

CRESCIMENTO E OXIDAÇÃO DE EXPLANTES DE BANANEIRA PRATA (*Musa AAB*) *IN VITRO*. IV. CONCENTRAÇÕES DE SAIS, ÁCIDOS ASCÓRBICOS E FREQUÊNCIA DE SUBCULTIVOS¹

SERGIO UTINO², IRAÍDES FERNANDES CARNEIRO³ E LÁZARO JOSÉ CHAVES⁴.

RESUMO - Avaliaram-se diferentes concentrações de sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), frequência de subcultivos e adição de ácido ascórbico ao meio de cultura, objetivando o controle da oxidação de explantes de bananeira-‘Prata’ (*Musa AAB*) na fase de estabelecimento. Os tratamentos constituíram-se das diluições dos sais do meio MS (100%, 50% e 33,33%), subcultivos (a cada 7 dias, a cada 14 dias e a cada 28 dias) e ácido ascórbico (0 e 25 mg L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, cujos tratamentos foram arranjados em um fatorial 3 x 2 x 2. Utilizaram-se 15 repetições. As avaliações relativas à massa da matéria fresca, altura e oxidação foram feitas aos 28 dias após a inoculação. Quando o período de subcultivos foi maior (28 dias), o crescimento em massa da matéria fresca foi reduzido em função da redução da concentração de sais do meio MS. Para meios de cultura menos concentrados e frequência maiores de subcultivos, não houve necessidade da adição do ácido ascórbico para a redução do escurecimento e houve uma tendência de maior crescimento em massa dos explantes.

Termos para indexação: banana, gemas apicais, meio de cultura, escurecimento, matéria fresca.

GROWTH AND OXIDATION OF EXPLANT OF BANANA PLANTS CV. PRATA (*Musa AAB*) *IN VITRO*. IV. DIFFERENT SALT AND ASCORBIC ACID CONCENTRATION AND SUBCULTURE FREQUENCIES.

ABSTRACT - MS medium salt and ascorbic acid concentrations, and subculture periodicity, were evaluated with the aim of controlling explant phenolic oxidation of banana plants, cv. Prata (*Musa AAB*). All possible combination of salt concentrations of the MS medium (100%, 50% and 33,33%), subcultures periods (each 7 days, each 14 days, and each 28 days after inoculation), and ascorbic acid (0 and 25 mg L⁻¹), were studied. Explant fresh weight, height and oxidation levels were evaluated 28 days after inoculation. Results showed that explant initial growth, determined in fresh weight, was affected by the reduction of MS medium salt concentration when subculture frequency was 28 days. Results was showed that is not necessary addition of ascorbic acid by reduction browning when the salt concentration of MS medium is reduced and the subculture frequency is enlarge, therefore the explant fresh weight was increased.

Index terms: banana, browning, fresh mater.

A utilização da técnica de cultivo *in vitro* de bananeiras tem propiciado uma maneira de obtenção rápida de mudas de clones selecionados, livres de vírus ou outro patógeno transmissível através de material propagativo. Um dos maiores problemas a serem superados em cultivo *in vitro*, é o escurecimento dos explantes (Cronauer & Krikorian, 1986). Este escurecimento é causado pela oxidação de compostos fenólicos que são liberados quando os tecidos são lesados, tornando-se um sério problema, particularmente para determinadas cultivares de banana (Angarita & Perea, 1991). A oxidação fenólica foi prejudicial para o desenvolvimento inicial de brotação de bananeira-‘Prata’ (Lameira *et al.*, 1990), sendo também um fator de redução da taxa de multiplicação em bananeira-‘Maçã’ (Carneiro, 1997). Muitos explantes podem chegar à morte (Gupta, 1986).

Para reduzir esse escurecimento, diversas técnicas são

utilizadas durante o preparo do explante e do meio de cultura bem como na fase de incubação. Segundo Pasqual *et al.* (1997), a oxidação é menos severa em meio diluído do que em um outro com alta concentração de sais, como o meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Substâncias antioxidantes, como o ácido cítrico e o ácido ascórbico, são também utilizadas para reduzir a oxidação em cultura *in vitro*. Estas agem pela remoção do oxigênio de outras moléculas e também atuam por mecanismos alternativos. Provavelmente, o ácido cítrico atua como um agente quelante, retendo íons de metal, que são necessários para ativar enzimas oxidativas (Pasqual *et al.*, 1997).

