

Autores

Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Bióloga, D. Sc. em Genética, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, CEP 60511-110, Fortaleza, CE, cristina.carvalho@embrapa.br

Antonio Anderson de Jesus Rodrigues

Engenheiro Agrônomo, aluno de Mestrado em Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, CEP 60721-055, Fortaleza, CE, andersonnjr@hotmail.com

Eder de Oliveira Santos

Engenheiro Agrônomo, aluno de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas, da Universidade Federal do Ceará, CEP 60721-055, Fortaleza, CE, ederolisan@gmail.com.br

Produção de Mudanças Micropropagadas de Bananeira

Introdução

A bananicultura é uma atividade de grande importância econômica e social em todo o mundo, sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial de bananas. Em 2009, a produção brasileira foi de 7,19 milhões de toneladas numa área plantada de 511,64 mil hectares (SINGH et al., 2011).

A grande maioria dos plantios é realizada utilizando-se mudas de bananeira obtidas pelo método convencional de propagação. Segundo Nomura e Fuzitani (2005), essas mudas são formadas por um rizoma ou parte dele, com um pedaço maior ou menor de pseudocaule. Desse rizoma, uma ou mais gemas (apical ou laterais) irão brotar, e cada uma produzirá uma nova bananeira. Dentre os principais tipos de mudas obtidas de bananeiras (Figura 1), podem-se destacar o chifirão, o chifre e o chifrinho (SOUZA et al., 2000; ALVES et al., 2004). No entanto, esse processo apresenta baixa taxa de multiplicação, além de resultar em mudas desuniformes, dificultando o manejo do pomar, e podendo ainda se constituir em um mecanismo de disseminação de pragas e doenças, tais como mal-do-panamá, moko, podridão-mole, broca, nematoides e vírus (ROELS et al., 2005).

A baixa taxa de multiplicação das bananeiras no campo tem demandado um grande interesse para o desenvolvimento de pesquisas para obter métodos de propagação vegetativa mais rápidos (SCARPARE FILHO et al., 1998). Dentre esses métodos, destacam-se o fracionamento do rizoma, a multiplicação rápida in vivo e a micropropagação ou propagação in vitro (SOUZA et al., 2000; ALVES et al., 2004). Embora os dois primeiros métodos apresentem uma eficiência um pouco maior do que o convencional utilizado, não são muito eficientes quanto à sanidade e uniformidade das mudas obtidas (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

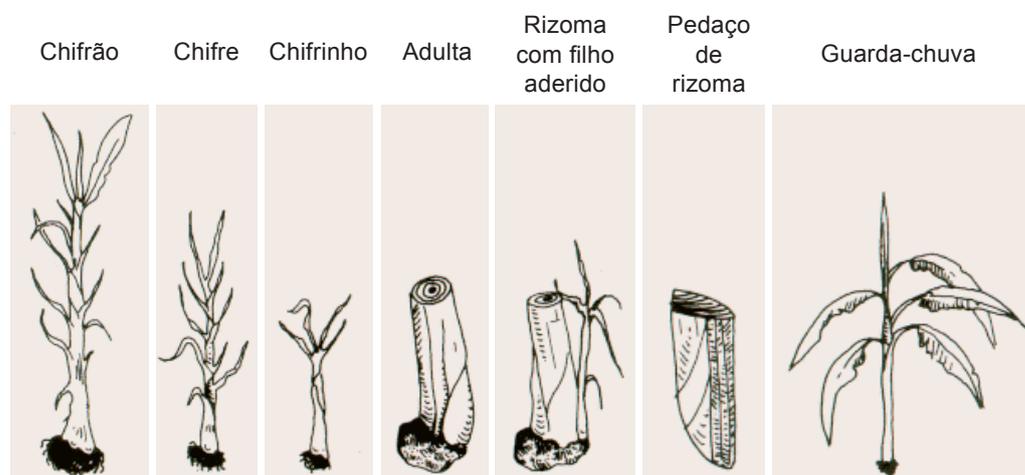


Figura 1. Esquema dos tipos de mudas de bananeira utilizadas como material propagativo pelo sistema convencional de propagação.

Fonte: Echeverri-Lopez & Garcia-Reis (1977).

Comparando-se, nos diferentes métodos de propagação vegetativa, o número de mudas obtidas e o tempo gasto na produção delas (Tabela 1), verifica-se que a micropropagação é muito superior aos demais métodos. Segundo Santos-Serejo et al. (2009), dependendo do genótipo utilizado, o processo convencional necessita de 12 meses para obter de 10 a 30 mudas, enquanto cerca de dez vezes mais mudas são obtidas em quase metade do tempo mediante a micropropagação.

Tabela 1. Número de mudas e período necessário para obtenção de plantas a partir de diferentes métodos de propagação da bananeira.

Método	Número de mudas ⁽¹⁾	Período (meses)
Processo convencional	10 a 30 mudas/planta	12
Fracionamento do rizoma	4 a 12 mudas/rizoma	6-8
Propagação rápida	10 a 50 mudas/rizoma	5-6
Propagação in vitro (micropropagação)	150 a 300 mudas/ápice caulinar isolado	6-8

⁽¹⁾Variável de acordo com o genótipo utilizado.
Fonte: Santos-Serejo et al., 2009.

