PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BANANEIRA CULTIVAR PRATA ZULU[1]

Regina Caetano QUISEN[2]
Adriana de Oliveira MARI[3]
Christiane de Oliveira LOPES[3]

RESUMO: A pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de estabelecer as melhores condições para a produção *in vitro* da bananeira cultivar Prata Zulu. A assepsia consistiu na imersão dos explantes em álcool 70% e em hipoclorito de sódio comercial (50%), seguida de lavagens em água e inoculação para o estabelecimento em meio MS básico por 30 dias. Para a multiplicação de ápices caulinares da cultivar, foram testadas quatro concentrações de BAP (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg L^{-1}) em meio MS, e cinco diferentes meios para o enraizamento das brotações (½ MS; MS; MS + 2 mg L^{-1} de ANA; MS + 4 mg L^{-1} de ANA; MS + 8 mg L^{-1} de ANA). Os resultados demonstraram que a concentração de BAP de 5 mg.L^{-1} apresentou melhor taxa de multiplicação (21,95 plântulas/explante), enquanto que dosagens maiores do regulador de crescimento inibiram a formação de brotações sadias. O meio ½ MS foi eficiente no enraizamento *in vitro*, enquanto que alta taxa de sobrevivência obtida no processo de aclimatização adotada foi satisfatória para a cultivar Prata Zulu.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Cultura de Tecidos, Micropropagação, *Musa* spp., Sigatoka Negra, Bananeira.

IN VITRO PROPAGATION OF BANANA CV. SILVER ZULU

ABSTRACT: This work was carried out to establish the best conditions for the production in vitro of banana cv. Prata Zulu. The plant material was dipped into 70% alcohol, commercial sodium hypochorite (50%) and rinsed in sterile water. Four concentrations of BAP (2.5; 5.0; 7.5 and 10.0 mg L-1) were utilized in MS medium to induce the multiplication of shoot tip apices and five different medium were tested to rooting phase. The results showed that 5.0 mg.L-1 BAP induced the highest number of plants (21.95 plantlets/explant) and higher concentrations of the growth regulator inhibited the formation of healthy bud. The ½ MS medium was effective to rooting and the survival in acclimatization method used was satisfactory.

INDEX TERMS: Tissue Culture, Micropropagation, *Musa* spp., Sigatoka Negra.

---

[1] Aprovado para publicação em 21.06.2004
[2] Engenheira Agrônoma, M. Sc., Pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Caixa Postal 319, CEP 69011-970. E-mail: rquisen@cpaa.embrapa.br
[3] Bolsista Embrapa – PIBIC/CNPq, Manaus (AM)

1 INTRODUÇÃO

Apesar de ser considerada uma das frutas mais consumidas no Brasil, a produtividade média de banana no país é de 10 t/ha/ano (PEREIRA et al., 1999), sendo que dentre os vários fatores responsáveis por este baixo rendimento, algumas doenças vêm causando grande prejuízo a esta cultura.

A sigatoka negra é considerada uma das doenças mais importantes e mais destrutivas da cultura a nível mundial, pois, em ataques severos pode causar a perda de até 100% da produção de um bananal (GASPAROTTO; PEREIRA; PEREIRA, 2000).

Dentre as cultivares testadas quanto à resistência à sigatoka negra, Pereira et al. (2002) recomendam a Prata Zulu por apresentar baixa incidência de doenças foliares, como a sigatoka negra e amarela, além da boa produtividade, presença de pedicelos rígidos e comercialização imediata nos mercados consumidores de banana das cultivares Prata comum e Maçã.

Na escolha correta da cultivar a ser utilizada é muito importante observar a qualidade da muda utilizada, visto que os sistemas convencionais de produção de mudas podem favorecer a disseminação de pragas e doenças de bananais contaminados para novas áreas.

Neste sentido, a utilização da propagação *in vitro*, técnica que consiste no isolamento de parte de uma planta e cultivo em um meio nutritivo sob condições assépticas, tem proporcionado a produção de mudas de qualidade, através da limpeza e/ou multiplicação de cultivares de interesse.

A produção comercial de mudas de bananeira por meio de cultura *in vitro* de ápices caulinares tem sido empregada com sucesso em vários países, possibilitando a produção de mudas superiores e praticamente livres de doenças comuns às diversas cultivares de *Musa* spp (MENDES et al., 1996). De acordo com Sanada (1993), mudas micropropagadas produzem 30% mais do que mudas obtidas convencionalmente, permitindo, além de uma colheita sincronizada, um maior vigor das plantas, maior produção e menor variabilidade nos frutos.

