

# INFLUÊNCIA GENOTÍPICA E CLONAL DE GENÓTIPOS DE BANANEIRAS MICROPROPAGADOS A PARTIR DE GEMAS FLORAIS MASCULINAS<sup>1</sup>

JANIFFE PERES DE OLIVEIRA<sup>2</sup> & JONNY EVERSON SCHERWINSKI-PEREIRA<sup>3</sup>

**RESUMO** - Inflorescências masculinas de bananeiras apresentam potencial para serem usadas como explantes para a micropropagação de bananeiras. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência genotípica e clonal de bananeiras micropropagadas a partir de gemas florais masculinas em sucessivos subcultivos. Foram utilizados explantes florais de 15 clones plantados em campo, da variedade Preciosa e do híbrido FHIA 02, em meio de cultura de MS contendo 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Por sete subcultivos sucessivos de 30 dias, os materiais foram avaliados quanto à taxa de multiplicação e contaminação microbiana. Ao final do período de multiplicação, o acúmulo de mudas produzidas, em razão dos sucessivos subcultivos utilizando esse tipo de explante, foi também avaliado. Verificou-se que os maiores índices de contaminação foram observados no primeiro subcultivo, com média superior a 50% de contaminação dos explantes. As melhores taxas de multiplicação foram alcançadas no terceiro subcultivo, com média de até 6,1 brotos por explante. Os clones que apresentaram maior acúmulo de mudas produziram 105 e 163 mudas por explante, para a variedade Preciosa e o híbrido FHIA 2, respectivamente, após sete subcultivos.

**Termos para indexação:** *Musa* spp., inflorescência, contaminação, propagação *in vitro*, morfogênese.

## GENOTYPIC AND CLONAL INFLUENCE OF GENOTYPES OF BANANA MICROPROPAGATED BY MALE FLORAL BUDS

**ABSTRACT** - Male inflorescences have potential to be used as explants for rapid micropropagation of banana. This work aimed to evaluate the influence of genotypes and clones of banana plants micropropagated from male floral buds in successive subcultures. Male inflorescences of 15 clones, of plants in the field from variety Preciosa and the hybrid FHIA 02 onto MS medium which was supplemented with 4.0 mg.L<sup>-1</sup> BAP, were used. The number of shoots and the microbial contamination were evaluated for seven subcultures of 30 days. At the end of multiplication the total number of plantlets produced was also evaluated. It was verified that the higher rates of microbial contamination occurred in the first month of cultivation, with rates of more than 50% of explants contaminated. The best multiplication rates were achieved in the third subculture where up to 6.1 shoots per explant were obtained. The clones that presented the higher plantlets accumulation at the end of the multiplication period, produced 105 and 163 plantlets per explant for Preciosa and FHIA 02, respectively, after seven subcultures.

**Index terms:** *Musa* spp., inflorescences, contamination, *in vitro* propagation, morphogenesis.

## INTRODUÇÃO

A cultura da bananeira é uma das espécies frutífera de maior importância no Brasil. Contudo, apesar do aumento da área cultivada, nos últimos anos, a produção de banana vem sendo reduzida em razão da pouca tecnificação dos plantios e do uso de variedades suscetíveis às principais doenças da cultura (prata, maçã e terra), notadamente a Sigatoka-negra, Sigatoka-amarela e mal-do-panamá (OLIVEIRA et al., 2008a).

Entretanto, são grandes os esforços empregados por instituições de pesquisa visando à obtenção de variedades de bananeira mais produtivas, com porte reduzido e que apresentem resistência às principais pragas e doenças que prejudicam o desenvolvimento da cultura (SILVA et al., 2003; JESUS, 2006).

Nesse contexto, técnicas biotecnológicas, com destaque para a cultura de tecidos de plantas, têm sido a melhor alternativa para se obter material propagativo em quantidade e qualidade, sendo utilizada atualmente também como ferramenta auxiliar

<sup>1</sup>Trabalho Sinfruit 174 - Simpósio Internacional de Fruticultura - Avanços na Fruticultura (17 a 21 Outubro)

<sup>2</sup>Eng. Agr., Doutoranda do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Av. Gal Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP 69077-000 Manaus-AM, Brasil. E-mail: janiffepoliveira@hotmail.com

<sup>3</sup>Eng. Agr., Pesquisador A da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70770-917 Brasília-DF, Brasil. E-mail: jonny@cenargen.embrapa.br

nos programas de melhoramento genético da bananeira, visando a acelerar a obtenção e distribuição de novas variedades (SILVA; SANTOS-SEREJO, 2003; COSTA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008). A propagação *in vitro*, além de maximizar o potencial de propagação vegetativa a partir de gemas apicais, pode, ainda, proporcionar a produção de mudas por meio do uso de propágulos alternativos, como gemas florais, em razão da desdiferenciação celular induzida a partir de determinado balanço de reguladores vegetais presentes no meio de cultura (DARVARI et al., 2010).