A micropropagação de bananeira envolve o cultivo, em condições assépticas, de explantes de ápices caulinares (Figura 2). A partir de uma única gema, podem ser obtidas centenas de mudas com fidelidade do genótipo, em poucas gerações. Essa metodologia permite a produção in vitro em larga escala, seguida da aclimatização em casa de vegetação, possibilitando a obtenção de material livre de pragas e doenças (SANTOS-SEREJO et al., 2009;

CHAVAN-PATIL et al., 2010; SINGH et al., 2011; RESMI; NAIR, 2011).

No Brasil, esse método vem sendo utilizado de maneira crescente nos últimos anos, com a instalação de diversos laboratórios comerciais em diferentes regiões do País, permitindo, assim, um acesso mais rápido dos agricultores a mudas de melhor qualidade, especialmente das variedades tradicionais, das novas cultivares e dos híbridos desenvolvidos pelos programas de melhoramento genético.

Desde a década de 1990, a Embrapa Agroindústria Tropical vem realizando trabalhos de pesquisa no aprimoramento de protocolos para a produção de mudas micropropagadas de bananeira, visando principalmente dar suporte às empresas que objetivam usar a micropropagação como agronegócio.

Objetivo

O objetivo desta publicação é fornecer informações para a produção de mudas micropropagadas de bananeira, em larga escala.

Metodologia

Escolha do material vegetal

O material vegetal a ser utilizado para o estabelecimento de culturas assépticas deve ser retirado preferencialmente de plantas matrizes de bananeira em excelente estado fisiológico, nutricional e sanitário, vigorosas e que possuam o Certificado de Origem para garantir a fidelidade genética do genótipo que vai ser multiplicado (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

A escolha do explante, ou seja, do segmento da planta que será utilizado para o estabelecimento da cultura in vitro, é fundamental para o sucesso na micropropagação. Segundo Santos-Serejo et al. (2009), várias fontes de explantes têm sido utilizadas, tais como muda do tipo chifrinho, rizoma e inflorescência masculina, para obtenção dos explantes iniciais de ápices caulinares, gemas laterais e ápices florais, respectivamente. As gemas florais apresentam algumas vantagens em relação aos ápices caulinares, pois podem ser manipuladas com maior facilidade e não interferem na produção convencional de mudas. Apesar disso, são utilizadas

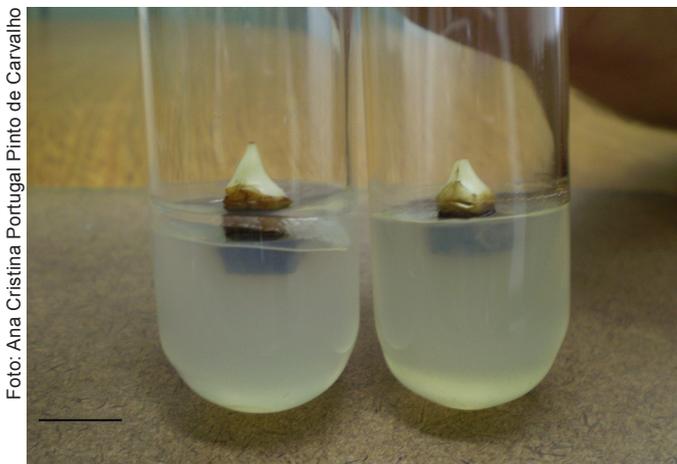


Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 2. Ápice caulinar de bananeira cv. Williams, explante geralmente utilizado para a obtenção de mudas micropropagadas de bananeira. Barra de tamanho = 1,0 cm.

com menor frequência, por não estarem disponíveis durante o ano todo, além de muitos dos protocolos sugeridos nem sempre serem suficientemente detalhados e adequados a determinadas variedades, de modo que possam ser aplicados rotineiramente (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

A micropropagação por ápices caulinares tem sido a mais utilizada, tanto para a bananeira como para diversas outras espécies vegetais. O ápice caulinar refere-se ao meristema envolto por alguns primórdios foliares e que contém pequeno segmento de rizoma (Figura 2).

Os rizomas podem ser retirados de plantas cultivadas no campo, oriundas de mudas produzidas pelo método convencional ou por micropropagação. Entretanto, recomenda-se, para os rizomas obtidos a partir de mudas micropropagadas, que as plantas tenham sido cultivadas, pelo menos, durante três ciclos sucessivos e que mantenham boas características de produção e de fitossanidade. SINGH et al. (2011) sugerem que os rizomas sejam coletados a partir de plantas em floração, de forma a certificar que estejam de acordo com os padrões estabelecidos para a variedade/cultivar em questão. Os rizomas devem ser retirados mantendo o ápice caulinar intacto, isto é, o rizoma deve conter parte aérea e basal. A altura ideal do rizoma deve ser de aproximadamente 25 cm, sendo 15 cm de parte aérea e 10 cm de parte basal, com largura de aproximadamente 15 cm na parte basal (Figura 3).

Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho



Figura 3. Rizoma de bananeira cv. Williams, de tamanho ideal para o envio ao laboratório, para excisão do ápice caulinar. A altura do rizoma deve ser de aproximadamente 25 cm, sendo 15 cm de parte aérea e 10 cm de parte basal, com largura de aproximadamente 15 cm na parte basal.