Em cultura de tecidos de bananeira, para prevenir a oxidação polifenólica, adicionam-se ácido cítrico, ácido ascórbico e carvão ativado, separadamente, ao meio. Dentre estes, o ácido ascórbico tem sido o mais utilizado (Vuylsteke & De Langhe, 1985; Gupta, 1986; Lameira, 1987; Souza & Gonçalves, 1996).

¹ Trabalho nº 127/2000. Recebido: 05/07/2000. Aceito para publicação: 13/06/2001. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

² Eng. Agr., MS, Embrapa-Negócios Tecnológicos, CP 714, CEP 74001-970 Goiânia- GO, sntgyn@terra.com.br.

³ Eng^a Agr^a, Dr^a, Escola de Agronomia/UFG, CP 131, CEP 74001-970 Goiânia-GO., iraidess@agro.ufg.br

⁴ Eng. Agr., Dr., Escola de Agronomia/UFG, CP 131, CEP 74001-970 Goiânia –GO, lchaves@agro.ufg.br

Gupta (1986) verificou que o ácido ascórbico foi mais efetivo do que o ácido cítrico e o carvão ativado, na concentração de 25 mg L⁻¹. O escurecimento de explantes é mais visível em meio sólido, pois os compostos fenólicos exsudados para o meio acumulam-se em volta do explante. Assim, um método eficiente para evitar o escurecimento dos tecidos é transferir os explantes, freqüentemente, para um meio novo. O intervalo entre transferências deve ser ajustado de acordo com o grau de oxidação, pois o escurecimento é particularmente mais intenso na fase inicial do estabelecimento e decresce com o tempo (Pasqual *et al.*, 1997; Vuylsteke, 1989).

Este trabalho teve como objetivo o estudo da influência da concentração de sais do meio MS, do ácido ascórbico e da freqüência de subcultivos, na fase de estabelecimento, sobre a oxidação de explantes de bananeira-‘Prata’.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás-UFG, em Goiânia-GO. O material utilizado para o cultivo *in vitro* foi constituído por gemas apicais provenientes de mudas do tipo “Chifrinho” de bananeira-‘Prata’, obtidas em um bananal em Goiânia.

Após a coleta no campo, as mudas foram lavadas em água corrente e receberam cortes sucessivos no pseudocaule e rizomas até que se reduzissem para dimensões aproximadas de 30 mm x 15 mm x 15 mm, mantendo intacto em seu interior o meristema apical. Em seguida, fez-se o tratamento com hipoclorito de sódio (35 ml L⁻¹) mais 30 gotas de Tween-20 L⁻¹, durante 20 minutos, em câmara de fluxo laminar (Carneiro, 1997). Posteriormente, foram feitas três lavagens sucessivas com água destilada, deionizada e autoclavada. Após a redução final do explante para dimensões de 10mm x 5mm x 5mm, inoculou-se um explante por tubo de ensaio (250 mm x 25 mm) contendo 10 ml do meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2x3, sendo 3 concentrações de sais inorgânicos do meio MS (100%, 50% e 33,33%), 2 níveis de ácido ascórbico em mg L⁻¹ (0 e 25) e 3 freqüências de subcultivo (a cada 7 dias, a cada 14 dias e aos 28 dias). Foram utilizadas 15 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio contendo um explante.

O meio básico utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 gL⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1,5 mg L⁻¹ de BAP e solidificado com 2,0 g L⁻¹ de PhytigelTM. Precedendo a autoclavagem, o pH do meio de cultura foi corrigido para 5,8. Após a inoculação dos explantes no meio de cultivo, os tubos de ensaio foram levados ao escuro por 7 dias. Decorrido este prazo, foram conduzidos à sala de crescimento, a uma temperatura de 28°C±2°C, intensidade luminosa de 35 µEinstein m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro por dia.

O ensaio foi avaliado ao final de 28 dias após a inoculação quanto às seguintes variáveis: grau de oxidação, massa da matéria fresca (g) e altura (cm). Para a avaliação da oxidação de forma subjetiva, utilizou-se de uma escala de classificação em que: 0 = sem oxidação, 1 = muito baixa oxidação, 2 = baixa oxidação, 3 = oxidação intermediária e 4 = oxidação intensa.

