

## Resposta da cv. Caipira (*Musa spp.*, grupo AAA) a diferentes doses de BAP nas fases de estabelecimento e multiplicação da micropropagação.

Brito, Lucila Karla Felix Lima de<sup>1</sup>; Farias, MarluCIA Elias de<sup>2</sup>; Dutra, Maria de Fátima Batista<sup>3</sup>; Pereira, Edilma da Costa<sup>4</sup>; Macedo, Cristiane Elizabeth Costa de<sup>5</sup>; Oliveira, José Flamarion de<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Técnico de nível superior (NS) da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN) - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, R. Jaguarari, 2192 - CP 188, CEP 59062-500, Lagoa Nova, Natal, RN, fone/fax (84) 3232-2286/3232-5868, e-mail: [lucilaemparn@rn.gov.br](mailto:lucilaemparn@rn.gov.br); <sup>2</sup>Pesquisadora da EMPARN, fone (84) 3232-5850, e-mail: [marluCIAemparn@rn.gov.br](mailto:marluCIAemparn@rn.gov.br); <sup>3</sup>Técnico NS da EMPARN, e-mail: [fatimadutra@rn.gov.br](mailto:fatimadutra@rn.gov.br); <sup>4</sup>Técnico NS da EMPARN, e-mail: [edilmabiotec2007@hotmail.com](mailto:edilmabiotec2007@hotmail.com); <sup>5</sup>Professora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Centro de Biociências – Departamento de Biologia Celular e Genética – Laboratório de Estudos em Biotecnologia Vegetal, Av. Sen. Salgado Filho, s/n, Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal, RN, fone: (84) 3215-3424, e-mail: [cristianemacedo@ufrnet.br](mailto:cristianemacedo@ufrnet.br); <sup>6</sup>Pesquisador da EMPARN – Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento, fone (84) 3232-5063, e-mail: [emparn@rn.gov.br](mailto:emparn@rn.gov.br).

### INTRODUÇÃO

Os benefícios da micropropagação para a agricultura são amplamente conhecidos: elevadas produtividade, homogeneidade e fitossanidade das mudas, em curtos períodos de produção (Torres et al, 1998). Assim, essa técnica também apresenta um papel de destaque na bananicultura.

No Brasil, a cv. Maçã é de grande aceitação. No entanto, essa cultivar é suscetível ao mal-do-panamá e ao mal-da-sigatoka (amarela e negra). Os danos causados por essas doenças levam a redução na produtividade do bananal e, com isso, a prejuízos financeiros para o produtor (Borges et al, 2004).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas cultivares resistentes a esses males. É na introdução rápida destas no cultivo comercial que a micropropagação têm se destacado como uma alternativa promissora. Isso porque, essa técnica permite a disseminação acelerada das cultivares elite e, com isso, pode contribuir para manutenção da rentabilidade do cultivo de banana (Braga et al, 2001).

Dentre os diversos genótipos elite atuais, têm-se a cv. Caipira. Esta é resistente ao mal-do-panamá e ao mal da sigatoka amarela e negra. Ainda, a cv. Caipira apresenta características de campo e fruto semelhantes a cv. Maçã (Borges et al, 2004).

A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é amplamente empregada na micropropagação de bananeira. A dose administrada pode variar entre 1 a 15mg.L<sup>-1</sup> BAP (Borges et al, 2006).

Braga et al (2001), trabalhando com a cv. Caipira (AAA), utilizaram o fitorregulador BAP, na dose de 5 mg.L<sup>-1</sup>, no estabelecimento e na multiplicação. Foi concluído que essa dose não estimulou uma proliferação de brotos eficiente. Foi sugerido que, ao longo das subculturas, a diminuição ou alternância do uso do fitorregulador poderia levar a resultados mais positivos.

Diante do exposto, este trabalho visou avaliar a resposta da cv. Caipira a diferentes doses de BAP, durante as fases de estabelecimento e aos primeiro e segundo subcultivos da fase de multiplicação.

### METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EMPARN, Parnamirim/RN. Perfilhos, do tipo chifre, foram coletados no Vale do Assu, em fevereiro de 2007. Após a coleta, o material foi lavado e reduzido a explantes com 15 x 7 cm, os quais compreendiam a região limítrofe entre o pseudocaule e o rizoma, onde se localiza o ápice caulinar da bananeira.

---

Trabalho financiado com recursos do Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNDECI do Banco do Nordeste do Brasil – BNB, processo nº 5547 281004797 1792001.

Em seguida, o material foi acondicionado em sacos plásticos em solução de HClONa a 0,05% e levado ao laboratório, sob refrigeração. Foi, então, enxaguado e reduzido a 5 x 2 cm. A desinfestação, em câmara de fluxo laminar, consistiu em: imersão em álcool etílico a 70% - 5min, imersão em HClONa a 2% - 30min; três enxágües em água destilada e esterilizada. Os explantes finais tinham dimensões de 1 x 0,5cm e foram inoculados individualmente.

Foi usado o meio básico, adaptado de Torres et al (1998), composto por macro e micronutrientes do meio MS, vitaminas de White, 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2g.L<sup>-1</sup> de phytigel® e 0,1g.L<sup>-1</sup> de inositol. O pH foi ajustado para 5,7. Foram usadas doses de 0 e 2,5mg.L<sup>-1</sup> de BAP no estabelecimento (**Est**) e 4,5 e 5mg.L<sup>-1</sup> de BAP na multiplicação (**Mult**). O material foi cultivado em 20ml e 40ml de meio de cultura nas fases **Est** e **Mult**, respectivamente.

A fase **Est** foi de trinta dias, com ausência de luz na primeira semana. Em seguida, cada explante foi subdividido longitudinalmente e subcultivado em frascos distintos. Na fase **Mult**, foram realizados subcultivos a cada trinta dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, esquema fatorial 2X2 (BAP na **Est** x BAP na **Mult**). Foram realizados quatro tratamentos: **T1**: 0mg.L<sup>-1</sup>BAP x 4,5mg.L<sup>-1</sup>BAP; **T2**: 0mg.L<sup>-1</sup>BAP x 5mg.L<sup>-1</sup>BAP; **T3**: 2,5mg.L<sup>-1</sup>BAP x 4,5mg.L<sup>-1</sup>BAP; **T4**: 2,5mg.L<sup>-1</sup> x 5mg.L<sup>-1</sup>BAP. Cada tratamento constou de três a quatro repetições, sendo uma repetição correspondente a um frasco de cultura.

A avaliação foi feita a cada vinte e oito dias. Foram avaliadas a incidência de oxidação (**Ox**), contaminação (**Co**), calogênese (**Ca**) e proliferação de propágulos (**PP**), na fase **Est** e nos dois primeiros subcultivos da fase **Mult**.

A análise estatística foi feita no aplicativo Microsoft® Excel 2002. A estatística descritiva forneceu a distribuição da **Ox**, **Co**, **Ca** e **PP** nos diferentes tratamentos. Para comparar a distribuição de **Ox**, **Co** e **Ca**, foi usado o teste do qui-quadrado. Para comparar a **PP**, foi usado o teste de Kruskal-Wallis. Quando possível, as diferenças observadas foram avaliadas pelo teste de Dunn. O nível de significância usado foi de 5%, no primeiro subcultivo e 10%, no segundo, devido ao tamanho das amostras e a maior variabilidade dos dados obtidos neste último.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase **Est**, foi observado a incidência de **Ox** na região do rizoma. Entretanto, durante a repicagem, observou-se que esta ocorreu superficialmente e não atingiu porções internas do tecido, sendo facilmente removida. Resultados similares foram obtidos por Mendes et al (1999), na cv. Maçã. Na fase **Mult**, houve redução na incidência de **Ox**. Pelo qui-quadrado, as proporções observadas nos tratamentos não diferiram significativamente ( $p \leq 0,05$ ). A oxidação não foi limitante ao cultivo *in vitro* da cv. Caipira, devido ao caráter superficial observado. Entretanto, no primeiro subcultivo da fase **Mult**, no tratamento **T3**, foi observada a necrose em uma repetição (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição da incidência de **Ox**, na fase de multiplicação. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais observados. O total, em cada subcultivo, corresponde ao número de repetições avaliadas em cada tratamento.