Após a retirada dos rizomas, eles devem ser limpos, eliminando-se todo o excesso de terra e de raízes, e, a seguir, lavados em água corrente. Se necessário, devem ser submetidos a uma desinfestação, imergindo-os em solução com fungicida e/ou bactericida, caso o material a ser utilizado apresente algum problema fitossanitário. Posteriormente a esse tratamento, os rizomas devem ser colocados, em ambiente arejado, sobre papel (jornal) para secagem. O armazenamento em locais úmidos ou o acondicionamento dos rizomas em ambiente fechado, como em sacos plásticos, devem ser evitados, uma vez que podem favorecer a manutenção de alta umidade e o crescimento de microrganismos.

Retirada e desinfestação dos ápices caulinares

A retirada do ápice caulinar, a partir do rizoma, pode ser feita, inicialmente, na bancada do laboratório, ou em outro local adequado. Os cortes, principalmente na parte basal do rizoma, devem ser retos, sem faltar o tecido (Figura 4) e de forma a não atingir o ápice caulinar, evitando-se fazer cortes “inclinados”.



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 4. Rizoma de bananeira cv. Williams, sendo cortado com incisões retas.

Conforme o tamanho do rizoma vai se reduzindo com os cortes sucessivos, podem ser usadas facas de tamanhos variados e bem afiadas (Figura 5). A cada corte, deve-se desinfestar a faca, mergulhando-a em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% - 50 mL de água sanitária + 950 mL de água. Nessa etapa, o

rizoma deve ser reduzido para uma altura entre 3 cm e 4 cm, sendo aproximadamente metade desse tamanho a parte do rizoma, e a outra, a parte aérea (Figura 6-A), e cerca de 2 cm de diâmetro (Figura 6-B).



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 5. Rizoma de bananeira cv. Williams, de tamanho já reduzido, sendo cortado com incisões retas, na bancada do laboratório.

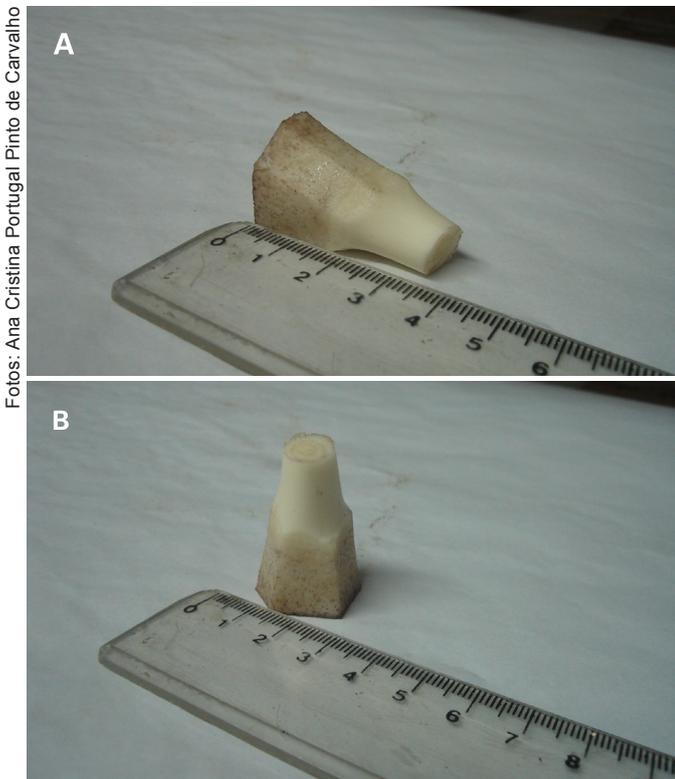
Depois de reduzidos os rizomas, com seus ápices caulinares, eles devem ser colocados em um recipiente com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (50 mL de água sanitária + 950 mL de água destilada). Recomenda-se adicionar, a essa solução, cinco gotas de detergente comum. Geralmente, são utilizados, de cada vez, 25 rizomas, com seus ápices caulinares (explantes), para cada litro de solução desinfestante (Figura 7).



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 7. Desinfestação de 25 ápices caulinares, de bananeira cv. Willimas, para cada litro de solução desinfestante, em becker de plástico de 2 L.

Após esse procedimento, o recipiente deve ser levado para a capela de fluxo laminar, onde os explantes serão desinfestados, em condições assépticas. O processo de desinfestação consiste na eliminação dos microrganismos presentes na superfície do explante, a fim de evitar contaminações fúngicas e bacterianas, extremamente prejudiciais para o êxito do estabelecimento da cultura e posterior manipulação do material introduzido in vitro. Esse procedimento de desinfestação deve ser realizado em três etapas de imersão: primeiro em solução de álcool 70% durante dois minutos; posteriormente em hipoclorito de sódio 3% adicionado de 20 gotas do espalhante adesivo Tween® 20 por 15 minutos; por fim, após a desinfestação nas soluções de álcool e de hipoclorito de sódio, os explantes são enxaguados em três lavagens sucessivas, por meio da imersão, em água destilada e esterilizada visando retirar o excesso de produtos.



Fotos: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 6. Rizoma de bananeira cv. Williams, após redução do tamanho, apresentando de 3 cm a 4 cm de altura, sendo aproximadamente metade desse tamanho a parte do rizoma, e a outra, a parte aérea (6-A), e cerca de 2 cm de diâmetro (6-B).