Na maioria dos trabalhos de micropropagação em bananeira, são utilizadas gemas axilares ou gemas apicais como explante inicial (PASQUAL et al., 2001; COSTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Contudo, estudos realizados em 1988 por Balakrishnamurthy e Sree Rangasamy e, ainda, Cronauer-Mitra e Krikorian já relatavam o grande potencial das gemas florais como fonte de explante inicial para cultura *in vitro* da bananeira. Além disso, as gemas florais são retiradas do coração dos cachos de bananeira que são comumente descartados, constituindo-se uma vantagem adicional do método para a produção de novas mudas.

Entretanto, para Zaffari et al. (1995) e Araújo e Carvalho (2005), entre os diversos fatores relacionados à micropropagação, o tipo de explante, no que diz respeito à origem, tamanho, fase e manejo empregado, exerce forte influência nas subsequentes respostas obtidas *in vitro*. Outro fator capaz de exercer grande influência no sucesso do processo de multiplicação é a elevada taxa de perda de material por contaminação durante o cultivo. Há na literatura uma falta de consenso no que diz respeito à melhor fonte de explante quanto aos altos índices de contaminação do material. Santana (1999) relata serem mais altos em ápices caulinares, enquanto para Alloufa et al. (2002), são maiores quando se usam ápices florais.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência genotípica e clonal de variedades de bananeiras micropropagadas a partir de gemas florais masculinas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, utilizou-se como fonte de explante de gemas florais masculinas de 15 clones da variedade Preciosa e do híbrido FHIA 02, coletadas na coleção de trabalho de bananeira, localizada no Campo Experimental da Embrapa Acre (9°58'22"S, 67°48'40"W e 160 m de altitude), com precipitação anual entre 1.800 e 1.900 mm e temperatura média de 25 °C.

As inflorescências (coração) coletadas de cachos imaturos de banana tiveram inicialmente o tamanho reduzido e foram desinfestadas com NaOCl a 1% por 20 minutos, realizando-se, após a desinfestação, a tríplex lavagem com água destilada e autoclavada. Em seguida, os ápices florais foram reduzidos a aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> e estabelecido *in vitro* em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de inositol e solidificado com 6 g.L<sup>-1</sup> de Ágar. Após 30 dias de estabelecimento, o material propagativo que não apresentou contaminação aparente, sendo transferido para frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 30 mL de meio de MS adicionado de 4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP para multiplicação.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes da adição do Ágar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos a 121 °C e 1,3 atm de pressão. Durante as etapas de estabelecimento e multiplicação, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares brancas frias.

Durante o cultivo, as inflorescências foram identificadas como clones e numeradas individualmente, sendo o material multiplicado até o sétimo subcultivo. Em cada subcultivo, determinou-se o número de brotações formadas por clone, bem como a percentagem de perdas dos explantes por contaminação.

No estabelecimento dos cultivos (subcultivo zero), foram utilizadas quinze repetições por tratamento, sendo cada parcela formada por um ápice floral. Nos demais subcultivos, os clones foram multiplicados e mantiveram a identificação do clone de origem, sendo mantidos cinco explantes por frasco.

Ao final do cultivo, a estimativa do número de mudas produzidas foi obtida a partir da determinação da taxa média de brotações (TM), obtida em razão do número de subcultivos (ns) realizados, como segue: número de mudas produzidas por explante =  $TM^{ns}$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As perdas por contaminação durante a fase de estabelecimento *in vitro* (Sub 0) das gemas florais alcançaram 53,3%, que representaram 8 dos 15 clones inicialmente estabelecidos para ambos os genótipos testados, Preciosa e FHIA 02. Muito embora este valor represente uma percentagem expressiva dos explantes inoculados, é ainda inferior ao obtido por Soares et al. (2002), em que as contaminações bacte-

rianas atingiram 70% do material estabelecido. Santana (1999), trabalhando com explantes provenientes de inflorescências da cv. Pacovan, observou que os problemas de contaminação e oxidação inicial dos explantes também ocorriam com maior intensidade quando se utilizava este tipo de explante.