Tratamento	1º Subcultivo		2º Subcultivo	
	Incidência*	Total	Incidência	Total
<b>T1</b>	3 (75)	4	4 (100)	4
<b>T2</b>	4 (100)	4	4 (100)	4
<b>T3</b>	4 (100)	4	3 (100)	3
<b>T4</b>	4 (100)	4	4 (100)	4
<b>Total</b>	<b>15 (93,75)</b>	<b>16</b>	<b>15 (100)</b>	<b>15</b>

\*As proporções observadas não diferem significativamente entre os tratamentos, segundo o Teste do  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ).

Não foi observada a incidência de **Co**. Isso pode estar relacionado aos métodos usados na coleta, transporte e preparo do material, bem como à destreza na manipulação. Esses métodos foram adaptados de Souza & Junghans (2006) e Oliveira & Melo (1998).

Braga et al (2001) obtiveram taxa de 74,7% de contaminação na fase de estabelecimento. Os autores não relataram as condições de coleta e transporte dos explantes, ou a concentração e o período de exposição ao HClONa na desinfestação.

A incidência de **Ca** foi observada apenas na região do rizoma e na fase **Mult**. Esta variou entre 0 e 100%, entre os tratamentos. Pelo qui-quadrado, as proporções observadas não diferiram, significativamente, entre si ( $p < 0,05$ ) (tabela 2). Assim, os tratamentos não estimularam maior ou menor incidência de **Ca**. A calogênese pode levar a ocorrência de variantes somaclonais. Por isso, como medida preventiva, a cada subcultivo, é realizada a remoção do tecido calogênico, conforme o procedimento de Braga et al (2001).

Tabela 2. Distribuição da incidência de **Ca**, na fase de multiplicação. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais observados. O total, em cada subcultivo, corresponde ao número de repetições avaliadas em cada tratamento.

Tratamento	1º Subcultivo		2º Subcultivo	
	Incidência*	Total	Incidência*	Total
<b>T1</b>	3 (75)	4	-- --	4
<b>T2</b>	3 (75)	4	2 (50)	4
<b>T3</b>	1 (25)	4	1 (33,33)	3
<b>T4</b>	4 (100)	4	2 (50)	4
<b>Total</b>	<b>11 (68,75)</b>	<b>16</b>	<b>5 (33,33)</b>	<b>15</b>

\*As proporções observadas não diferem significativamente entre os tratamentos, segundo o Teste do  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ).

Na fase **Est**, foi observada uma coloração esverdeada superficial no pseudocaule, mas não a incidência de morfogênese. Diversos trabalhos relatam uma baixa morfogênese durante o estabelecimento de cultivares de bananeira (Braga et al, 2001; Mendes et al, 1999).

A **PP** foi observada a partir da fase **Mult**. Pelo teste de Kruskal-Wallis, houve diferenças entre os tratamentos, em ambos os subcultivos ( $p \geq 0,05; p \geq 0,10$ ). O teste de Dunn indicou que os tratamentos **T3** e **T4** estimularam uma maior **PP**, no primeiro subcultivo (tabela 3). No tratamento **T4**, após vinte e oito dias do segundo subcultivo, os propágulos foram, em geral, menores que 0,5cm, enquanto que, no tratamento **T3**, os propágulos tinham entre 0,5-1,5cm (Figura 1). Assim, o tratamento **T3** apresentou resultado promissor, em relação à proliferação e altura dos propágulos. Entretanto, observou-se, também, uma maior variabilidade entre as famílias no **T3**. Segundo Mendes et al (1999), em cultivares de bananeira, a **PP** é influenciada por características individuais dos explantes iniciais.

Tabela 3. Comparação da **PP**, na cv. Caipira, em função dos tratamentos avaliados. T1: 0mg.L<sup>-1</sup>BAP x 4,5mg.L<sup>-1</sup>BAP; T2: 0mg.L<sup>-1</sup>BAP x 5mg.L<sup>-1</sup>BAP; T3: 2,5mg.L<sup>-1</sup>BAP x 4,5mg.L<sup>-1</sup>BAP; T4: 2,5mg.L<sup>-1</sup> x 5mg.L<sup>-1</sup>BAP.