Todos os materiais, tais como vidrarias, recipientes de plástico e outros instrumentos utilizados no procedimento de desinfestação, bem como a água destilada, devem ser esterilizados em autoclave durante 30 minutos a 121 °C.

Os explantes são inicialmente imersos em uma solução de álcool 70% por 2 minutos (1 litro para cada 25 explantes). Essa é uma etapa importante, pois o álcool auxilia na quebra da tensão superficial do tecido vegetal e permite que, posteriormente, o agente desinfestante possa ter maior contato com a superfície do explante. Como agente desinfestante, pode ser utilizada água sanitária pura adicionada de 20 gotas (2 gotas para cada 100 mL de solução) de Tween® 20 por 15 minutos, ou solução de hipoclorito de sódio a 3% (v/v), também adicionada de Tween® 20, e pelo mesmo intervalo de tempo. Utiliza-se 1 litro para cada 25 explantes.

Posteriormente, são realizadas três lavagens em água destilada e esterilizada, onde os explantes são imersos durante 2 minutos para cada enxágue, considerando que, em cada lavagem, devem ser imersos 25 explantes por litro de água destilada.

A desinfestação do material vegetal é um fator importante na introdução da cultura *in vitro*. Se essa etapa não for realizada adequadamente, todo o processo pode ficar comprometido pela ocorrência de contaminação por fungos e bactérias.

Observação: No processo de desinfestação do material vegetal realizado na capela de fluxo laminar, em condições assépticas, a água sanitária comum tem geralmente 2% de cloro ativo, e o hipoclorito de sódio PA (NaClO) tem teor de aproximadamente 10%. Se for usar água sanitária comum, recomenda-se utilizá-la na forma pura, mas se for hipoclorito de sódio PA recomenda-se usar 300 mL de hipoclorito de sódio para cada 700 mL de água destilada autoclavada. Se o material estiver muito contaminado, essa proporção pode ser aumentada, recomendando-se 500 mL de hipoclorito de sódio para 500 mL de água destilada autoclavada.

Fase de estabelecimento dos explantes em meio nutritivo

Uma vez desinfestados os materiais vegetais, com o auxílio de pinças e bisturis, deve ser retirado o excesso de tecido, até que os explantes atinjam um

tamanho final de aproximadamente 1 cm de altura e 0,5 cm de largura (Figura 2).

O meio de cultura usado para o estabelecimento dos explantes constitui-se do meio básico proposto por Murashige e Skoog (1962), denominado MS (Tabela 2), adicionado de 1,0 mgL⁻¹ do fitorregulador 6-benzilaminopurina (BAP), suplementado com 30 gL⁻¹ de sacarose, e 4,0 gL⁻¹ de Agargel. A concentração do agente gelificante vai depender da marca do produto e da consistência desejada do meio de cultura. O pH deve ser ajustado em 5,8, antes da esterilização. A esse meio de cultura, pode ser adicionado um antioxidante, como o carvão ativado (200-250 mgL⁻¹) caso seja observada intensa oxidação dos explantes, característica mais comum às variedades de bananeira com genomas AB/AAB, como as do grupo Prata (HIRIMBUREGAMA; GAMAGE, 1997; RESMI; NAIR, 2011).

Os tubos de ensaio (150 mm x 25 mm) contendo de 5 mL a 10 mL de meio de cultura devem ser esterilizados a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm durante 15 a 20 minutos, na autoclave. Em cada tubo de ensaio, deve ser inoculado apenas um explante (Figura 2). As culturas devem ser transferidas para sala de crescimento, sob condições controladas de temperatura, 24 ± 2 °C, mantendo-as, inicialmente, por 7 dias no escuro (sugestão: tampar com pano ou plástico preto). Após esse período, as culturas devem ser expostas à intensidade luminosa próxima de 2.000 lux ou 30 μmolm⁻²s⁻¹, sob fotoperíodo de 12 horas de luz, por 7 dias. Essas condições devem ser utilizadas até que as mudas sejam transferidas para a fase de aclimatização.

Durante a fase de estabelecimento, são identificados e descartados os explantes contaminados por fungos e bactérias ou oxidados.

A contaminação dos ápices caulinares de bananeira, após a inoculação *in vitro*, é mais frequente por bactérias do que por fungos. Vários fatores podem afetar o índice de contaminação, sendo os mais importantes o manejo e a época do ano para a retirada do rizoma do campo. Quando os rizomas são coletados em épocas chuvosas ou em plantios excessivamente irrigados, a ocorrência de contaminação *in vitro* é elevada, acarretando a eliminação de grande parte dos explantes (SINGH et al., 2011; SANTOS-SEREJO et al., 2009).