A adequação de protocolos para a multiplicação *in vitro* de cultivares de bananeira de interesse comercial ou para o melhoramento genético vem despertando o interesse de instituições de pesquisas e laboratórios comerciais, pois as taxas de proliferação obtidas não são uniformes entre os diferentes cultivares testadas, em função de diferentes aspectos, como o tipo e tamanho do explante, meio nutritivo, número de subcultivos e estado fisiológico do tecido.

A cultivar Prata Zulu se caracteriza pelo sabor agridoce, semelhante ao da cultivar Prata comum, apresenta alto nível de resistência à sigatoka negra, boa produtividade e presença de pedúnculos rígidos, que lhe confere resistência ao despencamento. Para produzir um cacho ideal, a bananeira precisa de dez folhas saudáveis. No caso da Prata Zulu, essa quantidade ultrapassa a média,

desenvolvendo uma resistência horizontal que atua na velocidade do ataque do fungo e permite que o desenvolvimento do fruto seja mais rápido que a ação da sigatoka negra, a qual atinge todas as espécies de bananas comercializadas.

Neste sentido, em função da demanda crescente por mudas de qualidade genética e livres de patógenos, esta pesquisa teve por objetivo estabelecer as melhores condições *in vitro* de desinfestação, estabelecimento, multiplicação e desenvolvimento de bananeira da cultivar Prata Zulu.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Ocidental, município de Manaus, Amazonas.

Inicialmente, os explantes de *Musa spp.* cv Prata Zulu provenientes de gemas laterais de plantas selecionadas em campo foram reduzidos a dimensões aproximadas de 3 cm de pseudocaule, 2 cm de rizoma e 2 cm de diâmetro, para então serem lavados em água com detergente comercial por 10 minutos e mantidos em água corrente por 5 minutos e levados em água estéril para a câmara de fluxo laminar.

A assepsia dos explantes consistiu na imersão em álcool 70% + tween 20 por 2 minutos, seguida de tratamento com solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% por 5 minutos. Posteriormente, procederam-se cinco lavagens em água destilada autoclavada, para a retirada dos resíduos dos produtos desinfetantes no material vegetal.

Com auxílio de pinças e bisturis esterilizados, foram retiradas as bainhas das folhas e tecidos do rizoma até os explantes atingirem o máximo de 1 cm de rizoma e 1,5 cm de pseudocaule.

Após redução, as gemas apicais foram inoculadas individualmente em tubo de ensaio contendo meio com sais básicos e vitaminas de MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg L^{-1} de inositol, 2 mg L^{-1} de glicina, 30 g L^{-1} de sacarose. O meio foi solidificado pela adição de ágar a 6% (p/v) e o pH ajustado para 5,8 ± 0,1, com o uso de KOH ou HCl a 0,1 ou 1,0 N.

As culturas foram mantidas por sete dias no escuro e, posteriormente, em intensidade luminosa de 25 $W.m^{-2}$, temperatura de 26 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas, até completar 4 semanas de estabelecimento. O experimento foi avaliado diariamente, observando-se o nível de contaminação dos explantes por fungos e bactérias.

A proliferação dos segmentos foi feita em meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, determinando os seguintes tratamentos: (1) 2,5 $mg.L^{-1}$, ; (2) 5 $mg.L^{-1}$, (3) 7,5 $mg.L^{-1}$ e (4) 10,0 $mg.L^{-1}$. No momento da transferência, os explantes foram segmentados em duas partes simétricas, visando a quebra da dominância apical, e mantidos nas mesmas condições de cultura da fase anterior. Foram efetuados três subcultivos em intervalos de 30 dias, com a subdivisão e transferência dos brotos

formados para novo meio de cultura de mesmo tratamento e avaliação do número de brotações emitidas.

Ao final de 90 dias, as brotações com 1,5 a 2 cm de altura foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio para a indução ao enraizamento, de acordo com os seguintes tratamentos: (1) ½ MS; (2) MS; (3) MS + 2 mg. L^{-1} de ANA; (4) MS + 4 mg. L^{-1} de ANA e (5) MS + 8 mg. L^{-1} de ANA. Os frascos foram mantidos por 30 dias nas mesmas condições de crescimento das fases anteriores, sendo avaliados ao final de trinta dias o número e o comprimento das raízes formadas por plântula.

