

# AVALIAÇÃO DA MICROPROPAGAÇÃO COMERCIAL EM BANANEIRA<sup>1</sup>

ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA<sup>2</sup> e SEBASTIÃO DE OLIVEIRA e SILVA<sup>3</sup>

**RESUMO** - O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de um sistema de micropropagação em escala comercial das cultivares de bananeira (*Musa* sp.) Nanicão e Grande Naine. A cultura foi estabelecida em meio nutritivo MS, suplementado com 30 g/L de sacarose, 0,18% de Phytigel™ e pH 5,7; a multiplicação foi realizada no mesmo meio de cultura suplementado com 4,0 mg/L de BAP (benzilaminopurina). As plantas foram enraizadas em meio MS com metade da concentração de sais, suplementado com 30 g/L de sacarose, e sem reguladores de crescimento. Após o enraizamento, as plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação. As perdas por contaminação durante o estabelecimento da cultura *in vitro* foram de 18,0% e 40,6% para as cultivares Nanicão e Grande Naine, respectivamente. A taxa média de multiplicação nos seis subcultivos foi de 2,1 para 'Nanicão' e 2,4 para 'Grande Naine'. As perdas na aclimação totalizaram 2,0%. Com relação à eficiência do sistema de micropropagação, foram obtidas, em média, 189,2 mudas por explante viável após a fase de estabelecimento *in vitro*, para a cultivar Nanicão, e 198,8 para Grande Naine.

Termos para indexação: *Musa* sp., Nanicão, Grande Naine, taxa de multiplicação.

## EVALUATION OF BANANA COMMERCIAL MICROPROPAGATION

**ABSTRACT** - The efficiency of a commercial micropropagation system of the Nanicão and Grand Naine triploid banana cultivars was evaluated. The *in vitro* culture was established in MS medium, supplemented with 30 g/L of sucrose and 0.18% of Phytigel™, pH 5.7; bud multiplication was carried out in the same medium supplemented with 4.0 mg/L of BAP (benzilaminopurine). Plantlets were rooted in MS medium containing half the concentration of salts and supplemented with 30 g/L of sucrose and lacking growth regulators. After rooting, the plantlets were acclimatized in a green-house. Losses by contamination during the period of the *in vitro* establishment were 18.0% and 40.6% for cultivars Nanicão and Grand Naine, respectively. Average multiplication rates in the subcultures were 2.1 for 'Nanicão' and 2.4 for 'Grand Naine'. Two percent of the plantlets were lost during acclimation process. The average production of plantlets were 189.2 for 'Nanicão' and 198.8 for Grand Naine.

Index terms: *Musa* sp., Nanicão, Grand Naine, multiplication rate.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 11 de novembro de 1996.

<sup>2</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMT), Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Dr., Embrapa-CNPMT.

## INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de banana do mundo (FAO..., 1994). Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento considerável na demanda de mudas de bananeira de alta qualidade visando à renovação de bananais de regiões tradicionalmente produtoras, como litoral norte e sul de Santa Catarina, Registro, SP e Janaúba, MG, e a ocupação de novas áreas como o Oeste Paulista, Jaíba, MG e o Pólo Frutícola Mossoró-Açu, RN.

A produção comercial de mudas de bananeira por meio da cultura *in vitro* de ápices caulinares tem sido empregada com sucesso em países como Israel, França, Costa Rica, Cuba, Austrália e Taiwan, possibilitando a produção de mudas superiores e praticamente livres de pragas e doenças, como o mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), moko (*Pseudomonas solanacearum*), nematóide *Radopholus similis* e a broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*) (Souza, 1994). Segundo Krikorian & Cronauer (1983), o desenvolvimento dessas técnicas é importante, por permitir a rápida multiplicação de novos clones de cultivares selecionadas e de híbridos, obtidos a partir de programas de melhoramento genético. Mudas

micropropagadas produzem 30% mais do que mudas obtidas convencionalmente (Sanada, 1993), permitem colheita sincronizada nos primeiros ciclos da cultura, graças à homogeneidade das mudas, e possibilitam maior vigor das plantas, maior número de dedos por penca, maior número de pencas por cacho, menor variabilidade no tamanho e forma dos frutos, e menor incidência de nematóides em áreas contaminadas (Orellana et al., 1991; Quynh & Uyen, 1993).

