

Alongamento e enraizamento de mudas micropropagadas de bananeira cv Nanicão sob influência de diferentes concentrações de ácido indolacético – AIA

Fernanda Maria Dias, Carla Cíntia Paranhos Silva, Edio Vicente de Jesus, Giuslan Carvalho Pereira

Palavras-chave: micropropagação, banana, ápice caulinar

Campus: São João Evangelista

Área do Conhecimento (CNPq): 5.01.03.00-8 / Fitotecnia e 2.03.02.00-2 / Morfologia Vegetal

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as mudas micropropagadas de bananeira da variedade Nanicão ao final da fase de alongamento e enraizamento, levando em conta a atuação do hormônio vegetal ácido indolacético - AIA. A pesquisa foi realizada no laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto Federal de Minas Gerais, campus São João Evangelista. Foi preparado o meio de cultura seguindo o protocolo proposto por Murashige e Skoog (1962). Em seguida, procedeu-se a coleta de material propagativo para inoculação. Utilizou-se como fonte de explantes, plantas matrizes em área de produção do próprio campus. No laboratório, após a desinfestação do material, realizou-se a inoculação dos explantes em meio de cultura em condições assépticas. Os tubos foram vedados com filme PVC e levados a sala escura por 07 dias. Após este período de adaptação dos explantes, os mesmos foram submetidos ao fotoperíodo de 16 horas. A temperatura adotada em todo o experimento foi de 25 ± 2 °C. após 21 dias de estabelecimento, foram selecionados os ápices caulinares que se apresentaram intumescidos e com coloração verde para condução da fase de multiplicação. Esta etapa foi conduzida em frascos de vidro vedados com tampa plástica. Foram feitos dois subcultivos com intervalos de 30 dias com o objetivo de se obter grande quantidade de gemas axilares com qualidade e homogeneidade para posterior alongamento e enraizamento. Esta terceira etapa foi conduzida em tubos de ensaio nas dimensões 15 cm x 2,5 cm contendo 15 ml de meio MS básico acrescido do hormônio vegetal ácido Indolacético – AIA. Após individualização dos brotos e eliminação dos tecidos oxidados quando presentes, foi colocado 1 explante por tubo de ensaio que após serem vedados com filme PVC, foram levados para sala escura por 7 dias e posteriormente submetidos ao fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com 5 tratamentos (T1 – 0,0 mg.L⁻¹; T2 – 0,01 mg.L⁻¹; T3 – 0,025 mg.L⁻¹ e T4 – 0,05 mg.L⁻¹ e T5 0,1 mg.L⁻¹) e 4 repetições. A avaliação deu-se após 45 dias do início da referida fase, onde a maioria das plantas apresentavam entre 4 e 6 cm de comprimento de parte aérea. Foi avaliado o comprimento do pseudocaule, número de folhas, diâmetro do pseudocaule, número de raízes e comprimento do limbo foliar. A Análise estatística foi realizada com auxílio do software SISVAR. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados apresentados pelos 4 primeiros tratamentos indicam que a auxina presente no meio pode não ter sido disponibilizada aos explantes durante esta fase do experimento e que os níveis

endógenos de AIA podem ter sido suficientes para o desenvolvimento das plantas. Os resultados apresentados no tratamento 5 (0,1 mg.L⁻¹) demonstraram uma influência negativa do AIA, pois obteve-se as menores médias, indicando uma possível toxidez. A utilização de AIA não demonstrou efeitos positivos para alongamento e enraizamento de plantas de bananeira da variedade Nanicão.

INTRODUÇÃO:

A bananeira (*Musa spp.*) está entre as culturas de maior importância econômica para os países tropicais e subtropicais. Da família das musáceas é cultivada em todos os estados brasileiros, desde a faixa litorânea até os planaltos do interior (Borges et al., 2006). A cultura da bananeira está entre as espécies frutíferas de maior importância para o 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, notadamente a sigatoka-negra, sigatoka-amarela e mal-do-panamá (OLIVEIRA et al., 2008a). A renovação dos plantios e a ampliação da área são dependentes da disponibilidade de grandes quantidades de mudas com elevada qualidade fitossanitária que tem influência na fitossanidade e produtividade do bananal.

Dentre os principais tipos de mudas utilizadas para formação de novos pomares, destacam-se as do tipo chifirão, chifre e chifrinho (ALVES et al., 2004; Borges et al., 2006). Contudo, esse processo convencional de produção de mudas apresenta baixa taxa de multiplicação, mudas desuniformes que dificultam o manejo do pomar, além de se constituir em um mecanismo de disseminação de pragas e doenças importantes para a cultura, tais como mal-do-panamá, moko, podridão- mole, broca, nematoides e vírus (ROELS et al., 2005).