Em ambas as fases, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo quatro tratamentos para a multiplicação e cinco tratamentos no enraizamento com dez repetições cada.

Finalizado o período de enraizamento, os frascos de cultura foram destampados e mantidos na sala de incubação por 12 a 15 h. Após este período, as plântulas foram lavadas em água destilada, transferidas para casa de vegetação com sombreamento de 70% e plantadas em copos plásticos com fundo perfurado contendo substrato esterilizado composto de vermiculita e areia (2:1). Após o plantio e irrigação, foram colocados copos plásticos transparentes perfurados na extremidade superior sobre cada planta por um período de cinco dias, visando manter a umidade inicial. A irrigação foi realizada diariamente e adubação foliar semanal com macro e micronutrientes. Após 60 dias, foi avaliada a taxa de sobrevivência das plântulas para, então, serem transferidas para viveiro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de assepsia adotado neste trabalho apresentou um aproveitamento de 89% dos explantes inoculados. Esta taxa pode ser considerada razoável, pois a fase de estabelecimento *in vitro* de bananeira é normalmente marcada por elevados índices de perdas devido à contaminação por fungos e bactérias.

A definição deste percentual de contaminação baixo é muito importante e decisivo no desenvolvimento da micropropagação comercial de uma determinada cultura, sendo desejável o aumento da eficiência no estabelecimento do processo, através da melhoria dos diversos fatores relacionados ao controle fitossanitário.

Na fase de multiplicação, observou-se na primeira semana a turgescência dos explantes, sendo que, nas semanas seguintes, ocorreram o lançamento e o desenvolvimento de brotações, com coloração esverdeada e crescimento diferenciado de acordo com o tratamento.

Ainda durante a proliferação, verificou-se uma perda de material (10%), devido à oxidação dos explantes, decorrente da liberação de compostos fenólicos pelas células danificadas pelos cortes durante as repicagens.

Nestes casos, como forma de controle da oxidação recomenda-se diminuir o tempo entre subcultivos para 20 a 25 dias, fase de crescimento ativo das partes aéreas e de máximo vigor de crescimento da cultura; além da inclusão de agentes antioxidantes, tais como ácido ascórbico, PVP ou ácido cítrico, no meio de cultura.

Como pode ser observado na Tabela 1, as concentrações de BAP na indução e desenvolvimento das brotações diferiram estatisticamente aos 30 e 60 dias de cultura nos dois primeiros subcultivos, o mesmo não ocorrendo no 3º subcultivo, aonde não houve diferença significativa entre as concentrações de BAP.

Em termos de produção média de brotos, obtiveram-se valores de 2,9; 2,7 e 2,8 para 30, 60 e 90 dias, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Wong (1986), que, trabalhando com a cultivar Mysore, obteve a média de três brotos em condições de cultura similares.

Mesmo comportamento foi observado por Souza et al. (1995), que comparando a eficiência de cinco níveis de BAP na multiplicação da bananeira Caipira, concluiram que a concentração de 2,5 $mg.L^{-1}$ apresentou a melhor taxa de proliferação, enquanto que 10 $mg.L^{-1}$, menor produção de brotos. Oliveira e Silva (1997), por sua vez, alcançaram resultados satisfatórios na multiplicação das cultivares Nanicão e Grande Naine, utilizando a concentração de 4 $mg.L^{-1}$ de BAP.

Apesar desta diferença ter ocorrido somente nos primeiros cultivos, observou-se que a média final de brotações formadas no tratamento com 5 $mg.L^{-1}$ de BAP, mesmo ligeiramente superior às demais dosagens, refletiu na taxa de multiplicação média por explante.

Na análise de regressão obteve melhor ajuste a função polinomial de 2º grau, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,94, sendo a função ajustada $y = 1,775 + 0,558\ x - 0,052\ x^2$, onde y = nº médio de brotações/

Tabela 1 – Efeito de BAP sobre a multiplicação in vitro de Musa sp. cv Prata Zulu, 2001.

BAP ($mg.L^{-1}$) em meio MS	Subcultivo			Nº médio de brotações	Taxa de multiplicação (média/explante)
	1º	2º	3º		
2,5 (T1)	2,4 [b]	3,2 [a]	2,9 [a]	2,8	21,95
5,0 (T2)	4,0 [a]	3,0 [a]	3,3 [a]	3,4	39,30
7,5 (T3)	2,8 [ab]	2,8 [a]	3,0 [a]	2,9	24,39
10,0 (T4)	2,5 [b]	1,8 [b]	2,1 [a]	2,2	10,65
Média	2,9	2,7	2,8	...	...