Famílias*	1º Subcultivo				2º Subcultivo				Taxa de multiplicação**			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	0	0	0	0	2	4	--	12	--	--	--	--
2	0	0	1	0	7	8	6	8	--	--	6	--
3	0	0	2	3	3	1	9	6	--	--	4,5	2
4	0	0	4	6	5	3	15	7	--	--	3,75	1,17
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>17</b>	<b>16</b>	<b>30</b>	<b>33</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>4,29</b>	<b>3,67</b>
Tamanho (n)	4	4	4	4	4	4	3	4				
PP média (x) <sup>1</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1,75 <sup>b</sup>	2,25 <sup>ab</sup>	4,25	4	10	8,25				
Desvio padrão (DP)	0	0	1,71	2,87	2,22	2,94	4,58	2,63				
PP média total	2,12	2	5,87	5,25	*Grupo de indivíduos provenientes de um mesmo explante inicial.				**Razão entre n° de propags. do 2º subc e n° de propags. do 1º subc.			

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Dunn ( $\alpha=5\%$ ).

Diante disso, observou-se que o material proveniente da dose de  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  BAP apresentou uma maior proliferação *in vitro*. Os explantes estabelecidos em  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  BAP e subcultivados em  $4,5\text{mg.L}^{-1}$  e  $5\text{mg.L}^{-1}$  BAP obtiveram uma média de 5,87 e 5,25 propágulos por frasco, respectivamente. Braga et al (2001), observaram uma média de 3,15 propágulos por frasco nos dois primeiros subcultivos da multiplicação.



Figura 1. Aspecto geral de propágulos da cv. Caipira aos trinta (A) e sessenta dias (B) da fase de multiplicação. T1:  $0\text{mg.L}^{-1}$ BAP x  $4,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP; T2:  $0\text{mg.L}^{-1}$ BAP x  $5\text{mg.L}^{-1}$ BAP; T3:  $2,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP x  $4,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP; T4:  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  x  $5\text{mg.L}^{-1}$ BAP. Barra: 1cm.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que, em geral, a incidência de oxidação foi superficial e se restringiu a região de rizoma dos explantes. A ausência de contaminação é um indicativo de que os procedimentos empregados, da coleta a desinfestação, tiveram alta eficácia no controle da contaminação *in vitro* na cv. Caipira. A resposta morfogênica obtida está dentro espectro de respostas de cultivares de bananeira encontrado na literatura. Quanto à proliferação de propágulos, a administração de  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  BAP no estabelecimento e  $4,5\text{mg.L}^{-1}$  BAP na multiplicação apresentou resultados positivos e promissores, em relação ao encontrado na literatura para a cv. Caipira. Como perspectivas, acompanhar-se-á as etapas seguintes da micropropagação, a fim de avaliar a dinâmica da multiplicação *in vitro* da cv. Caipira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORGES, A.L.; SOUZA, L.S., eds. **O cultivo da bananeira: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 2004. 279p.
- BRAGA, M.F.; SÀ, M.E.L.; MUSTAFÁ, P.C. Avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de bananeira (*Musa sp.*) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 215- 219, 2001.
- MENDES, B.M.J.; FILIPPI, S.B.; DEMÉTRIO, C.G.B.; RODRIGUEZ, A.P.M. A statistical approach to study the dynamics of micropropagation rates, using banana (*Musa spp.*) as an example. **Plant Cell Reports**, v.18, p: 967-971, 1999.
- SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G., eds. **Introdução a micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 2006. 152p.
- OLIVEIRA, R.P.; MELO, N.F. Produção comercial de mudas de bananeira em laboratórios de cultura de tecidos. **Biotecnologia em foco**, s.v., n.11, 1998.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A, eds.. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 509p.

## PALAVRAS-CHAVE

*Musa spp.*; cv. Caipira; citocinina; multiplicação *in vitro*.