

Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira ‘Maçã’ micropropagadas

Sources of silicon in the development of micropropagated seedlings of banana ‘Maçã’

Simone Abreu Asmar^{I*} Moacir Pasqual^I Filipe Almendagna Rodrigues^I Aparecida Gomes de Araujo^I
Leila Aparecida Salles Pio^I Sebastião de Oliveira e Silva^{II}

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes fontes de silício durante a fase de enraizamento in vitro de bananeira ‘Maçã’ por meio de análise fisiológica, fitotécnica e ultraestrutural. Foram utilizados propágulos já estabelecidos in vitro e inoculados em meio MURASHIGE & SKOOG (MS), adicionado de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8g L⁻¹ de PhytigelTM. Foram testadas três fontes de silicato acrescidas ao meio MS, silicato de sódio, silicato de potássio e silicato de cálcio, na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS sem silicato como testemunha. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quinze repetições. Os propágulos foram mantidos por 45 dias em sala de crescimento, sob condições controladas. Verificou-se aumento nos teores de clorofila a, b e total na presença de silicato de cálcio. A suplementação do meio de cultura com silicato de sódio promoveu aumento de comprimento, massa fresca e seca de parte aérea. O silício proporciona adequado desenvolvimento das plântulas.

Palavras-chave: *Musa spp.*, cultura de tecidos, silicato.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the effect of different sources of silicon during the in vitro rooting phase of ‘Maçã’ banana tree by means of physiological, phytotechnical and ultrastructural analysis. It was used propagules already established in vitro which were inoculated in MURASHIGE & SKOOG (MS) medium, added of 30g L⁻¹ of sucrose, 1mg L⁻¹ of NAA (naphthalene acetic acid) and solidified with 1.8g L⁻¹ of PhytigelTM. It was tested three sources of silicate added to MS medium, sodium silicate, potassium silicate and calcium silicate, at a dose of 1g L⁻¹ and MS medium without

silicate as a witness. The experimental design was completely randomized with fifteen replicates. The propagules were kept for 45 days in a growth room under controlled conditions. There was an increase in levels of chlorophyll a, b and total in the presence of calcium silicate. Supplementation of culture medium with sodium silicate promoted increase in length, fresh and dry weight of shoots. The silicon provides adequate seedling development.

Key words: *Musa spp.*, tissue culture, silicate.

INTRODUÇÃO

A banana tem destacada expressão econômica e social em todo o mundo, sendo considerada importante fonte de alimento e uma das frutas de maior consumo e produção entre as fruteiras tropicais (DONATO et al., 2006).

Um dos principais aspectos que limitam a expansão da bananicultura no Brasil é a utilização de mudas provenientes de métodos convencionais de propagação que, além da baixa taxa de multiplicação (3 a 8 filhotes por matriz/ciclo), possibilita a disseminação de pragas e doenças (ROELS et al., 2005).

A micropropagação de ápices caulinares é prática comum entre os produtores, permitindo a produção massal de propágulos com elevado padrão genético e fitossanitário, em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, sem interrupção sazonal (GÜBBÜK & PEKMEZCI, 2004).

^ILaboratório de Cultura de Tecidos, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. E-mail: siasmar@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II}Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, Embrapa, Cruz das Almas, BA, Brasil.

Embora o processo seja considerado uma tecnologia de ampla utilização e bem estabelecida para bananeira, ainda existem poucas informações sobre os efeitos advindos das modificações no meio de cultura, especialmente pela utilização do silício adicionado a ele, sobre as plantas micropropagadas.

O uso do silício *in vitro* promove efeitos benéficos nas plantas, elevando o conteúdo de hemicelulose e lignina, aumentando assim a rigidez na parede celular, fazendo com que sejam alcançadas elevadas taxas de sobrevivência de plantas na aclimatização (CAMARGO et al., 2007).

Diante do exposto, objetivou-se, com este trabalho, avaliar fontes de silício no desenvolvimento *in vitro* de bananeira 'Maçã', por meio de análise fisiológica, fitotécnica e ultraestrutural, a fim de melhorar a qualidade das mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de maio e agosto de 2010, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras (MG).