A micropropagação, é uma técnica que permite a produção massal de plantas a partir de uma mínima quantidade de material inicial, é de particular importância para espécies onde o método de propagação convencional é pouco eficiente. “A micropropagação de bananeira envolve o cultivo, em condições assépticas, de explantes de ápices caulinares. A partir de uma única gema, podem ser obtidas centenas de mudas com fidelidade do genótipo, em poucas gerações” (CARVALHO, et al, 2012, p.02). Portanto, levando-se em consideração as limitações dos métodos de propagação convencional de mudas de bananeira, a micropropagação é fundamental para obtenção massal de clones de genótipos superiores. Diversos fatores devem ser controlados para que se obtenha êxito no processo de micropropagação, como o material propagativo a ser utilizado, o genótipo da planta, os meios de cultivo, as condições ambientais, variações somaclonais, os reguladores de crescimento utilizados e os métodos de assepsia (ANDRADE, 2002).

Existem alguns fatores que limitam, em parte, o processo de micropropagação de algumas cultivares de bananeira e que interferem principalmente na taxa de multiplicação, entre os quais, tem-se a alta taxa de oxidação dos explantes, a qual é caracterizada pelo escurecimento das partes excisadas dos explantes e do meio de cultivo, influenciando na absorção dos constituintes do meio pelo explante em virtude da obstrução do tecido oxidado. Tal oxidação é resultante da liberação de compostos fenólicos in vitro, que ao sofrerem a ação das enzimas polifenases, produzem substâncias tóxicas que inibindo o

crescimento dos explantes e ocasionando a morte dos mesmos (SATO, et al., 2001). A oxidação fenólica pode ser minimizada pela redução de danos mecânicos e químicos nos explantes, pela modificação de ambientes, e ou pelo uso de antioxidantes (BASSAN et al., 2006). Recomenda-se a adição dessas substâncias ao meio de cultivo ou durante o pré-tratamento, para diminuição da oxidação (CAMOLESI et al., 2007). Segundo VAN WINKLE et al. (2003) dentre os antioxidantes usados, destaca-se o carvão ativado, um componente que tem sido frequentemente adicionado aos meios de cultura de tecidos vegetais com sucesso. O carvão ativado, usado como substância antioxidante, apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas.

Indispensáveis ao cultivo in vitro, os reguladores de crescimento têm contribuído para o desenvolvimento da cultura de tecidos de plantas. De acordo com HINOJOSA (2000), denomina-se regulador vegetal uma substância química sintética que compartilha com os hormônios vegetais a maioria de suas características. A principal auxina das plantas é o ácido indolacético – AIA, que mesmo em concentrações muito baixas possui atividade satisfatória para o desenvolvimento dos vegetais. Ainda que algumas espécies sejam capazes de formar raízes adventícias apenas com os níveis endógenos de auxina, na maioria das vezes, a adição de auxina exógena é necessária para estimular a rizogênese (Grattapaglia & Caldas, 1990). As auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares (Taiz & Zeiger, 1991).

Apesar da técnica de multiplicação in vitro de bananeira ser bastante difundida no Brasil, percebe-se que há deficiência de trabalhos que visem a otimização do processo de produção de algumas cultivares importantes. Desta maneira, tem-se como objetivo estabelecimento de um protocolo eficiente para a produção de mudas da variedade Nanicão.

Pertencente ao subgrupo Cavendish, a variedade Nanicão é também conhecida como 'banana-d'água' ou 'caturra', apresentando frutos delgados, longos, encurvados, de cor amarelo-esverdeada ao amadurecer, com polpa muito doce (BORGES, et al, 2006). A escolha dessa variedade deu-se pela sua importância para a região de São João Evangelista.

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a oxidação dos explantes sob efeito de diferentes concentrações de carvão ativado no meio de cultura para o estabelecimento in vitro e caracterizar as plantas obtidas a partir da micropropagação levando em conta a atuação de hormônios vegetais.

METODOLOGIA

Separou-se os tubos de ensaio nas dimensões 15 cm x 2,5 cm que foram enxaguados com água destilada e deionizada e secos em estufa.

