

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

Brito, Lucila Karla Felix Lima de¹; Farias, MarluCIA Elias de²; Dutra, Maria de Fátima Batista³; Pereira, Edilma da Costa⁴; Macedo, Cristiane Elizabeth Costa de⁵; Oliveira, José Flamarion de⁶.

¹Técnico 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; ²Pesquisadora da EMPARN, fone (84) 3232-5850, e-mail: marluciaemparn@rn.gov.br; ³Técnico NS da EMPARN, e-mail: fatimadutra@rn.gov.br; ⁴Técnico NS da EMPARN, e-mail: edilmabiotec2007@hotmail.com; ⁵Professora 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; ⁶Pesquisador da EMPARN – Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento, Natal, RN, fone (84) 3232-5063, e-mail: emparn@rn.gov.br.

INTRODUÇÃO

A micropropagação traz benefícios à agricultura, pois viabiliza a produção de grandes quantidade de mudas, em curtos períodos, com elevado padrão fitossanitário (Torres et al, 1998). Essa técnica apresenta papel de destaque, também, na bananicultura.

Dentre as cultivares de bananeira, a cv. Maçã tem grande aceitação no Brasil. Entretanto, esta é suscetível ao mal-do-panamá e ao mal-da-sigatoka (amarela e negra). Os danos causados por esses males acarretam na redução na produtividade do bananal e, com isso, a prejuízos financeiros para o produtor (Borges et al, 2004).

Nos últimos anos, diversas cultivares têm sido desenvolvidas e, muitas destas, apresentam características de resistências a pragas e doenças. A micropropagação é uma alternativa promissora na introdução rápida dessas cultivares elite no cultivo comercial e, pode contribuir para manutenção da rentabilidade do cultivo de banana (Braga et al, 2001).

A cv. Tropical foi desenvolvida pelo CNPMF-Embrapa e apresenta resistência ao mal da sigatoka amarela e tolerância ao mal-do-panamá. Ainda, essa cultivar é classificada como tipo Maçã (Borges et al, 2004).

Na micropropagação da bananeira, a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é amplamente administrada em doses que podem variar entre 1 a 15mg.L⁻¹ BAP (Borges et al, 2004).

Oliveira et al (2001), trabalhando com a cv. FHIA 01 (tipo Prata, grupo AAAB), observaram uma taxa de multiplicação média de 2,65, em meio MS suplementado com 4mg.L⁻¹ BAP. Entretanto, foi observada uma taxa média de contaminação de 12,53%.

Diante do exposto, este trabalho visou avaliar a incidência de alterações (oxidação, contaminação e calogênese) e a proliferação de propágulos no cultivo *in vitro* da cv. Tropical, sob 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 7cm, os quais compreendiam a região limítrofe entre o pseudocaulo 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 2cm. 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.

Foi usado o meio básico, adaptado de Torres et al (1998), composto por macro e micronutrientes do meio MS, vitaminas de White, 30g.L⁻¹ de sacarose, 2g.L⁻¹ de phytigel® e 0,1g.L⁻¹ de inositol. O pH foi ajustado para 5,7. Foram usadas doses de 0 e 2,5mg.L⁻¹ de BAP no estabelecimento (**Est**) e 4,5 e 5mg.L⁻¹ 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⁻¹BAP x 4,5mg.L⁻¹BAP; **T2**: 0mg.L⁻¹BAP x 5mg.L⁻¹BAP; **T3**: 2,5mg.L⁻¹BAP x 4,5mg.L⁻¹BAP; **T4**: 2,5mg.L⁻¹ x 5mg.L⁻¹BAP. 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. O nível de significância usado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas fases **Est** e **Mult**, foi observado a incidência de **Ox** generalizada na região do rizoma e, por vezes, nas extremidades do psdeudocaulo. Entretanto, na repicagem, viu-se que esta foi superficial, de modo que não atingiu as porções mais internas do tecido. Resultado semelhante foi obtido por Mendes et al (1999), na cv. Maçã. No primeiro subcultivo da fase **Mult**, houve necrose em repetições nos tratamento **T1** e **T2** (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
T1	4 (100)	4	3 (100)	3
T2	4 (100)	4	3 (100)	3
T3	4 (100)	4	4 (100)	4
T4	4 (100)	4	4 (100)	4
Total	16 (100)	16	14 (100)	14

*As proporções observadas não diferem significativamente entre os tratamentos, segundo o Teste do X² ($p \geq 0,05$).

Não foi observada a incidência de **Co**, o que pode estar relacionado aos métodos usados na coleta, transporte e preparo do material, e, ainda, como à destreza na manipulação. Os métodos de assepsia foram adaptados de Souza & Junghans (2006). Oliveira et al (2001), trabalhando com o híbrido FHIA 01, observaram uma média de 22,32% de contaminação na fase de estabelecimento. De acordo com os autores, houve redução desse valor até 1,07%, na fase de enraizamento.

A incidência de **Ca** foi observada na região do rizoma, nas fases **Est** e **Mult**. Esta variou entre 66,67% e 100%, entre os tratamentos. Pelo qui-quadrado, as proporções observadas não diferiram, significativamente, entre si ($p \geq 0,05$) (tabela 2). Assim, os tratamentos estimularam igualmente a 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
T1	4 (100)	4	3 (100)	3
T2	4 (100)	4	2 (66,67)	3
T3	4 (100)	4	4 (100)	4
T4	4 (100)	4	4 (100)	4
Total	16 (100)	16	13 (86,67)	14

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

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 cvs. 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 diferença entre os tratamentos, em ambos os subcultivos ($p \geq 0,05$). Nos tratamentos **T3** e **T4**, em geral, após vinte e oito dias do segundo subcultivo, os propágulos foram menores que 0,5cm (Figura 1). Assim, os tratamentos **T3** e **T4** apresentaram os resultados mais promissores, em relação à proliferação. Nestes, a taxa de multiplicação média foi de 3,5 e 3,13, respectivamente (tabela 3). Oliveira et al (2001), observaram, no híbrido FHIA 01, que a dose de 4mg.L⁻¹BAP estimulou uma taxa de 1,56 e 4,56 nos primeiro e no segundo subcultivos, respectivamente. Esse híbrido, assim como a cv. Tropical, é um genótipo tetraplóide, do grupo AAAB.