Nota: a) médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade
b) sinal convencional utilizado: ... não se aplica dado numérico

tratamento e x = concentração de BAP (mg/L). De acordo com a Figura 1, observa-se que o valor médio máximo de brotações foi obtido na concentração de 5 mg/L, e o aumento da concentração acima deste valor causa a redução no número de brotações.

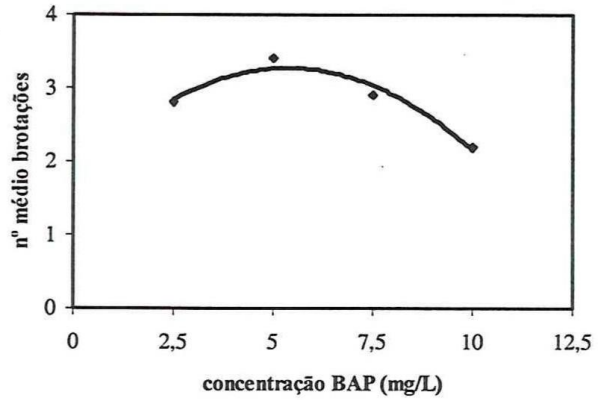

Figura 1 – Representação gráfica da relação entre concentração BAP e nº médio de brotações de Musa sp. cv Prata Zulu, 2001.

Esses dados demonstram quanto é importante a adequação do protocolo para as diferentes variedades de bananeira, pois considerando-se a taxa de multiplicação média obtida por explante ao final dos três subcultivos, o T2 resultou em quase o dobro da produção de plântulas do segundo melhor tratamento (T1); 39; 30 e 21,95 brotações, respectivamente.

Em termos de desenvolvimento, os tratamentos 1 e 2 (2,5 e 5,0 $mg.L^{-1}$) proporcionaram a formação de brotações de melhor qualidade, quando comparados aos demais tratamentos, visto que a presença de citocinina nos primeiros tratamentos promoveu o maior elongamento das brotações e expansão foliar, formando brotações de até 8 cm de altura ao final do terceiro subcultivo.

A adição de maiores concentrações de BAP (7,5 e 10 $mg.L^{-1}$), no entanto, provocou o desenvolvimento mais lento dos explantes, com redução no comprimento das brotações, lançamentos e abertura de folhas.

Segundo Narayanaswamy (1977), este comportamento deve-se à toxidez causada pelo excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura, que pode provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando na redução da taxa de multiplicação, encurtamento dos caules e dificultando a individualização das plantas e o processo de enraizamento.

Vários autores recomendam o uso de 2,5 a 5,0 $mg.L^{-1}$ de BAP, sendo este intervalo o mais eficiente na indução e desenvolvimento de raízes, visto que esta citocinina tem função primordial na divisão celular e pode estar envolvida na síntese de proteínas, fundamental ao processo de mitose, e atua também na quebra de dominância apical e na indução e crescimento de brotações (BENERJEE; DE LANGUE, 1985; VUYLSTEKE, 1988).

Na última fase *in vitro*, todos os tratamentos testados induziram o enraizamento, com surgimento dos primórdios radiculares ainda na primeira semana de cultura. Ao final de 30 dias, no entanto, apesar de não diferirem estatisticamente entre si (Figura 2), o meio com metade da concentração dos sais de MS (T1) produziu plântulas com maior equilíbrio entre as dimensões da parte aérea e sistema radicial.

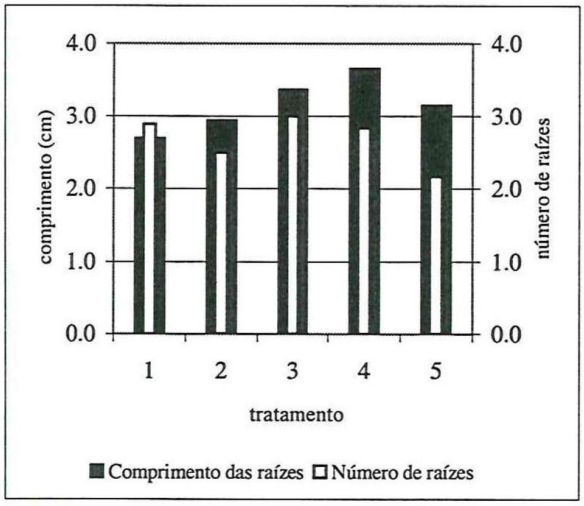

Figura 2 – Enraizamento in vitro de banana cv. Prata Zulu, 2001.