Uma série de trabalhos tem sido desenvolvida visando estabelecer protocolos seguros para a multiplicação *in vitro* de cultivares de bananeira (Cronauer & Krikorian, 1984a; Hwang et al., 1984; Banerjee & De Langhe, 1985; Wong, 1986; Angarita & Perea, 1991; Sandoval et al., 1991). Esses trabalhos demonstraram que para cada genótipo devem ser realizadas modificações nos protocolos de micropropagação quanto ao tipo de explante, concentração de componentes do meio de cultura, condições físicas do ambiente e métodos distintos para o enraizamento e aclimação. Segundo Grattapaglia & Machado (1990), a eficiência de um protocolo de micropropagação pode ser avaliada principalmente pela taxa média de multiplicação ao longo dos subcultivos, pelo número final de mudas obtidas, e pela porcentagem de plantas que conservem as características genéticas iniciais.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o desempenho de um protocolo de micropropagação empregado por empresas nacionais para a produção de mudas de bananeira por meio de cultura de tecidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Empresa BIOAGRI Biotecnologia Agrícola S/C Ltda (Piracicaba, SP). Os materiais vegetais utilizados foram as cultivares triplóides Nanicão (AAA) e Grande Naine (AAA); as matrizes foram coletadas na Fazenda Tiatã, Eldorado, SP. Foram realizadas três coletas de 50 plantas de cada cultivar com diâmetro médio da base do pseudocaule de 10 cm (Jarret, 1986), realizadas nos meses de fevereiro a abril de 1994.

Foi realizada a limpeza do material por meio de uma série de cortes, removendo-se parte dos rizomas e pseudocaulos até o tamanho aproximado de 5 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro. A desinfestação foi realizada em álcool 96°GL por dois minutos e em solução de hipoclorito de sódio 2,0% e água destilada (1:3) contendo algumas gotas de Tween 20, por 30 minutos, sob agitação. Em seguida, foram realizadas três lavagens com água destilada estéril, em câmara de fluxo laminar, e reduzidos os explantes, com auxílio de pinça e bisturi, até o tamanho de 0,6 cm de altura por 0,4 cm de diâmetro (Cronauer & Krikorian, 1985).

O estabelecimento do material (subcultivo zero) foi realizado em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose e 0,18% Phytigel™, ajustando-se o pH para 5,7; a multiplicação dos explantes (subcultivos um a seis) no mesmo meio de cultura, suplementado com 4,0 mg/L de BAP (benzilaminopurina); e o enraizamento em meio MS com metade da concentração de sais, suplementado com 30 g/L de sacarose e solidificado com Phytigel™, sem reguladores de crescimento. Os explantes foram dispostos sobre 50 ml de meio de cultura, em frascos com 13 cm de altura por 5,5 cm de diâmetro.

O processo de multiplicação foi realizado por meio de subcultivos das gemas laterais, sendo efetuada a subdivisão longitudinal dos explantes sempre que possível (Cronauer & Krikorian, 1984b). Na fase de multiplicação, foram colocados de quatro a cinco explantes por frasco e, na fase de enraizamento, de seis a sete. Os subcultivos 1 a 5 foram realizados, em média, a cada 30 dias, o sexto subcultivo em 45 dias, e o cultivo em meio de enraizamento, em 20 dias. O trabalho foi desenvolvido sob condições de temperatura de  $24 \pm 4^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2000 lux.

Após o enraizamento *in vitro*, as plântulas foram transferidas para sacos de plástico de 25,0 cm<sup>3</sup>, contendo substrato composto por matéria orgânica, solo e areia (1:1:1), permanecendo 15 dias em casa de vegetação, em sistema automático de nebulização com 60% de sombreamento; 45 dias em estufa com cobertura plástica; e 20 dias fora de casa de vegetação. A cada sete dias, foi realizada adubação com solução nutritiva contendo N, P e K, de acordo com as necessidades das mudas.