Ainda no que se refere à taxa de perda do material propagativo por contaminação, verificou-se que, ao longo dos cultivos, ocorreu uma redução na frequência de contaminação bacteriana e consequente descarte de material (Figura 1). Este resultado corrobora o obtido por Alloufa et al. (2002), que verificaram que as contaminações, de modo geral, foram mais frequentes nas primeiras avaliações.

Estes autores acreditam que a presença de microrganismos, em especial bactérias de origem endofítica, pode variar de acordo com as condições ambientais a que as plantas-matrizes estão submetidas no momento da coleta, sendo considerado como o período mais crítico quando se registram temperaturas mais elevadas. É possível que, no presente estudo, o ambiente também tenha sido um componente importante para a obtenção dos altos níveis de contaminação inicialmente verificados, já que temperaturas elevadas durante quase todo o ano é uma característica climática da região Sudoeste da Amazônia, local de coleta do material.

Apesar das elevadas perdas de material por contaminação, as maiores taxas de multiplicação obtidas neste trabalho, com o uso de propágulos florais, alcançaram 5,3 brotos por explante para a cultivar Preciosa e 6,1 brotos por explante para a cultivar FHIA 02, no terceiro subcultivo (Tabela 2). Após este subcultivo, os clones de ambas as cultivares permaneceram com uma taxa de multiplicação semelhante até o sétimo subcultivo, com média de 2,1 brotos por explante. Assim, a taxa acumulada (TMA) de mudas produzidas em sete subcultivos, a partir de explantes de origem floral, foi de 60,6 e 79,2 mudas por explante para as cultivares Preciosa e FHIA 02, respectivamente.

No entanto, quando a taxa de multiplicação, ao longo dos subcultivos, foi avaliada individualmente

entre os clones, verificou-se que os clones 4 e 9 da cultivar FHIA 02 foram os únicos que apresentaram produção de mudas estimada superior a 100 mudas por explante (113,4 e 163,2 mudas, respectivamente). Já para a cultivar Preciosa, somente o clone 2 é que apresentou uma produção estimada em mais de 100 mudas por explante (105,9 mudas). Isso sugere a importância de se otimizar os índices de multiplicação em cada subcultivo para que, ao final do período de multiplicação, o número acumulado de brotações possa tornar este processo ainda mais eficiente.

Neste trabalho, verificou-se que um aumento significativo na taxa de multiplicação só foi observado após a 3ª subdivisão do material propagativo, tanto para a cv. Preciosa como para o híbrido FHIA 02 (Tabela 2). Uma hipótese capaz de explicar esse aumento na taxa de multiplicação ao longo dos cultivos pode estar na necessidade de reversão do estado floral ao vegetativo dos explantes, que ocorreu somente a partir deste subcultivo (Figura 2) e, consequentemente, o retorno ao estado meristemático, em processos denominados de desdiferenciação e rediferenciação, ou seja, reprogramação celular (ALVES et al., 2004).

Comparativamente ao terceiro subcultivo, observou-se decréscimo das taxas de multiplicação nos subcultivos subsequentes, que se situaram entre 1,2 e 3,6 brotos por explante até o final do experimento (Tabela 2). Esta diminuição das taxas de multiplicação ocorreu, possivelmente, em razão da individualização das brotações e, por conseguinte, da diminuição dos índices de regeneração de novas brotações. Soma-se o fato de que as brotações originadas deste tipo de explante podem não apresentar uma estrutura morfofisiológica como as das gemas apicais, que possuem inúmeras porções vegetativas meristemáticas circundando o pseudocaule. Isso pode explicar os resultados obtidos quanto às taxas de multiplicação e, portanto, a formação de mudas a partir deste tipo de explante ser, de maneira geral, inferior àqueles observados quando se usa explantes provenientes de gemas apicais.