Material vegetal - Brotos de bananeira 'Maçã' já estabelecidos *in vitro*, fornecidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram inoculados em meio MS, adicionado de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8g L⁻¹ de Phytigel™. Três fontes de silicato foram adicionadas ao meio MS, silicato de sódio (Na₂SiO₃), silicato de potássio (K₂SiO₃) e silicato de cálcio (CaSiO₃), na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS (sem adição de silicato) como testemunha. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e em seguida autoclavado a 121°C e 1,2atm durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os propágulos foram inoculados em frascos de 200mL, contendo 30mL do meio de cultivo MS modificado de acordo com o tratamento. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e plástico do tipo parafilme e mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, com intensidade luminosa de 52,5W m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

Após 45 dias foram avaliados os seguintes parâmetros:

Concentração de silício - Folhas e raízes foram secas em estufa ventilada a 60°C, por 72 horas, até peso constante e moídas separadamente. A determinação de silício foi realizada pela metodologia proposta por KORNDÖRFER et al. (2004). Para isso, 0,1g da amostra (folhas ou raízes secas e moídas) foi pesada

em tubo de polietileno e a esta adicionados 2,0mL de 30% (v/v) de H₂O₂ e 3,0mL de NaOH (25mol L⁻¹). Os tubos foram fechados e levados para digestão em autoclave por 1 hora a 123°C e 0,15MPa. Após resfriamento, o volume foi completo com água deionizada. Desse extrato, foi retirada uma alíquota de 1mL e transferida para frasco com capacidade de 20mL com o volume completo com água deionizada. A concentração de silício foi determinada por método espectrofotométrico com monitoramento a 410nm da cor amarela do ácido molibdosilícico, formado após reação entre silício e molibdato de amônio em meio HCl.

Características fisiológicas - Teores de clorofila a, b e total foram quantificados, coletando-se cinco folhas de cada tratamento, no qual 0,5g dos tecidos foliares foram macerados em nitrogênio líquido e colocados em acetona 80%. Em seguida, o material foi centrifugado a 8000xg por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para determinação em espectrofotômetro (663nm e 645nm) dos conteúdos de pigmentos.

Características fitotécnicas - Número de folhas; comprimento de parte aérea, em cm; massa fresca e seca de parte aérea, em g; e, comprimento de raiz, em cm; massa fresca e seca de raiz, em g. A massa seca do material vegetal foi realizada após secagem em estufa, a 60°C, por 72 horas, até peso constante.

Características ultraestruturais - Amostras de três folhas em cinco plantas foram fixadas em Karnovsky e posteriormente em tetróxido de ósmio (OsO₄) e, em seguida, desidratadas em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo então submetidas à secagem ao ponto crítico, utilizando-se CO₂ como líquido de transição. Posteriormente, foram recobertas com ouro (20nm) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO, seguindo o protocolo de ALVES (2004).

Delineamento experimental e análises estatísticas - O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos consistindo de 15 frascos cada um, sendo que cada frasco continha dois explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de silício nas folhas e nas raízes de bananeira foram influenciados significativamente pelas fontes estudadas. A concentração de silício na folha foi maior com silicato de sódio (Na₂SiO₃) e cálcio (CaSiO₃) acrescidos ao meio de cultivo (Tabela 1), devido à maior absorção desses elementos pelas raízes e posterior translocação para a parte aérea, justificando,

Tabela 1 - Concentração de silício em folhas (SiF) e raízes (SiR) de bananeira 'Maçã' cultivada *in vitro* por 45 dias.

Fonte de silício	SiF (%)	SiR (%)
Testemunha	0,482 c	0,010 c
MS+Na ₂ SiO ₃	0,800 a	0,014 c
MS+K ₂ SiO ₃	0,562 b	0,150 a
MS+CaSiO ₃	0,820 a	0,030 b
CV (%)	15,47	22,25

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

assim, as baixas concentrações de silício observadas nas raízes desses tratamentos. Para o silicato de potássio (K₂SiO₃), o silício concentrou-se nas raízes, indicando reduzida distribuição e translocação para as folhas. Esse fato pode justificar a baixa eficiência do silicato de potássio sobre as características fisiológicas e fitotécnicas estudadas.

A presença de silício na testemunha (MS sem silício) pode ser explicada pelo fato de o silício ser um elemento abundante na natureza, estando presente em toda parte, inclusive na água (LUZ et al., 2006). No entanto, não há como confirmar essa hipótese, pois não foi medida a quantidade de silício na água utilizada para o preparo do meio de cultura.