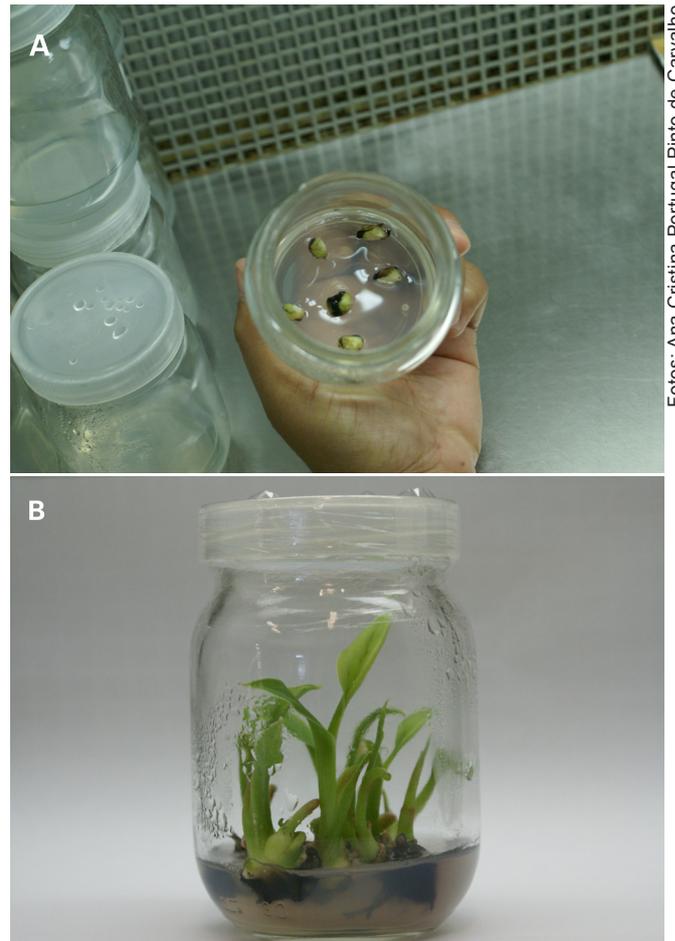
O índice de contaminação bacteriana também pode ser influenciado pelo método de desinfestação empregado e pelo tamanho do explante a ser inoculado *in vitro*. Quanto maior for o tamanho do explante, maior será a possibilidade de ocorrência de contaminações (SANTOS-SEREJO et al., 2009). Nos trabalhos realizados na Embrapa Agroindústria Tropical, tem-se verificado que, independente da cultivar de bananeira, o índice de contaminação registrado nas culturas, nessa etapa do processo de micropropagação, fica entre 15% a 20%.

Fase de proliferação ou multiplicação das brotações

Depois de 14 dias na fase de estabelecimento, os ápices caulinares devem ser transferidos para a fase de proliferação ou multiplicação. Os explantes a serem utilizados, nessa fase, constituem-se de brotações obtidas a partir dos ápices caulinares iniciais inoculados *in vitro*, estabelecidos na fase anterior. Recomenda-se a eliminação de tecidos escurecidos da base dos explantes, quando houver, visando ao controle da liberação de polifenóis que interferem na proliferação do material vegetal. Nessa etapa, com o uso de um bisturi, recomenda-se seccionar longitudinalmente, em duas partes, os explantes bem desenvolvidos e com aparência de cor verde, visando quebrar a dominância apical, e estimular a formação de gemas axilares. Recomenda-se, também, cortar um pouco da base do rizoma dos explantes para que o tecido entre em contato com o meio de cultura.

Nessa etapa, são induzidos o crescimento e a formação de brotos ao redor do explante, mediante a utilização de reguladores de crescimento (Figura 8-A e B). O princípio de regenerar novas plantas a partir de um único propágulo se baseia na ativação do crescimento de gemas axilares presentes na inserção das folhas na base do rizoma, por meio de balanço hormonal (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2009).

O BAP é a citocinina mais recomendada para a micropropagação da bananeira. Entretanto, a concentração ideal é genótipo-dependente, sendo as maiores taxas de multiplicação obtidas entre 2,5 mgL⁻¹ e 5,0 mgL⁻¹ (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2009). O melhor desempenho do BAP em relação às outras citocininas, na indução da formação de brotações múltiplas em culturas de ápices caulinares, tem sido relatado para várias cultivares de bananeira (IKRAM-



Fotos: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 8. Fase de multiplicação: 6 gemas axilares de bananeira cv. Williams, individualizadas e inoculadas no meio de cultura de multiplicação, no 5º subcultivo (A); e material obtido ao final do 5º subcultivo, 30 dias após inoculação, contendo o crescimento e a formação de brotos ao redor dos explantes (B).

UL-HAQ; DAHOT, 2007). Os efeitos superiores dessa citocinina podem ser atribuídos à sua alta estabilidade nas culturas *in vitro*, tendo em vista não ser degradada com facilidade, persistindo, assim, no meio de cultura por mais tempo (RESMI; NAIR, 2011).

As culturas podem ser incubadas em vários tipos de recipientes. Os mais usados são os de vidro do tipo “frasco de maionese” com capacidade de 220 mL, vedados com tampas plásticas. Em cada frasco, são colocados 30 mL de meio de cultura MS suplementado com 2,5 mgL⁻¹ de BAP.

A concentração desse fitorregulador pode variar principalmente em função do tipo de explante, da variedade/cultivar de bananeira e do número de subcultivos a ser realizado.

Nessa etapa, geralmente são efetuados seis subcultivos sucessivos, a intervalos de aproximadamente 30 dias cada um. O número de explantes inoculados pode variar em função do tipo de frasco utilizado e do número de subcultivos a ser realizado. Recomenda-se o aumento gradativo do número de explantes inoculados por frasco, à medida que vão sendo realizados os subcultivos, visando reduzir as perdas por contaminação, pois os índices de contaminação dos explantes tendem a ser maiores nos primeiros subcultivos. Sendo assim, normalmente, recomenda-se, para os primeiros subcultivos, a inoculação de um menor número de explantes por frasco.