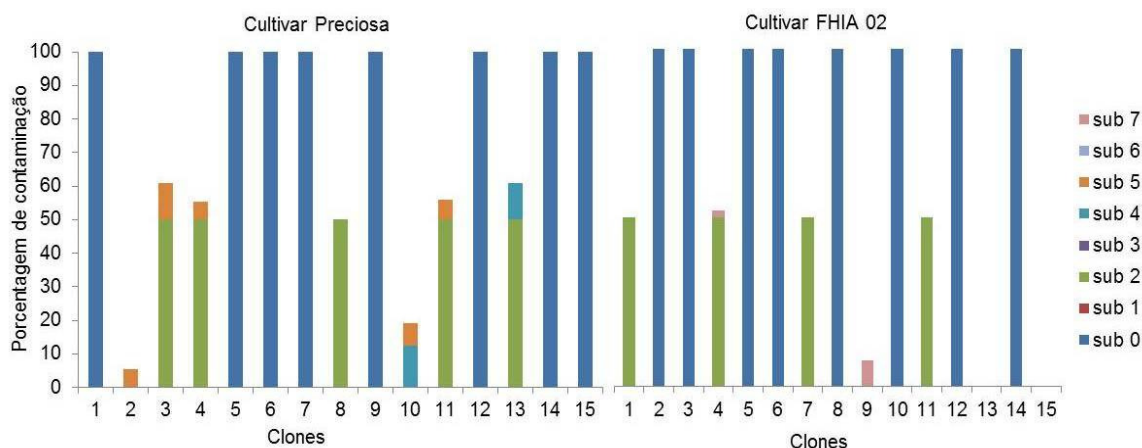
**TABELA 1** - Taxas de multiplicação *in vitro* por clone em cada subcultivo e o acumulado por sete subcultivos, a partir de gemas florais masculinas de bananeira com 4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, da variedade Preciosa e do híbrido FHIA 02

TAXA DE MULTIPLICAÇÃO								
Clones	cv. Preciosa							TMa*
	.....Subcultivos.....							
	1	2	3	4	5	6	7	
2	1,0	1,0	5,0	1,8	3,2	2,3	1,6	105,9
3	1,0	0,5	5,0	1,8	1,4	1,7	1,6	17,1
4	1,0	0,5	6,0	3,2	3,6	1,5	1,6	82,9
8	1,0	0,5	3,0	2,3	1,8	2,2	1,6	21,8
10	1,0	1,0	4,0	2,2	1,8	1,6	2,2	55,7
11	1,0	0,5	5,0	3,4	2,9	2,5	1,4	88,8
13	1,0	0,5	9,0	1,5	2,2	2,1	1,7	53,0
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>0,64</b>	<b>5,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>	<b>2,0</b>	<b>1,7</b>	<b>60,6</b>

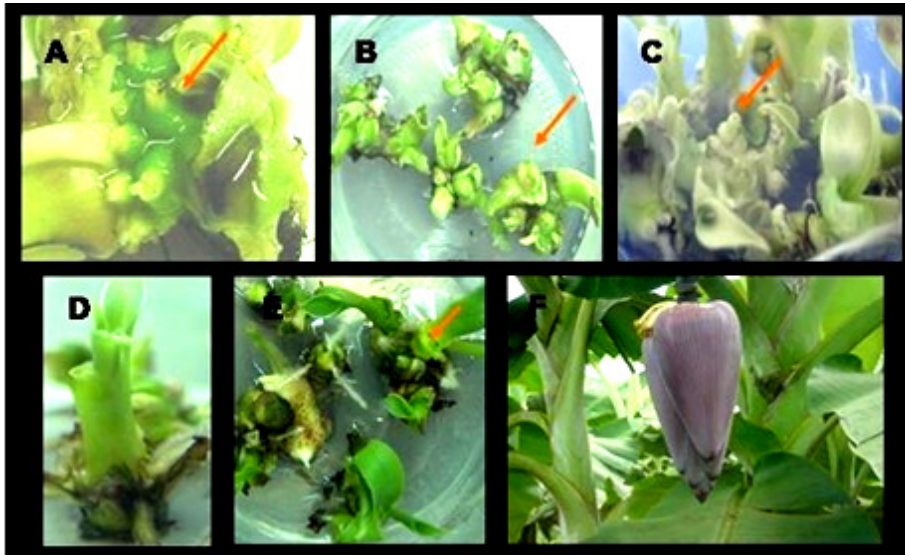
  

Clones	cv. FHIA 02							TMa
	.....Subcultivos.....							
	1	2	3	4	5	6	7	
1	1,0	0,5	2,0	2,5	2,0	2,4	1,8	21,6
4	1,0	0,5	7,0	2,5	2,4	3,0	1,8	113,4
7	1,0	0,5	7,0	2,2	2,4	2,1	1,3	50,4
9	1,0	1,0	12,0	1,6	2,5	1,7	2,0	163,2
11	1,0	0,5	3,0	3,3	2,0	2,2	1,1	71,8
13	1,0	1,0	8,5	1,2	2,7	1,6	1,6	70,5
15	1,0	1,0	3,5	1,6	2,6	2,3	1,9	63,6
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>0,7</b>	<b>6,1</b>	<b>2,1</b>	<b>2,4</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>79,2</b>

\*Taxa de multiplicação acumulada.