O tratamento com silicato de cálcio (CaSiO₃), adicionado ao meio MS, apresentou maiores teores de clorofilas a, b e total (Tabela 2). No entanto, todas as fontes de silício utilizadas proporcionaram maiores teores de clorofilas, quando comparadas com a testemunha (MS sem silício). Maior relação clorofila a/b foi observada no meio MS sem silício.

Resultados semelhantes a esses foram relatados por BRAGA et al. (2009), que encontraram maiores teores de clorofila a, b e total utilizando fonte de silício no cultivo *in vitro* de morangueiro 'Oso Grande'.

Segundo EPSTEIN (2001), o uso de uma fonte de silício é capaz de aumentar o teor de clorofila

das folhas e a tolerância das plantas aos estresses ambientais, como frio, calor, seca, desbalanço nutricional e toxicidade a metais, além de reforçar a parede celular e aumentar a resistência a patógenos e insetos.

Tais resultados demonstram os benefícios do uso de uma fonte de silício na micropropagação de bananeira, principalmente quanto a aparatos fotossintéticos, proporcionando maior nível de clorofila. Esses resultados são importantes, visto que a fase de aclimatização é de extrema importância para a cultura, ou seja, planta com um aparato fotossintético eficiente resultará em maior taxa de sobrevivência e vigor das mudas.

Houve diferença significativa para as variáveis fitotécnicas relacionadas à parte aérea (Tabela 3). Maior massa fresca e massa seca de parte aérea foram observadas no tratamento com silicato de sódio (Na₂SiO₃). Já para as variáveis relacionadas à raiz, não houve diferença significativa, uma vez que o silício tende a acumular-se nas folhas, formando uma barreira protetora e regulando a perda de água da planta por evapotranspiração. O silício é prontamente absorvido pelas plantas e depositado principalmente nas paredes das células da epiderme (KORNDÖRFER, 2006). Resultados semelhantes a estes foram observados em morangueiro 'Oso Grande' micropropagado em meio MS contendo diferentes fontes de silício por BRAGA et al. (2009), que obtiveram maior número de folhas, massa fresca e massa seca no tratamento com adição de silicato de sódio ao meio MS.

Quanto às características ultraestruturais, a testemunha (MS sem silício) apresentou deformações na epiderme em relação aos tratamentos que continham fontes de silício, tanto na superfície adaxial (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D) como na superfície abaxial (Figuras 2A, 2B, 2C e 2D). Houve deformação das células da epiderme nas plantas do tratamento sem silício, pois esse nutriente pode se depositar nas paredes celulares dessas células e conferir resistência ao tecido (PIWPUAN & THAMMATHAWORN, 2008). Assim,

Tabela 2 - Teores de clorofila a, b, total e razão a/b em folhas de bananeira 'Maçã' cultivada *in vitro* por 45 dias, em meio de cultura contendo diferentes fontes de silício.

Fonte de silício	-----Clorofila (µg mL ⁻¹)-----			
	a	b	Total	a/b
Testemunha	9,45 d	3,08 d	12,54 d	3,06 a
MS+Na ₂ SiO ₃	10,85 b	3,76 c	14,62 b	2,88 b
MS+K ₂ SiO ₃	10,24 c	3,54 b	13,78 c	2,90 b
MS+CaSiO ₃	13,85 a	4,61 a	18,46 a	3,00 ab
CV (%)	0,71	2,80	0,78	2,96

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR) e massa seca de raiz (MSR) de bananeira 'Maçã' cultivada *in vitro* por 45 dias, em meio de cultura com diferentes fontes de silício.

Fonte desilício	NF	CPA (cm)	CR (cm)	MFPA (g)	MSPA (g)	MFR (g)	MSR (g)
Testemunha	3,22 a	8,54 b	6,11 a	1,46 b	0,36 b	1,24 a	0,23 a
MS+Na ₂ SiO ₃	3,70 a	11,29 a	6,81 a	1,63 a	0,48 a	1,33 a	0,22 a
MS+K ₂ SiO ₃	3,55 a	10,15 ab	6,38 a	1,44 b	0,35 b	1,23 a	0,21 a
MS+CaSiO ₃	3,65 a	10,35 ab	6,15 a	1,48 b	0,35 b	1,22 a	0,26 a
CV (%)	19,70	16,26	20,68	22,13	24,28	37,98	37,59

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

a má formação dessas células pode ter ocasionado deformações estruturais, as quais não se restringem apenas à epiderme, mas possivelmente ao parênquima, devido a um aumento da sinuosidade dessas paredes. A presença do silício conferiu às plantas o correto arranjo das células da epiderme, sem que houvesse desidratação dos tecidos, que por sua vez prejudica o processo de aclimatização.