Foi preparado o meio de cultura seguindo o protocolo proposto por Murashige e Skoog (1962). Para os micronutrientes, macronutrientes, FeEDTA e vitaminas, utilizou-se as soluções estoque 10 vezes concentradas na concentração de mg.L⁻¹ preparadas previamente. Foram acrescentados os fitorreguladores ácido naftalenoacético - ANA e 6-benzilaminopurina – BAP conforme protocolo padrão do próprio laboratório. Os demais componentes do meio (Mio-inositol, polivinilpirrolidona – PVP, Sacarose e Ágar bacteriológico) foram pesados e acrescentados no momento do preparo. Após o preparo, o pH foi ajustado para 5,8 utilizando ácido clorídrico (HCl) e em seguida, foi adicionado o carvão ativado em quatro diferentes

concentrações de acordo com os tratamentos propostos no projeto. O meio foi solidificado com ágar bacteriológico e distribuído nos tubos de ensaio, adicionando-se 10 ml em cada um. O material foi acondicionado em sacos de material plástico transparente e autoclavado por 20 minutos em autoclave vertical a 121 °C, juntamente com o kit para manipulação dos explantes (placa de vidro, bisturi, pinças, placa de petri e papel toalha) e a água destilada e deionizada usada no processo de desinfestação dos mesmos.

Procedeu-se então, a coleta de material propagativo e inoculação dos explantes em meio de cultura. Utilizou-se como fonte de explantes, matrizes da variedade “Nanicão”, em área de produção do próprio campus. Selecionou-se plantas matrizes que apresentavam bom vigor vegetativo com boa nutrição e sanidade aparentes e sem injúrias mecânicas. Coletou-se dessas matrizes, as mudas do tipo “chifrinho” (muda com 20 a 30 cm de altura, 2 a 3 meses de idade). Foi feita uma pré-limpeza nas mudas, retirando-se as raízes e o excesso de terra em seguida lavando-as em água corrente. O material foi levado ao laboratório imediatamente após a pré-limpeza.

No laboratório, as bainhas mais externas das mudas foram retiradas e o material foi imerso em água + hipoclorito de sódio (10ml/L) por 20 minutos antes da retirada dos explantes. Para retirada dos ápices caulinares, o material foi reduzido a cerca de 2 cm de diâmetro e 4 cm de comprimento (1 cm de rizoma e 3 cm de pseudocaule). Foi realizado tratamento com fungicida Cercobin – 1 g.L-1 por 20 minutos.

Na câmara de fluxo laminar foi feita a desinfestação dos explantes utilizando primeiramente uma solução de álcool 70% por 2 minutos enxaguando-se 3 vezes em água destilada, deionizada e esterilizada. Após este processo, utilizou-se o hipoclorito de sódio 2,5% na proporção de 1 parte do produto comercial para 03 partes de água acrescidos de 20 gotas do espalhante adesivo Tween® 20 por 30 minutos, lavando 6 vezes com água destilada, deionizada e esterilizada. Após a desinfestação, os ápices caulinares foram novamente reduzidos, deixando-os com cerca de 1 cm de comprimento. Após isolamento, os explantes foram inoculados em meio de cultura. Os tubos foram vedados com filme PVC e levados para a sala escura por 07 dias. Após este período de adaptação dos explantes, os mesmos foram submetidos ao fotoperíodo de 16 horas. A temperatura adotada em todo o experimento foi de 25 ± 2 °C.

A fase de multiplicação foi conduzida em frascos de vidro vedados com tampa plástica com capacidade para 220 ml contendo 30 ml de meio MS básico acrescido da citocinina sintética BAP a 2,5 mg. L-1. Foram selecionados da fase de estabelecimento, os ápices caulinares que se apresentaram bem desenvolvidos, com coloração verde. Os mesmos foram seccionados longitudinalmente em duas partes eliminando-se os tecidos escurecidos permitindo o contato de toda a base do rizoma com o meio de cultura. Foram inoculados 2 explantes por frasco no primeiro subcultivo e 3 explantes por frasco no segundo subcultivo. As condições da sala de crescimento adotadas foram as mesmas da fase de estabelecimento, excluindo-se a adaptação em sala escura. Foram feitos dois subcultivos com intervalos de 30 dias com o objetivo de se obter grande quantidade de gemas axilares com qualidade e homogeneidade para posterior alongamento e enraizamento. Não foi adotado nenhum delineamento experimental nesta fase.