Foram avaliadas as taxas médias de multiplicação das plântulas durante os subcultivos zero a seis, o número final de mudas produzidas por explante, perdas durante as fases de coleta e preparo dos explantes, porcentagem de contaminação por fungos e bactérias nas fases de estabelecimento e multiplicação, perdas de plântulas na fase de aclimação, nível de oxidação dos materiais *in vitro* e presença de variantes somaclonais em casa de vegetação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase de estabelecimento das plântulas de bananeira *in vitro* é normalmente marcada por elevados índices de perdas. Nos experimentos realizados ocorreram, nessa fase, perdas de 18,0% e 40,6% dos explantes das cultivares Nanicão e Grande Naine, respectivamente (Tabela 1). Desses valores, as perdas causadas pela

presença de ápices caulinares mortos ou danificados por broca-do-rizoma foram de 7,1% na ‘Grande Naine’ e de 5,8% na ‘Nanicão’ e os percentuais complementares de 33,5% na cultivar Grande Naine, e os de 12,2% na Nanicão foram causados por contaminações, principalmente bacterianas. Os elevados percentuais de contaminação obtidos podem ser atribuídos ao fato de as matrizes serem provenientes de campo com problemas de drenagem (Sandoval et al., 1991). Na fase de multiplicação (subcultivos um a seis), obteve-se uma porcentagem média de contaminação de 13,3% na cultivar Nanicão, e de 12,8% na Grande Naine. A maior parte do material foi contaminada por fungos não-patogênicos. Na fase de multiplicação, verificou-se, em cada ciclo de 30 dias de cultivo, que na primeira semana ocorreu um nível acentuado de oxidação dos explantes, decorrente da liberação de compostos fenólicos pelas células danificadas pelos cortes durante a repicagem. A partir da segunda semana, ocorreu um desenvolvimento pronunciado de novas brotações, que se apresentavam vigorosas e com coloração esverdeada. Por volta do 25<sup>o</sup> dia da subcultura, ocorreu uma diminuição no ritmo de crescimento, e aumentou novamente o nível de oxidação, desta vez ocasionado, provavelmente, pela falta de nutrientes no meio de cultura. Segundo Grattapaglia & Machado (1990), antes desse estágio deve ser realizada uma nova repicagem, pois a frequência ideal de subcultivos é aquela em que as plantas são repicadas durante a fase de crescimento ativo das partes aéreas, aliando o máximo vigor de crescimento das culturas à máxima taxa de multiplicação.

**TABELA 1. Perdas de explantes de ápices caulinares de bananeira durante o estabelecimento da cultura *in vitro*.**

Cultivar	Perdas de explantes (%)		
	Explantes inviáveis	Contaminação	Perda total
Nanicão	5,8	12,2	18,0
Grande Naine	7,1	33,5	40,6

A análise dos dados da Tabela 2 permite visualizar o crescimento exponencial do número de plântulas de bananeira produzidas *in vitro* ao longo dos subcultivos 1 a 6. Esses dados demonstram quanto é importante enraizar as plântulas apenas no último subcultivo proposto. Verifica-se, na Tabela 2, que na sexta subcultura houve, em média, a produção de 7.914,3 plântulas da cv. Nanicão num período de 30 dias, que corresponde a 4.013,3 plântulas a mais em comparação com as 3.901,0 plântulas produzidas nas cinco subculturas anteriores, que levaram 180 dias. Segundo Angarita & Perea (1991), este crescimento exponencial do número de plântulas continua nas subculturas posteriores à sexta geração, e poderia representar um aumento substancial no número de mudas produzidas por matriz, não fosse a ocorrência de variação somaclonal. De fato, a variação somaclonal é um dos maiores problemas da multiplicação *in vitro* de mudas de bananeira, por alterar geneticamente as características dos clones (Stover, 1987; Evans & Sharp, 1991; Israeli et al., 1991). Diversos autores concordam em que, subcultivando os explantes até a sexta geração, nas condições utilizadas neste trabalho, os níveis de variação somaclonal não devem ultrapassar a 5% para cultivares do subgrupo Cavendish (Israeli et al., 1991).