**FIGURA 1** - Perdas por contaminação bacteriana ao longo de sete subcultivos *in vitro* dos genótipos de bananeira Preciosa e FHIA 02.



**FIGURA 2** - A- Brotações a partir de inflorescência masculinas de bananeiras no início do cultivo; B e C- Brotações de inflorescência a partir do terceiro subcultivo; D e E- Inflorescências em 4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP a partir do quinto subcultivo; F- Fonte de explante de ápice floral.

## CONCLUSÕES

1. Ápices florais constituem uma alternativa viável como fonte de explante para a propagação *in vitro* de cultivares de bananeira.
2. Perdas por contaminação microbiana são maiores no primeiro subcultivo.
3. As melhores taxas de multiplicação são observadas a partir do terceiro subcultivo para as cultivares de bananeira testadas.

## REFERÊNCIAS

- ALLOUFA, M. A. I.; MACÊDO, C. E. C.; BARROSO, P. A. V.; BARBALHO, A. D.; OLIVEIRA, C. H. B. Avaliação de dois agentes antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de inflorescências de bananeira (*Musa spp*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1092-1096, 2002.
- ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- ARAÚJO, L. H. A.; CARVALHO, J. M. F. C. de. **Técnicas de cultivo *in vitro***. Areia: UFPB/ Centro de Ciências Agrárias, 2005. (Programa de Pós-Graduação).
- BALAKRISHNAMURTHY, G.; SREE RANGASAMY, S. R. Regeneration of banana plantlet from *in vitro* culture of floral ápices. **Current Science**, Bangalore, v. 57, n.5, p. 270-272, 1988.
- COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; SANTOS, A. M. dos; CASTRO, E. M. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Modificações na anatomia foliar de bananeiras durante o processo de micropropagação. **Interciência**, Catanduva, v. 33, p. 663-667, 2008.
- COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grande Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, p. 280-283, 2006.
- CRONAUER-MITRA, S. S.; KRIKORIAN, A. D. Determinate floral buds of plantain (*Musa AAB*) as a site of adventitious shoot formation. **Annals of Botany**, London, v. 61, n. 4, p. 507-512, 1988.
- DARVARI, F.M.; SARIAH, M.P.; MAZIAH, M. Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa sp.*) cultivars using male flowers. **African Journal of Biotechnology**, v 9, n.16, p. 2360-2366, 2010.



- JESUS, O. N. **Caracterização morfológica e molecular de cultivares de bananeira**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Ocidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, p. 459-465, 2008.
- OLIVEIRA, T. K. de; LESSA, L. S.; SILVA, S. O. e; OLIVEIRA, J. P. de. Características agronômicas de genótipos de bananeira em três ciclos de produção em Rio Branco-AC. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1003-1010, 2008a.
- PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.
- SANTANA, R. A. S. **Estabelecimento das condições de cultivo *in vitro* da bananeira (*Musa sp.*) cultivar ‘Pacovan’**. 1999. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 1999.
- SILVA, S. O.; PASSOS, A. R.; DONATO, S. L. R.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V.; LIMA NETO, F. P.; LIMA, M. B. Avaliação de genótipos de bananeira em diferentes ambientes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 737-748, 2003.
- SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. Melhoramento da bananeira para resitência: resultados obtidos pelo melhoramento convencional. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA E WORKSHOP DO GENOMA MUSA, 5., 2003, Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p.28-34.
- SOARES. T. L.; SOUZA, E. H de; SANTOSEREJO, J. A. dos; SOUZA, F. V. D.; SILVA, S. de O. e. Micropropagação de bananeira “Grande Naine” via gemas florais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...**
- ZAFFARI, G. R.; SOLIMAN FILHO, L. F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra da dominância apical sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.17, p. 37-42, 1995.