A fase de alongamento e enraizamento foi conduzida em tubos de ensaio nas dimensões 15 cm x 2,5 cm contendo 15 ml de meio MS básico acrescido do hormônio vegetal ácido Indolacético – AIA. Após individualização dos brotos e eliminação dos tecidos oxidados quando presentes, foi colocado 1 explante por tubo de ensaio que após serem vedados com filme PVC, foram levados para sala escura por um

período de 7 dias e posteriormente submetidos ao fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 C°. Foi avaliada nesta fase, alongamento e o enraizamento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Nanicão sob influência de diferentes concentrações de ácido indolacético - AIA. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com 5 tratamentos (T1 – 0,0 mg.L⁻¹; T2 – 0,01 mg.L⁻¹; T3 – 0,025 mg.L⁻¹ e T4 – 0,05 mg.L⁻¹ e T5 0,1 mg.L⁻¹) e 4 repetições composta por 4 tubos de ensaio. A avaliação deu-se após 45 dias, onde a maioria das plantas apresentavam entre 4 e 6 cm de comprimento de parte aérea. Foi avaliado o comprimento do pseudocaule, número de folhas, diâmetro do pseudocaule, número de raízes e comprimento do limbo foliar. A Análise estatística foi realizada com auxílio do software SISVAR. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na fase de alongamento e enraizamento foi avaliada a influência de diferentes concentrações do hormônio vegetal ácido Indolacético – AIA sobre o desenvolvimento das gemas axilares. Foi verificada a diferença significativa em um dos tratamentos, para todos os atributos avaliados. Quando utilizado o AIA na concentração 0,1 mg.L⁻¹ (T5), houve o maior desenvolvimento da parte aérea de algumas plantas, porém a formação de calos em alguns dos explantes, prejudicou o desenvolvimento da parte aérea e de raízes. Isso fez com que este tratamento obtivesse as menores médias. Quando a concentração de auxina no meio é excessiva, ocorre formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea (RADMANN, et al, 2002).

Para os atributos tamanho da planta, número de folhas e comprimento do limbo foliar, embora não havendo diferença significativa, verificou-se o melhor resultado quando utilizada a concentração 0,025 mg.L⁻¹. Para o diâmetro do pseudocaule, as plantas se desenvolveram melhor quando na ausência do hormônio vegetal. Quanto ao número de raízes, o melhor resultado obtido foi com a utilização de 0,01 mg.L⁻¹ de AIA, também sem diferir estatisticamente das concentrações 0,0 mg.L⁻¹; 0,025 mg.L⁻¹ e T4 – 0,05 mg.L⁻¹.

Com exceção do tratamento 5 (0,1 mg.L⁻¹), os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. De acordo com CARVALHO, et al (2012), algumas cultivares de bananeira são capazes de se desenvolver adequadamente em meio MS, sem adição de auxina ao meio, como a cultivar Williams. O AIA é uma auxina natural rapidamente oxidada não se acumulando em grandes quantidades nas células, sendo facilmente inativada e portanto menos eficiente que as auxinas sintéticas, as quais se acumulam e são capazes de permanecer por um período mais prolongado nos tecidos quando aplicadas exogenamente (BIDWELL,1979). O resultado indica que a auxina presente no meio pode não ter sido disponibilizada aos explantes durante esta fase do experimento.

Diante dos resultados obtidos, a utilização de AIA não demonstrou efeitos positivos para alongamento e enraizamento de plantas de bananeira da variedade Nanicão.

CONCLUSÕES

O AIA não influenciou positivamente o desenvolvimento de plantas na fase de alongamento e enraizamento independentemente da concentração utilizada.

Os resultados apresentados no tratamento 5 (0,1 mg.L⁻¹) demonstraram uma influência negativa do AIA, pois obteve-se as menores médias.

Novos trabalhos devem ser realizados no sentido de investigar uma concentração do hormônio vegetal que seja favorável ao desenvolvimento da cultura da bananeira in vitro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.

BIDWELL, R. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México 1979. 784pp.

BORGES, A. L. et al. A cultura da banana / Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. – 3. ed. rev. e amp. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 110 p. : il. – (Coleção Plantar, 56).

CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J. Redução da oxidação na propagação in vitro da bananeira maçã. Ciência Agrotécnica, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007.

CARVALHO, A. C.P. P.; RODRIGUES, A. A.J.; SANTOS, E. O. Produção de Mudanças Micropropagadas de Bananeira. Fortaleza, CE, Outubro, 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L. P. Introdução aos hormônios vegetais. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.

OLIVEIRA, T. K. de; LESSA, L. S.; SILVA, S. O. e; OLIVEIRA, J. P. de., Características agrônômicas 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.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETER, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento In vitro de porta-enxertos de macieira 'm-9'. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 624-628, Dezembro 2002.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 82, n. 1, p. 57-66, 2005.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. et al. Micropropagação de Celtis sp.: controle da contaminação e oxidação. Cerne, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3 ed. Artmed. Porto Alegre 2004.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. Plant Cell Report, New York, v. 21, p.1175-1182, 2003.