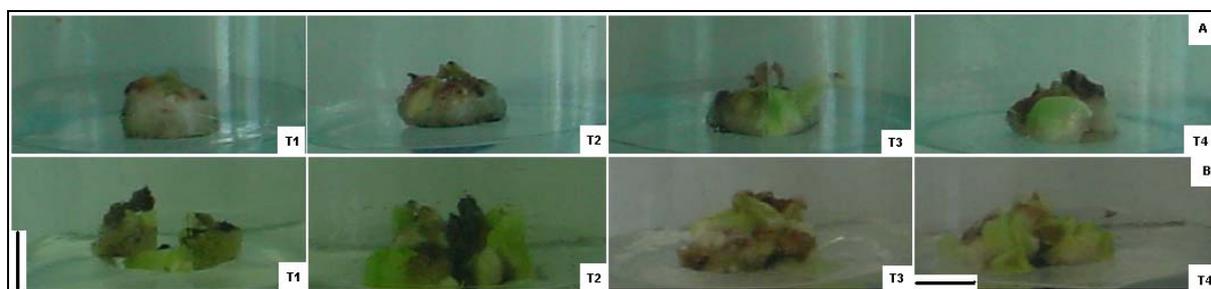


Figura 1. Aspecto geral de propágulos da cv. Tropical aos trinta (A) e sessenta dias (B) da fase de multiplicação. T1: 0mg.L⁻¹BAP x 4,5mg.L⁻¹BAP; T2: 0mg.L⁻¹BAP x 5mg.L⁻¹BAP; T3: 2,5mg.L⁻¹BAP x 4,5mg.L⁻¹BAP; T4: 2,5mg.L⁻¹ x 5mg.L⁻¹BAP. Barra: 1cm.

No entanto, Oliveira et al (2001) observaram menor variabilidade na resposta das famílias e a altura dos propágulos maiores que o obtido neste experimento. Na micropropagação da bananeira, a proliferação de propágulos é, também, influenciada por características individuais dos explantes iniciais (Mendes et al, 1999) e a altura dos propágulos pode interferir na eficiência do enraizamento (Oliveira et al, 2001).

Tabela 3. Comparação da **PP**, na cv. Tropical, em função dos tratamentos avaliados. Os valores entre parênteses correspondem às taxas de multiplicação observadas. T1: 0mg.L⁻¹BAP x 4,5mg.L⁻¹BAP; T2: 0mg.L⁻¹BAP x 5mg.L⁻¹BAP; T3: 2,5mg.L⁻¹BAP x 4,5mg.L⁻¹BAP; T4: 2,5mg.L⁻¹ x 5mg.L⁻¹BAP.

Famílias* ¹	1º Subcultivo				2º Subcultivo				Tx. de multiplicação** _{média}			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	0--	0--	0--	2(2)	4(4)	---	4(4)	7(7)	2	--	2	4,5
2	0--	0--	1(1)	0--	4(4)	5(5)	7(7)	4(4)	2	2,5	4	2
3	0--	0--	0--	1(1)	---	1(1)	6(6)	6(6)	--	0,5	3	3,5
4	0--	0--	1(1)	0--	3(3)	1(1)	9(9)	5(5)	1,5	0,5	5	2,5
Total	0--	0--	2(0,5)	3(0,75)	11(2,75)	7(1,75)	26(6,5)	22(5,5)	1,38	0,88	3,5	3,13
Tamanho (n)	4	4	4	4	3	3	4	4	** Razão entre o n ^o			
PP _{média}	0	0	0,5	0,75	3,67	2,33	6,5	5,5	propags. e o n ^o .			
Desvio Padrão	0	0	0,58	0,98	1,89	2,22	2,08	1,29	inicial de explantes.			
PP _{média} Total	1,83	1,17	3,5	3,13	*Grupo de indivíduos provenientes de um mesmo explante inicial.							

¹Em cada tratamento foi empregado famílias distintas.

CONCLUSÕES

Conclui-se que, em geral, a cv. Tropical apresentou suscetibilidade à oxidação. Com base na ausência de contaminação, os procedimentos empregados, da coleta a desinfestação, foram eficientes no controle da contaminação. A incidência de calogênese observada requer o emprego de procedimentos preventivos, para o controle da variação somaclonal. Quanto à proliferação de propágulos, as taxas de multiplicação obtidas em explantes cultivados em 2,5mg.L⁻¹ BAP no estabelecimento e 4,5/5mg.L⁻¹ BAP indicam uma boa resposta da cv. Tropical a micropropagação. No entanto, houve desuniformidade na resposta dos explantes e, em geral, os propágulos apresentaram dimensões reduzidas. Como perspectivas, acompanhar-se-á as etapas seguintes da micropropagação, a fim de avaliar a dinâmica da multiplicação *in vitro* e da dimensão dos propágulos na cv. Tropical.

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.

OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S.O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**. v.58, n.1, p:73-78, 2001.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G., eds. **Introdução a micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 2006. 152p.

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. Tropical; citocinina; multiplicação *in vitro*.