De modo geral, informações a respeito das contribuições acerca da estrutura foliar e crescimento das plantas podem contribuir para um melhor entendimento ou mesmo permitir a elucidação de lacunas relativas às diferenças nas taxas de crescimento de plantas (SCHLUTER et al., 2003). Adicionalmente, as alterações que ocorrem na estrutura interna das folhas constituem aspectos determinantes na

capacidade de aclimatização das espécies (HANBA et al., 2002). Assim, a presença do silício no cultivo *in vitro* neste trabalho proporcionou benefícios estruturais que fizeram com que a planta mantivesse um correto desenvolvimento.

CONCLUSÃO

Maiores teores de clorofilas a, b e total são obtidos quando brotos de bananeira 'Maçã' são cultivados em meio MS acrescido de silicato de cálcio e o uso de silicato de sódio promove aumento de comprimento, massa fresca e seca de parte aérea em propágulos micropropagados de bananeira 'Maçã'. Dessa forma, a presença do silício na estrutura foliar proporciona adequado desenvolvimento das plântulas.

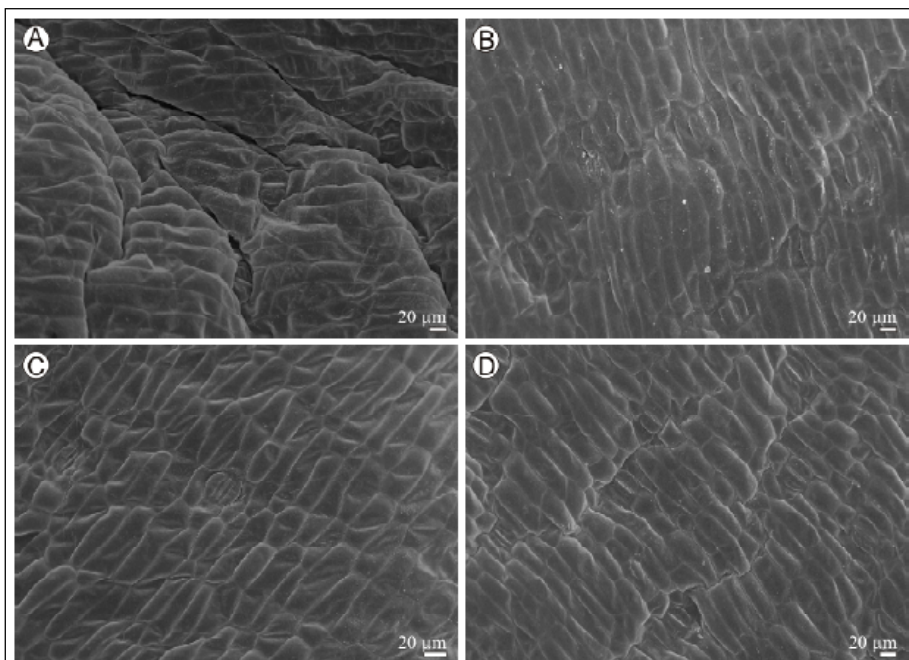


Figura 1 - Eletromicrografia da superfície adaxial de folhas de bananeira submetidas a diferentes fontes de silício: testemunha sem silício (A), silicato de sódio (B), silicato de potássio (C) e silicato de cálcio (D).