Ainda na Tabela 2, verifica-se que as maiores taxas de multiplicação de plântulas das cultivares Nanicão e Grande Naine ocorreram nos subcultivos 3 e 4, quando foram obtidos valores próximos a 3,0. Um dado mais importante para avaliar o desempenho de uma empresa de produção de mudas é a taxa média de multiplicação durante os subcultivos, que, neste experimento, foi de 2,1 em relação à cultivar Nanicão e de 2,4 no tocante à Grande Naine. Esses valores concordam com a citação de Sandoval et al. (1991), de que a taxa de multiplicação em empresas produtoras de mudas *in vitro* varia de 1,5 a 3,0 em relação a cultivares do subgrupo Cavendish estabelecidas em meio de cultura semi-sólido. Segundo Jarret (1986), a concentração exógena de citocinina é o principal fator que regula a taxa de multiplicação *in vitro* de plântulas de bananeira, sendo o BAP a mais eficiente para a indução de gemas laterais, quebra da dominância apical e para evitar a formação de raízes (Zaerr & Mapes, 1985). Como a concentração ideal de BAP varia de acordo com o genótipo e as condições de cultivo, Banerjee & De Langhe (1985) e Vuylsteke et al. (1988) recomendaram o uso de 2,5 a 5,0 mg/L BAP. Neste trabalho foi utilizada a concentração de 4,0 mg/L de BAP, a qual proporcionou resultados satisfatórios na multiplicação de plântulas, e promoveu adequado estímulo às brotações das gemas laterais e inibição do desenvolvimento de raízes.

**TABELA 2. Taxas de multiplicação e eficiência do processo de micropropagação comercial de bananeira.**

Subcultivo	Nº de plântulas <sup>1</sup>		Taxa de multiplicação	
	Nanicão		Grande Naine	
0	70,7 <sup>2</sup>	(1,4)	42,7 <sup>2</sup>	(—)
1	113,3 <sup>2</sup>	(1,6)	70,0	(1,6)
2	250,3	(2,2)	157,3	(2,2)
3	710,0	(2,8)	501,7	(3,2)
4	1986,7	(2,8)	1684,0	(3,4)
5	3901,0	(2,0)	3386,3	(2,0)
6	7914,3	(2,0)	6025,7	(1,8)
Nº de mudas produzidas	7756		5905	
Taxa méd. de multiplicação	2,1		2,4	
Nº de mudas prod./Nº expl. viáveis introduzidos	189,2		198,8	

A utilização de um período de 45 dias no sexto subcultivo e, em seguida, de cultivo em meio sem reguladores de crescimento e com a metade da concentração dos macronutrientes do MS, foi eficiente para a indução, iniciação e alongamento do sistema radicular das plântulas de bananeira. O efeito da redução dos macronutrientes e da ausência do BAP no enraizamento já havia sido descrito por Grattapaglia & Machado (1990) e Sandoval et al. (1991). O prolongamento do sexto subcultivo para 45 dias possibilitou a retirada direta de cerca de 35% do material para casa de vegetação. Os explantes restantes, que passaram para o meio de enraizamento, apresentaram rápido desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, e estavam aptos para a aclimação após 20 dias.

As perdas durante a aclimação foram da ordem de 2%, tanto na cultivar Nanicão quanto na Grande Naine. Verificou-se que as plântulas que, *in vitro*, possuíam parte aérea alongada, e vela e rizoma definidos, apresentavam 98% de pegamento, mesmo sem a presença de raízes. A mesma porcentagem de pegamento foi obtida por Aouine (1989), que trabalhou com a cv. Giant Cavendish, tendo utilizado meio de cultura contendo 3,0 mg/L de cinetina e 10,0 mg/L de AIA (ácido indole-acético) para enraizar as plântulas. Nas condições utilizadas neste trabalho, verificou-se grande eficiência na aclimação das plântulas, o que sugere a possibilidade de se induzir o enraizamento em condições *extra vitrum*.

Os resultados obtidos demonstram que a cultura de tecidos de bananeira é um método rápido de propagação. Enquanto o perfilhamento em campo produz de três a doze filhotes por ano, dependendo da cultivar e condições de cultivo (Alves et al., 1982), obteve-se, neste trabalho, a média de 189,2 mudas da cv. Nanicão, por explante viável após a inoculação *in vitro*, e 198,8 para a cv. Grande Naine. Com relação à multiplicação *in vitro*, Sandoval et al. (1991) obtiveram, em média, 95, 211, 366 e 93 mudas por explante inicial, respectivamente, das cultivares Curaré (AAB), Dominico (AAB), Gran Enano (AAA) e Valery (AAA). Segundo Jarret (1986), existem diferenças significativas na capacidade de proliferação *in vitro* de cada cultivar de bananeira, em-bora todos os genótipos tenham respondido favoravelmente à técnica de micropropagação por ápices caulinares. No trabalho realizado, praticamente não foram observadas grandes diferenças quanto ao número de plântulas obtidas por explante inicial das cultivares Grande Naine e Nanicão, embora Sandoval et al. (1991) salientem que existem diferenças inclusive entre clones de uma mesma cultivar.