Para efeito da análise estatística, os dados da oxidação foram transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$ e procedendo-se para todos os dados coletados, a análise de variância e os desdobramentos dos efeitos de tratamentos. Para os fatores concentração de sais

do meio MS e freqüência de subcultivos, quando apresentaram diferença significativa, fez-se à análise de regressão. Através da análise de variância (Tabela 1), verificou-se que a massa da matéria fresca foi significativamente influenciada pela interação entre a concentração de sais do meio (MS) e a freqüência de subcultivos (SUB). Houve diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, nas três freqüências de subcultivos utilizadas, quando a concentração de sais do meio de cultura utilizado, foi reduzida à metade ou à terça parte. Quando o subcultivo foi realizado a cada 28 dias, as diferentes concentrações de sais utilizadas também apresentaram diferença altamente significativa para o crescimento em massa. Nas outras freqüências de subcultivos, o meio era renovado a cada 7 ou 14 dias e, ainda, o explante recebia cortes, retirando-se as porções afetadas pela oxidação. Isto pode ter levado o explante a absorver mais facilmente a água e os nutrientes presentes no meio e, assim, propiciado aos mesmos um melhor crescimento.

Houve uma tendência de crescimento linear dos explantes à medida que se aumentou o fornecimento de nutrientes, mostrando que, quando a freqüência de subcultivos é de 28 dias, a concentração de sais do meio MS afeta significativamente a massa da matéria fresca dos explantes (Figura 1.) Observa-se que a maior freqüência de subcultivo não influenciou negativamente o crescimento em massa dos explantes, apesar de que, sempre que se fazia o subcultivo, os explantes recebiam cortes para a limpeza das porções oxidadas, e estes eram transferidos para o meio fresco. Provavelmente, o retorno da capacidade de absorção de nutrientes e a presença de nutrientes prontamente disponíveis levaram ao crescimento normal dos explantes. Houve um efeito linear decrescente quanto à massa da matéria fresca dos explantes, à medida que se elevou o tempo de incubação em meio contendo a metade dos sais de MS (Figura 2.). Os dados observados nos tratamentos em que houve redução dos sais para 33,33%, apresentaram-se inferiores àqueles em que se utilizou o MS reduzido à metade. A regressão linear das médias da massa da matéria fresca para a concentração de 33,33% dos sais do meio MS, foi significativa juntamente com o desvio da regressão, indicando que não existe somente efeito linear, mas não foi possível testar estes efeitos pela insuficiência de pontos.

Os desdobramentos da interação, SUB x AA (Tabela 2) mostram que, na ausência de ácido ascórbico, a freqüência de subcultivos tem efeito diferenciado e, para a transferência dos explantes feita aos 28 dias, o ácido ascórbico tem efeito significativo. Isto indica que, para a permanência do explante por mais tempo em um mesmo meio, faz-se necessária a adição de ácido ascórbico, visando à redução da oxidação. E quando este ácido não é utilizado, deve-se aumentar a freqüência de subcultivos para cada 7 ou 14 dias. Pasqual *et al.* (1997) e Vuylsteke (1989) já recomendavam esta técnica para evitar o escurecimento de explantes iniciais de banana, enquanto alguns autores chegam a recomendar subcultivos a cada 3 dias, o que elevaria, acentuadamente, o custo de produção da muda em condições *in vitro*.

Nas médias do grau de oxidação, na ausência do ácido ascórbico, a regressão linear e o desvio foram significativos, indicando que não existe somente efeito linear, mas provavelmente de grau superior; entretanto, pela insuficiência de dados, estes efeitos não puderam ser testados. Mas se observou que a oxidação foi mais intensa no subcultivo aos 28 dias do que em

relação a intervalos menores de subcultivos. Os subcultivos freqüentes mostraram-se efetivos na redução da oxidação, estando de acordo com Hamil *et al.* (1993), ao passo que Banerjee & De Langhe (1985) observaram redução no grau de escurecimento do meio de cultura, quando houve a combinação do ácido ascórbico com o subcultivo a cada duas semanas.