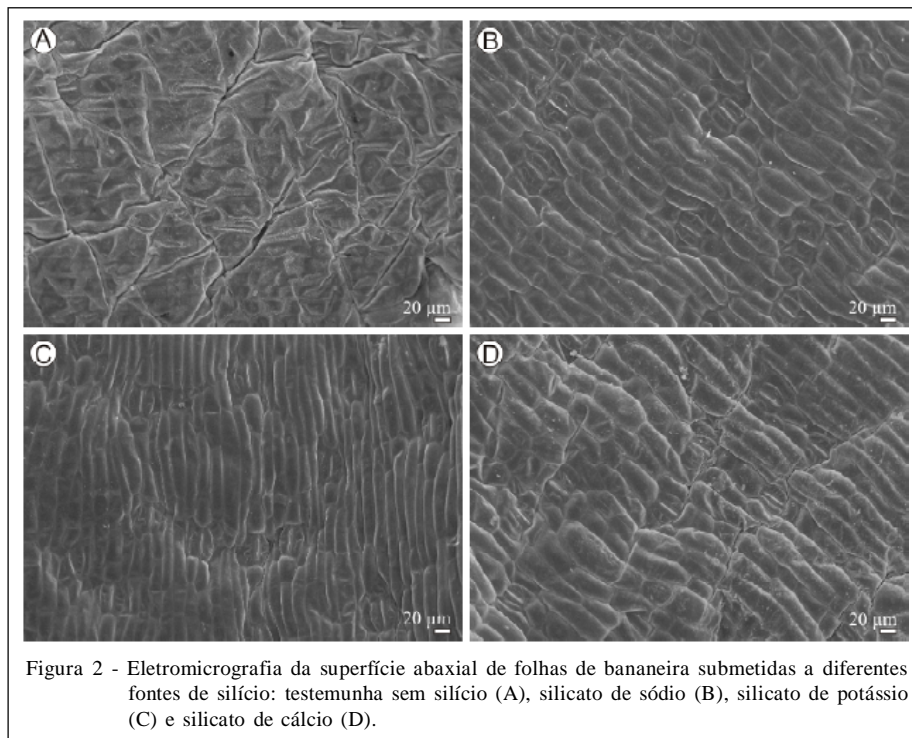


Figura 2 - Eletromicrografia da superfície abaxial de folhas de bananeira submetidas a diferentes fontes de silício: testemunha sem silício (A), silicato de sódio (B), silicato de potássio (C) e silicato de cálcio (D).

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88p.
- BRAGA, F.T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.2, p.128-132, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2009000200003&script=sci_arttext&lng=en>. Acesso em: 10 dez. 2010. doi: 10.1590/S0100-204X2009000200003.
- CAMARGO, M.S. et al. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silfícico aplicados. **Bragantia**, v.66, n.4, p.637-647, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052007000400014&script=sci_arttext&lng=en>. Acesso em: 10 dez. 2010. doi: 10.1590/S0006-87052007000400014.
- DONATO, S.L.R. et al. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.) em dois ciclos de produção no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.1, p.139-144, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452006000100039&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 10 dez. 2010. doi: 10.1590/S0100-29452006000100039.
- EPSTEIN, E. Silicon in plants, facts vs. Concepts. In: DATNOFF, L.E. et al. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier, 2001. p.1-15.
- GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.28, p.355-361, 2004.
- HANBA, Y.T. et al. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant Cell and Environment**, v.25, n.8, p.1021-1030, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3040.2002.00881.x/full>>. Acesso em: 10 dez. 2010. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00881.x.
- KORNDÖRFER, G.H. et al. **Análise de silício: solo planta e fertilizante**. Uberlândia: GPSi-ICIAG-UFU, 2004. 50p. (Boletim Técnico, 02).
- KORNDÖRFER, G.H. Elementos benéficos. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. Cap.14, p.355-370.
- LUZ, J.M.Q. et al. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.3, p.295-300, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362006000300005&lng=en>. Acesso em: 14 abr. 2011. doi: 10.1590/S0102-05362006000300005.
- PIWPUAN, N.; THAMMATHAWORN, A. Leaf and root anatomy of acriopsis reinw. ex blume (Orchidaceae) in Thailand. **KKU Science Journal**, v.36, n.62, p.58-63, 2008. (Suplement).
- ROELS, S. et al. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.82, p.57-66, 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/v755p0372u531477/>>. Acesso em: 14 abr. 2011. doi: 10.1007/s11240-004-6746-y.
- SCHLUTER, U. et al. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.383, p.867-874, 2003. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/54/383/867.full>>. Acesso em: 10 dez. 2010. doi: 10.1093/jxb/erg087.