Durante a fase de aclimação e desenvolvimento inicial das mudas, ou seja, até 60 dias após a re-tirada do material da condição *in vitro* não foram observadas variações fenotípicas nas plantas obtidas.

## CONCLUSÃO

A micropropagação de mudas de bananeira das cultivares Nanicão e Grande Naine, segundo o método avaliado, proporciona multiplicação acelerada de grandes quantidades de material de alta qualidade genética e fitossanitária, e apresenta viabilidade para ser empregada comercialmente com vistas a suprir a demanda, já existente no Brasil, de mudas de qualidade.

## AGRADECIMENTO

À Empresa BIOAGRI Biotecnologia AgrícolaS/C Ltda, pelo apoio financeiro e por ceder suas instalações e pessoal para execução deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AAOUINE, M. *In vitro* propagation of bananas. **Actes del Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II**, v.9, n.2, p.5-9, 1989.
- ALVES, E.J.; MOTA, J.S.; CALDAS, R.C.; PEREIRA FILHO, C.A. Caracterização e avaliação de germoplasma de banana. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical**, Cruz das Almas, p.63-64, 1982.
- ANGARITA, A.; PEREA, M. Micropropagación de plátanos y bananos. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: CIAT, 1991. p.495-512.
- BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.4, n.6, p.351-354, 1985.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. Aseptic multiplication of banana from excised floral apices. **HortScience**, Alexandria, v.20, n.4, p.770-771, 1985.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. **Annals of Botany**, London, v.53, p.321-328, 1984a.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.2, p.234-235, 1984b.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Somaclonal variation in plantains (*Musa* spp., AAB group) derived from shoot-tip culture. **Fruits**, Paris, v.46, n.4, p.429-439, 1991.
- FAO QUARTERLY BULLETINS OF STATISTICS, v.7, 1994. 91p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1990. p.99-169.
- HWANG, S.C.; CHEN, C.L.; LIN, J.C.; LIN, H.L. Cultivation of banana using plantlets from meristem culture. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.2, p.231--233, 1984.
- ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; LAHAV, E. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.48, p.71-77, 1991.
- JARRET, R.L. *In vitro* propagation and genetic conservation of bananas and plantains. In: INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES (Roma). **IBPGR advisory committee on in vitro storage**. Roma, 1986. p.15-33.
- KRIKORIAN, A.D.; CRONAUER, S.S. Banana. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. v.2, cap.12, p.327-348.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- ORELLANA, P.; PEREZ PONCE, J.; AGRAMONTE, D.; GOMEZ, R.; JIMENEZ, E.; MARTINEZ, S.; ALMAGUER, E.; GOMEZ, P. La micropropagación del plátano a escala comercial en Cuba. **ACEVIV Boletín Científico**, v.3, n.3, p.29-38, 1991.
- QUYNH, N.T.; UYEN, N.V. **Adapted propagation techniques for commercial crops of the tropics**. Stockholm: International Foundation for Science, 1993. 244p.
- SANADA, M. Micropropagation of semitropical crop and its application to cultivation in Okinawa. In: THIQUYNH, N.; UYEN, N.V. (Eds.). **Adapted propagation techniques for commercial crops of the tropics**. Stockholm: [s.n.], 1993. p.101-105.

- SANDOVAL, J.A.; BRENES, G.; PÉREZ SÁNCHEZ, L. **Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE**. Turrialba: CATIE, 1991. 24p. (Informe Técnico, 186).
- SOUZA, F.V.D. **Multiplicação *in vitro* da bananeira triplóide (AAA) 'Caipira' e instabilidade mitótica das plantas produzidas**. Cruz das Almas: UFBA, 1994. 73p. Tese de Mestrado.
- STOVER, R.H. Somaclonal variation in Grande Naine and Saba bananas in the nursery and field. In: PERSLEY, G.J.; DE LANGHE, E.A. (Eds.). **Banana and plantain breeding strategies**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1987. p.136-139.
- VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; WILSON, G.F.; DE LANGHE, E. Phenotypic variation among *in vitro* propagated plantain (*Musa* sp. cultivar AAB). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.36, p.79-88, 1988.
- WONG, W.C. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.6, n.2, p.159-166, 1986.
- ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Pub., 1985. p.231-255.