Sugestão quanto ao número de explantes a serem inoculados por frasco (frasco de vidro com capacidade de 220 mL, contendo 30 mL de meio de cultura), nos diferentes subcultivos: 1º subcultivo – 2 explantes/frasco; 2º subcultivo – 3 explantes/frasco; 3º subcultivo – 4 explantes/frasco; 4º subcultivo – 5 explantes/frasco; e 5º e 6º subcultivos – 6 explantes/frasco.

O número de subcultivos, além de outros fatores como o genótipo, tipo de explante e componentes do meio de cultivo utilizado, tem influência sobre a estabilidade genética das plantas obtidas (JAMBHALE et al., 2001; SANTOS; RODRIGUES, 2004; SANTOS-SEREJO et al., 2009). Quanto maior for o número e o tempo de duração de cada subcultivo, maior será a probabilidade de ocorrência de plantas com alterações genéticas, ou seja, de variantes somaclonais (SANTOS-SEREJO et al., 2009; KHAN et al., 2011). Em trabalhos realizados por Rodrigues et al. (1998), Jambhale et al. (2001), Santos e Rodrigues (2004) e Matsumoto et al. (2006), constatou-se que a ocorrência de variantes somaclonais aumentou com o número de subcultivos.

Para minimizar a incidência da variação somaclonal nas mudas micropropagadas, tem sido sugerido que o número máximo de subcultivos a ser efetuado não ultrapasse a cinco (SANTOS-SEREJO et al., 2009), sete (SINGH et al., 2011) ou oito (JAMBHALE et al., 2001; CHAVAN-PATIL et al., 2010; KHAN et al., 2011), dependendo da cultivar de bananeira e do protocolo utilizado. Santos e Rodrigues (2004) enfatizam que, apesar de indicar a mesma tendência de aumento da variação somaclonal em vista do número de subcultivos, o comportamento *in vitro* é diferente em função da cultivar de bananeira.

Segundo esses mesmos autores, o aumento tanto da porcentagem de variação somaclonal quanto do número de subcultivos indica o cuidado que as biofábricas devem ter em relação a esse parâmetro, desenvolvendo protocolos de micropropagação específicos para cada cultivar a ser comercializada, e limitando o número de subcultivos para obtenção de mudas de alta qualidade genética.

Segundo Scherwinski-Pereira et al. (2009), atualmente existem laboratórios (biofábricas), tanto no Brasil quanto em outros países, que utilizam a micropropagação com taxas de variações somaclonais nas mudas inferiores a 2%.

Em relação ao BAP, concentrações mais elevadas podem resultar num maior número de plantas com variação somaclonal. A concentração ideal de BAP recomendada para a micropropagação de bananeira é de 4,5 mgL⁻¹ (BUAH et al., 2010). Segundo Matsumoto et al. (2006), em muitos laboratórios comerciais de micropropagação, são utilizadas concentrações entre 3,0 mgL⁻¹ e 5,0 mgL⁻¹, ou mesmo concentrações inferiores a 3,0 mgL⁻¹.

Segundo Resmi e Nair (2011), a taxa de multiplicação é o fator mais importante no processo de micropropagação. Os autores mencionam que, além do genótipo, as fases de produção e de alongamento dos brotos são influenciadas pelo tipo e pela concentração da citocinina adicionada ao meio de cultura.

O número final de plantas resultantes a partir de um ápice caulinar, que foi submetido a seis subcultivos sucessivos, é muito variável, principalmente em função do genótipo da cultivar ou variedade, do meio de cultura, das condições de crescimento e do sistema de propagação utilizado. Em média, são obtidas de 150 a 300 mudas por ápice caulinar (SANTOS-SEREJO et al., 2009). Para a cultivar Williams, Reuveni et al. (1986) sugerem que o número máximo de mudas obtido a partir de um ápice caulinar deve ser de aproximadamente 1.000 plantas.

Em geral, os genótipos diploides apresentam taxas de multiplicação superiores às das cultivares comerciais, e, entre estas, o número de mudas obtidas durante subcultivos sucessivos é maior nas variedades do grupo Cavendish (genoma AAA), quando comparado com o das variedades de

genoma AAB e ABB (RESMI; NAIR, 2011; SINGH et al., 2011).

Nos trabalhos desenvolvidos na Embrapa Agroindústria Tropical, têm-se efetuado seis subcultivos sucessivos, sendo a concentração de BAP adicionada ao meio de cultura de $2,5 \text{ mgL}^{-1}$. A taxa média de multiplicação registrada tem variado um pouco em função da cultivar. Para cv. Williams, variedade do grupo Cavendish, esse valor é de 3,5, enquanto, para as do grupo Prata, como Prata Catarina, Prata Anã e Maçã, os índices são 3,0; 2,6 e 2,9 respectivamente. E, para a variedade Tropical (genoma AAAB), têm sido verificadas as taxas de multiplicação de 3,3.

Fase de enraizamento e alongamento das brotações

Após a fase de proliferação ou multiplicação, isto é, após os seis subcultivos sucessivos, as brotações devem ser individualizadas e transferidas para um meio novo de forma que possam alongar e enraizar. Os explantes a serem transferidos para a fase de alongamento e enraizamento devem ser brotações com a parte aérea desenvolvida e com aproximadamente de 2 cm a 3 cm de altura, retirando-se apenas o excesso de tecido oxidado, se houver.