O uso de ácido ascórbico adicionado ao meio, como é o caso do presente experimento, pode prorrogar o período de subcultivo, não afetando significativamente os níveis de oxidação. A maior freqüência de subcultivos tem como conseqüência à elevação no custo da muda produzida *in vitro*, visto que serão necessários maior quantidade de meio de cultura, mão-de-obra e tempo para a realização das diversas transferências para o meio fresco.

Verifica-se, pela análise de variância (Tabela 1), diferença altamente significativa para freqüência de subcultivos x concentração de ácido ascórbico. Na presença do ácido ascórbico, a oxidação foi semelhante para os subcultivos a cada 7 e a cada 14 dias, porém, quando não se adicionou este antioxidante ao meio de cultura, a oxidação foi significativamente maior para subcultivo a cada 28 dias (Tabela 3). Trabalho de

Gupta (1986) indica o ácido ascórbico como o mais efetivo na prevenção da oxidação polifenólica dentre os diversos antioxidantes testados.

De acordo com os resultados, verifica-se que:

1. quando o período de subcultivos foi maior (28 dias), o crescimento em massa da matéria fresca foi reduzido em função da redução da concentração dos sais do meio MS;
2. para meios de cultura menos concentrados (1/2 MS) e maior freqüência de cultivo (a cada 14 dias), não houve necessidade da adição do ácido ascórbico para promover redução do escurecimento dos explantes;
3. houve uma tendência de maior crescimento em massa dos explantes com o aumento da freqüência de subcultivos, em meios de cultura menos concentrados;
4. a utilização do ácido ascórbico acrescido ao meio de cultura, o aumento da freqüência de subcultivos e a redução da concentração dos sais do meio MS não foram suficientes ou adequados para eliminar a oxidação de explantes de bananeira-‘Prata’;
5. apesar de se apresentar escurecido, em todos os tratamentos utilizados, o crescimento em massa foi significativo, valendo

TABELA 1 - Análise de variância para as variáveis altura, massa da matéria fresca e grau de oxidação em explantes de banana (*Musa* AAB cv. Prata) submetidos a diferentes concentrações do meio de cultura, aumento da freqüência de subcultivos e presença do ácido ascórbico no meio de cultura. Goiânia-GO, 1999.

F.V.	G.L.	Quadrado Médio		
		Massa da matéria fresca (g)	Altura (cm)	Grado de oxidação
Concentrações do meio de cultura (MS)	2	1,5381 *	3,5117 *	0,1512 **
Ácido ascórbico (AA)	1	0,1947	2,1111	0,0079
Freqüência de subcultivos (SUB)	2	3,2727 **	2,4771	0,1623 **
MS x AA	2	0,9024	2,3647	0,0322
MS x SUB	4	1,6746 **	2,0323	0,0286
AA x SUB	2	0,5293	1,9158	0,1294 **
MS x AA x SUB	4	0,3070	0,7612	0,1169 **
Resíduo	164	0,3475	1,0793	0,0137
CV (%)		24,96	31,06	6,19
Média geral		2,3620	3,3450	1,8901

* e ** significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente

TABELA 2- Desdobramentos dos graus de liberdade freqüência de subcultivos (SUB) dentro de concentrações de ácido ascórbico (AA) e vice-versa, para grau de oxidação de banana-‘Prata’ (*Musa* AAB). Goiânia-GO, 1999.