Este efeito da redução dos macronutrientes e da ausência de reguladores de crescimento no enraizamento foi descrito anteriormente por Grattapaglia e Machado (1990) e Sandoval, Brenes e Peréz Sánches (1991), sendo que, neste caso, ademais da obtenção de mudas de melhor qualidade, o T1 apresenta vantagem quando comparado aos demais, pela praticidade de preparo e, principalmente, pelo menor custo de produção do meio de cultura.

O processo de aclimatização das plântulas de bananeira, etapa fundamental para a sobrevivência do material quando transferido para viveiro, apresentou, ao final de 60 dias em casa de vegetação, uma taxa de sobrevivência de 85%.

As perdas ocorridas nesta fase devem-se, principalmente, às plântulas que *in vitro* possuíam parte aérea pouco alongada e rizoma pouco definido, proveniente dos tratamentos com citocinina em maiores concentrações na multiplicação.

4 CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos com a cultura de tecidos de bananeira cultivar Prata Zulu, foi possível concluir que:

a) a concentração de BAP de 5 $mg.L^{-1}$ apresentou melhor taxa de multiplicação (21,95 plântulas/explante), enquanto que dosagens maiores do regulador de crescimento inibiram a formação de brotações sadias;

b) o meio MS com metade da concentração dos sais foi efetivo no enraizamento *in vitro*;

c) a cultivar respondeu favoravelmente na condição de aclimatização formando mudas vigorosas ao final de 60 dias em casa de vegetação;

d) a pesquisa demonstrou a viabilidade da cultura de tecidos da bananeira cultivar Prata Zulu, através do processo de organogênese direta a partir de ápices caulinares, permitindo sua adoção por laboratórios e empresas de micropropagação comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

BANERJEE, N.; DE LANGUE, 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, n.6, p.351-354, 1985.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; PEREIRA, M.C.N. Monitoramento e controle da Sigatoka Negra (*Mycosphaella fijiensis*) da bananeira no estado do Amazonas. In: BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Delegacia Federal de Agricultura no Amazonas. *Relatório da Comissão de Defesa Sanitária Vegetal*. Manaus: CDSV/AM, 2000.

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

MENDES, B.M.; MENDES, F.J.; TULMANN NETO, A.; DEMETRIO, C.G.B.; PUSKE, O.R., Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.31, n.12, p.863-867, 1996.

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

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. *Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture*. Berlin: Springer Verlag, 1977. p.179-248.

OLIVEIRA, R.P. de; SILVA, S. de O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, n.4, 1997.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, M.C.N.; COSTA, M.M.; SILVA, S.O.; CORDEIRO, Z.J.M. Prata Zulu: nova cultivar de bananeira resistente à Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis*). In: BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Delegacia Federal de Agricultura no Amazonas. *Coletânea de trabalhos da CDSV/AM*. Manaus, 2002. p.37-44.

PEREIRA, L.V.; CORDEIRO, Z.J.M.; FIGUEIRA, A. dos R.; HINZ, R.H.; MATOS, A.P. de. Doenças da bananeira. *Informe Agropecuário*, v.20, n.196, p.137-147, 1999.

SANADA, M. Micropropagation of semitropical crop and its application to cultivation in Okinawa. In: THIQUYNH, N.; UYEN, N.V. (Ed.). *Adapted propagation technique for comercial crops of the tropics*. Stocholm: [s.n.], 1993. p.101-105.

SANDOVAL, J.A.; BRENES, G.; PÉRÉZ SÁNCHEZ, L. *Micropropagation de plátano y banano (Musa sp. AAB, AAA) en el CATIE*. Turrialba: CATIE, 1991. 24p. (Informe Técnico, 186).

SOUZA, F.V.D.; SILVA, S. de O.; SOUZA, A. da S.; SHEPHERD, K. Taxas de multiplicação *in vitro* da bananeira triploide caipira em cinco niveis de benzilaminopurina (BAP). *Magistra*, v.7, n.7, p.117-125, 1995.

VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; WILSON, G.F.; DE LANGUE, E. Phenotipic variation among in vitro propagated plantain (*Musa* sp. cultivar AAB). *Scientia Horticulturae*, v.36, p.79-88, 1988.

WONG, W.C. In vitro propagation of banana (*Musa* spp.): iniciation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.6, n.2, p.159-166, 1986.