar. As análises foram feitas de forma descritiva em relação aos efeitos observados durante o período de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após uma semana de cultivo, observou-se que os ápices caulinares apresentaram uma mudança significativa de cor, passando de creme para uma coloração esverdeada com presença de algumas pontuações escuras que provavelmente teriam sido provocadas pela oxidação superficial dos mesmos, o que foi verificado também por Domingues et al. (1995), em experimento de micropropagação e enraizamento com o cultivar maçã. Nesse mesmo período, verificaram-se contaminações bacterianas nas cultivares Thap Maeo e IAC 2001 (ambos do tratamento 2), que não sobreviveram após 20 dias, que pode estar relacionado às dificuldades de absorção dos compostos do meio de cultura e a toxicidade dos exsudados das bactérias (Figura 1). Pereira et al. (2003) explica que, quando no meio de cultura as condições se tornam favoráveis ao desenvolvimento das bactérias, estas passam a competir com os explantes por nutrientes, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos explantes, podendo, inclusive, leva-los à morte.

Em virtude da incidência ter sido de apenas duas contaminações, podemos inferir que elas foram adquiridas durante a manipulação. LEIFERT et al. (1994) observou que bactérias do gênero *Bacillus* são bastante tolerantes ao calor, podendo os esporos resistir a temperaturas de mais de 100°C e a tratamentos com álcool e hipoclorito de cálcio ou sódio, sendo possível, as bactérias resistirem às flambagens das pinças e bisturis no processo de manipulação dentro de câmara de fluxo laminar e também a autoclavagem dos meios e dos frascos. A assepsia mostrou-se, portanto, bastante eficiente, principalmente no controle de contaminações fúngicas, que foi inexistente, onde o Derozol demonstrou eficiência.

Passado aproximadamente vinte dias, verificou-se que os explantes sofreram um intumescimento, crescendo significativamente (Figura 2). A primeira brotação foi visualizada na cultivar Caprichosa (Tratamento 1) no 25º dia. Domingues et al. (1995), verificou que as primeiras brotações surgem após 25-35 dias de cultivo, onde em 45 dias, cada ápice caulinar pode emitir uma média de 5 a 6 brotos. Entretanto, isso não foi verificado nesse estudo, onde se observou uma baixa taxa de brotações em ambos os tratamentos e em todas as cultivares, apresentando no máximo 3 brotações (Figura 3) por ápice caulinar (cultivar Caprichosa, tratamento 1). Isso pode ser explicado pelo fato da avaliação não

ter se estendido mais de 30 dias, mas com chance dos explantes terem emitido brotações após esse período. Os compostos utilizados no processo de assepsia, também podem ter influenciado de forma negativa, inibindo as brotações.

A taxa de oxidação foi maior no tratamento 2, onde se utilizou o PVP como substância antioxidante. Isso demonstra que embora não se tenha conhecimento mais amplo sobre os efeitos negativos ocasionados pela utilização de carvão ativado como substância antioxidante em meios de cultura, este apresentou mais eficiência nesse estudo.

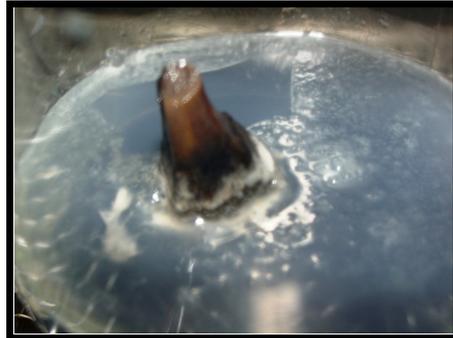


Figura 1: Explante da cultivar IAC 2001 necrosado devido contaminação bacteriana

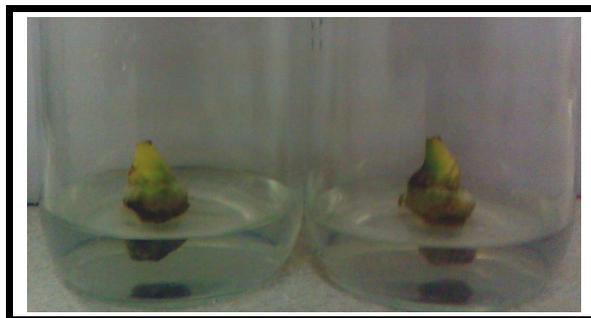


Figura 2: Explantes intumescidos e esverdeados após 20 dias de cultivo *in vitro* (T2)

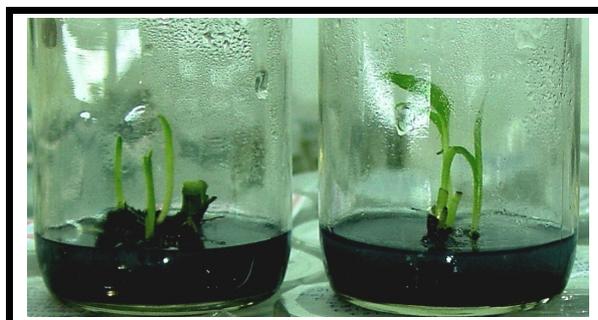


Figura 3: Brotações emitidas pela cultivar caprichosa (T1)

CONCLUSÃO

O fungicida Derozol e o antibiótico Cefalexina apresentam eficiência na desinfestação de explantes de bananeira, entretanto, interferem na emissão de brotos. O carvão ativado é mais eficiente que o PVP no controle da oxidação dos explantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, O. **Commercial micropropagation of banana**. In.: BIOTECHNOLOGY applications for banana and plantain improvement. San Jose, Costa Rica: Inibap, 1992. p.139-142.

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

Dhed'a D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke & E. Langhe. 1991. **Plant regeneration in cell suspension cultures of cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group)**. Fruits, 46 (2): 125-135.

DOMINGUES, E.T.; NETO, A.T.; MENDES, B.M.J. **Cultura de apices caulinares de *Musa* sp. var. Maçã: estabelecimento, micropropagação e enraizamento *in vitro***. Sci. agric. (Piracicaba, Braz.) vol.52 no.2 Piracicaba May/Aug. 1995.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. **Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrech, v.33, p.157–162, 1993.

LEIFERT, C. et al. **Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants; reasons for contamination problems *in vitro***. Critical Reviews in Plant Science, v.13, n.2, p.139-183, 1994.

LIMA, J.D., MORAES, W.S. **Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*musa* aaa cv. caipira)**. Pesquisa Agropecuária Tropical, 36 (3): 181-186, 2006 – 181.

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

PAN, J.J.; VAN STADEN, J. **The use of charcoal in *in vitro* culture – a review**. Plant Growth Regulators, The Hague, v.26, p.155-163, 1998.

PEREIRA, J. E. S. & G. R. de L. FORTES. 2003. **Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de batata em meios semisólido e líquido**. Pesq. Agrop. Bras., 38 (11): 1273-1279.

QUISEN, R. C. **Multiplicação in vitro de bananeira cv. Pelipita (ABB) e cv. Prata Ken (AAAB)** .
In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura: Os novos desafios da fruticultura brasileira, 2002,
Belém. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Belém : Embrapa/CPATU, 2002.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G.S. **The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media**. Plant Cell Report, New York, v.21, p.1175-1182, 2003.