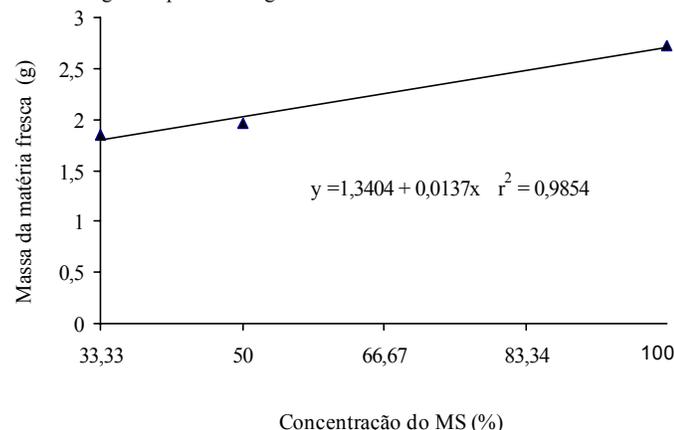
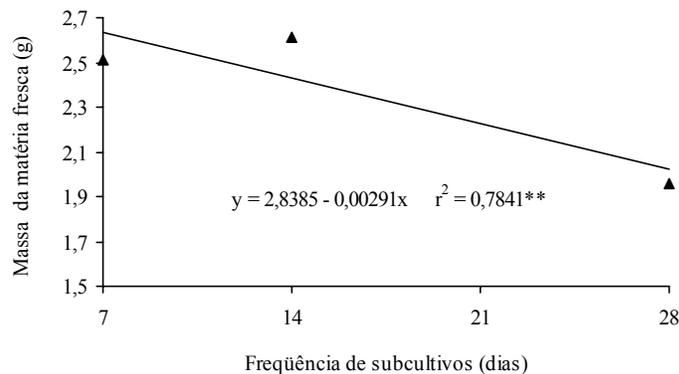
F.V.	G.L.	Quadrado Médio
SUB: ácido ascórbico (0,0 mg L ⁻¹)	2	0,2170 **
SUB: ácido ascórbico (25 mg L ⁻¹)	2	0,0215
AA: subcultivos a cada 7 dias	1	0,0278
AA: subcultivos a cada 14 dias	1	0,0149
AA: subcultivos aos 28 dias	1	0,1847 **

** significativos ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 3 - Médias do grau de oxidação de explantes de bananeira-‘Prata’ (*Musa AAB*) em relação à frequência de subcultivos e presença de ácido ascórbico. Goiânia-GO, 1999.

Ácido Ascórbico (mg L ⁻¹)	Médias do grau de oxidação		
	a cada 7 dias	a cada 14 dias	a cada 28 dias
0,0	3,0000 A	2,8276 A	3,4324 A
25,0	3,1666 A	2,9474 A	3,0606 B

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem estatisticamente a 5%, pelo teste de Tukey.

**FIGURA 1** - Médias da massa da matéria fresca (g) de explantes de bananeira-‘Prata’ (*Musa AAB*), em função de diferentes concentrações de sais do meio de cultura, subcultivados aos 28 dias. Goiânia-GO, 1999.**FIGURA 2** - Médias da massa da matéria fresca (g) de explantes de bananeira-‘Prata’ (*Musa AAB*), em função de diferentes frequências de subcultivos na concentração de 50% de sais do meio de cultura. Goiânia-GO, 1999.

ressaltar que sempre que se fazia o subcultivo, o explante recebia cortes para limpeza das porções oxidadas e estes eram transferido para o meio fresco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGARITA, A.; PEREA, M. Micropropagación de plátanos y bananos. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. 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**, Baltimore, v.4, n.6, p.351-354, 1985.

CARNEIRO, I.F. **Adequação de técnicas de cultura *in vitro* na obtenção de mudas de bananeira (*Musa AAB*) cultivar Maçã**. 1997. 106f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiânia, Goiânia, 1997.

CRONAUER, S.S.; KRICKORIAN, A.D. Banana (*Musa sp.*) In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Trees**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. v.1, p.233-252. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1).

GUPTA, P.P. Erradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.6, p-33-39, 1986.

HAMILL, S.D.; SHARROCK, S.L.; SMITH, M.K. Comparison of

descontamination method used in initiation of banana tissue cultures from field-collected suckers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, p.343-346, 1993.

LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vitro* da bananeira *Musa sp.* através da cultura de ápices caulinares**. 1987. 39f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, Lavras, 1987.

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* da bananeira-Prata através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.11, p.1613-1617, 1990.

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

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 1997. 159p.

SOUZA, G.M.; GONÇALVES, A. Otimização de meio de cultura para bananeira (*Musa cavendish L.*). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.53, n.1, p.51-59, 1996.

VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of *in vitro* propagation of banana and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.62, n.4, p.323-328, 1985.

VUYLSTEKE, D. **Shoot-tip culture for the propagation, conservation, and exchange of *Musa* germplasm**. Rome: IBPGR, 1989. 56p. (IBPGR. Practical manual for handling crop germplasm *in vitro*, 2).