As brotações devem ser colocadas no mesmo tipo de frasco usado na fase anterior, com 30 mL de meio de cultura, utilizando seis explantes por frasco. O meio de alongamento e enraizamento constitui-se do meio MS suplementado, geralmente de $0,01 \text{ mg/L}$ da auxina ANA (ácido naftalenoacético). A auxina a ser adicionada ao meio de cultura pode variar no tipo e na concentração. Algumas cultivares de bananeira se desenvolvem adequadamente em meio MS, sem a necessidade da adição de auxina ao meio de cultura, como a cultivar Williams.

As condições da sala de crescimento devem ser as mesmas das fases anteriores. Essa fase pode durar de 30 a 45 dias (dependendo da cultivar/variedade), sendo importante que as mudas atinjam uma altura aproximada de 4 cm a 6 cm, e que ocorra formação abundante de raízes para que as plantas possam passar à etapa de aclimatização com maior garantia de sobrevivência (Figura 9).

Em trabalho desenvolvido em conjunto com a BioClone, as mudas micropropagadas de bananeira



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 9. Mudanças de bananeira cv. Williams, de 4 cm a 6 cm de altura, obtidas 30 a 45 dias após inoculação no meio de alongamento e enraizamento, com a formação de raízes, adequadas para passar para a fase de aclimatização.

das cultivares Williams, Prata Catarina e Tropical, após cultivo durante 30 dias, na fase de alongamento e enraizamento, apresentaram as seguintes características: altura da planta (4,5 cm, 5,4 cm e 6,1 cm), número de folhas (5,2; 2,5 e 3,5), diâmetro do pseudocaulo (0,38 cm, 0,45 cm e 0,58 cm) comprimento da maior raiz (7,5 cm, 22,3 cm e 4,4 cm) e massa fresca da muda (2,3 g, 2,9 g e 4,9 g), respectivamente.

O número de mudas obtidas no período de 6 a 8 meses, por micropropagação, segundo Santos-Serejo et al. (2009), é de 150 a 300 mudas por ápice caulinar. Nos trabalhos desenvolvidos na Embrapa Agroindústria Tropical, o número médio de mudas micropropagadas obtidas, ao final da etapa de alongamento e enraizamento, por ápice caulinar estabelecido *in vitro*, é de 170 para as cultivares que vêm sendo produzidas no laboratório.

Aclimatização das mudas micropropagadas

A aclimatização é necessária porque as mudas produzidas *in vitro* apresentam tamanho reduzido, necessitando de uma etapa intermediária entre a produção da muda em laboratório e o plantio no campo. Nessa etapa, as mudas são transferidas para

um ambiente com as condições climáticas naturais. Essas novas condições devem ser passadas às plantas progressivamente para que elas sofram menor estresse, pois ele pode culminar em injúrias profundas ou até mesmo em morte (BRAINERD; FUCHIGAMI, 1981).

Dessa forma, a aclimatização representa uma etapa importante no processo de produção *in vitro* de mudas, sendo que, em alguns casos, chega a ser o fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Os explantes ideais são mudas com parte aérea e raízes bem desenvolvidas, apresentando de 4 cm a 6 cm de altura. As mudas devem ser cuidadosamente retiradas dos frascos de cultivo, lavadas abundantemente com água corrente até que todo o meio de cultura tenha sido retirado (Figura 10). Após esse procedimento, as raízes devem ser podadas, deixando as mudas com raízes de 1 cm de comprimento (Figura 11).

Esse procedimento, além de facilitar o plantio da muda no substrato, estimula o desenvolvimento de novas raízes. As mudas devem ser separadas individualmente, contadas e colocadas em bandejas (Figura 12-A) ou em caixas de isopor (Figura 12-B), até serem aclimatizadas. Nessas condições, recomenda-se que as mudas não permaneçam por mais de três dias, devendo ser acondicionadas em local refrigerado.



Fotos: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 11. Poda das raízes das mudas de bananeira cv. Williams, deixando as raízes com aproximadamente 1 cm de comprimento.



Fotos: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho



Figura 12. Acondicionamento das mudas de bananeira cv. Williams em bandejas (A) ou em caixas (B) de isopor, para serem aclimatizadas.



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 10. Mudanças de bananeira cv. Williams, de 4 cm a 6 cm de altura, sendo retiradas dos frascos de cultivo, e lavadas em água corrente, até que todo o meio de cultura tenha sido eliminado.

Na BioClone e TopPlant, a aclimatização das mudas micropropagadas de bananeira é efetuada em três etapas. Inicialmente, as mudas são plantadas em bandejas de isopor, com dimensões de 70 cm de comprimento x 35 cm de largura e 5 cm de altura, constituídas de 162 células. As bandejas devem conter substrato Amafibra, composto por fibra de coco, adubo NPK e micronutrientes, sendo mantidas em câmara úmida (Figura 13), por apenas um dia.

A seguir, são transferidas para estufa, permanecendo, nessas condições, por mais 20 dias. Após esse período, as mudas são transferidas para a segunda etapa, na qual são plantadas em bandejas de plástico com dimensões de 67 cm comprimento x 33 cm de largura x 10 cm de altura, constituídas de 72 células, e com o mesmo substrato da fase anterior, permanecendo sob condições de estufa por três semanas (Figura 14).

Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho



Figura 13. Mudanças micropropagadas de bananeira cv. Williams, sendo aclimatizadas em bandejas de isopor, sob condições de câmara úmida.

Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho



Figura 14. Mudanças micropropagadas de bananeira cv. Maçã sendo aclimatizadas em bandejas de isopor, sob condições de estufa.

Ao final da segunda etapa, as mudas micropropagadas da cultivar Williams apresentam, em média, seis folhas, 18,0 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro do pseudocaule. Na terceira etapa, as mudas são transferidas para sacos plásticos pretos de capacidade de 2,5 kg (Figura 15), contendo como substrato solo profundo, composto orgânico (esterco) e casca de coco, na proporção de 3:1:1. Permanecem sob condições de estufa por quatro semanas. Ao final da terceira etapa, as mudas micropropagadas da cultivar Williams apresentam, em média, 10 folhas, 30,0 cm de altura e 9,0 cm de diâmetro do pseudocaule. Outra opção seria o uso de substrato formado por 60% de solo, 30% de areia e 10% de vermicomposto, e aclimatização das mudas em tubetes, com volume de 300 cm³ (Figura 16).



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 15. Mudanças micropropagadas de bananeira cv. Williams sendo aclimatizadas em sacos plásticos pretos, sob condições de estufa.



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 16. Mudanças micropropagadas de bananeira cv. Maçã, sendo aclimatizadas em tubetes, com volume de 300 cm³.

O substrato utilizado no recipiente durante a permanência das mudas, no viveiro (casa de vegetação, estufa ou telado), deve apresentar boas características físicas, químicas e biológicas, possibilitando, assim, o rápido crescimento da muda, um bom teor de matéria seca nas partes aérea e radicular, dentre outras características (YAMANISHI et al., 2004).

Nessa etapa, as mudas devem ser aclimatizadas, sob condições de estufa (Figura 17-A) ou telado (Figura 17-B), com sistema de irrigação preferencialmente por microaspersão ou nebulização, e com sombreamento de 50% a 75%. A temperatura deve ficar de 24 °C a 26 °C, e a umidade relativa do ar, maior que 80% (SINGH et al., 2011). Essa etapa dura em média de 45 a 60 dias, e as mudas estão prontas para serem plantadas no campo quando atingirem altura de 30 cm (Figura 18).

Segundo Singh et al. (2011), podem ser plantadas no campo mudas micropropagadas de bananeira, com

20 cm a 30 cm de altura e que apresentam de 3 a 5 folhas (SINGH et al., 2011).

Durante o período de aclimatização, é feita a eliminação de plantas que apresentem algum tipo de anormalidade, como crescimento muito lento e folhas mal formadas ou muito espessas (SANTOS-SEREJO et al., 2009).



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 18. Muda micropropagada de bananeira cv. Prata Catarina com aproximadamente 30 cm de altura, sendo plantada no campo, na Fazenda FrutaCor, em Limoeiro do Norte, no Estado do Ceará.

Considerações finais

De acordo com Ariel (1997), dados obtidos em trabalhos de pesquisa apontam que as mudas micropropagadas de bananeira apresentam melhor desempenho no campo, quando comparadas às mudas obtidas pelos métodos convencionais. Entre essas vantagens, podem ser destacadas: colheitas superiores, registrando aumentos de produção entre 15% a 25%, por serem obtidas a partir de matrizes selecionadas e estarem isentas de doenças (DREW; SMITH, 1990); colheita precoce dos frutos, tendo em vista a redução de quatro a oito semanas para a primeira floração; e maior uniformidade, em tamanho e desenvolvimento das plantas, possibilitando planejar a colheita dos frutos para períodos mais convenientes de comercialização. Essas diferenças na produtividade podem ser justificadas pelo estado fitossanitário e pelo vigor das mudas (ÁLVARES; CALDAS, 2002).

Robinson et al. (1993), testando mudas das variedades Grande Naine e Williams, obtidas por métodos in vitro e convencional, durante três ciclos de produção, observaram que as plantas oriundas de



Fotos: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 17. Infraestrutura da estufa/telado onde as mudas são aclimatizadas. Mudanças micropropagadas de bananeira, após 60 dias de plantio em sacos plásticos pretos, com aproximadamente 30 cm de altura, em desenvolvimento adequado para serem plantadas no campo, na TopPlant, em Icapuí (A) e na Fazenda FrutaCor, em Limoeiro do Norte, ambos no Estado do Ceará (B).

mudas micropropagadas mostraram superioridade de 14% na produção. Resultados semelhantes foram obtidos por Álvares e Caldas (2002) para as cultivares Prata Anã e Nanicão.

Lee (2006) enfatiza que as mudas micropropagadas apresentam maior taxa de sobrevivência e demandam menor aplicação de insumos para o controle de pragas e doenças, no campo, além de crescerem mais rapidamente nos primeiros estágios de desenvolvimento do que as mudas convencionais (ARIAS, 1992), resultando, assim, em plantas mais vigorosas (TEIXEIRA; BETTIOL NETO, 2011). Além disso, são precoces na emissão de brotações e produzem mais mudas por ano (PEREIRA et al., 2001). Em relação à produção, as mudas provenientes da cultura de tecidos apresentam crescimento e desenvolvimento mais uniforme dos frutos, possibilitando a programação da colheita, que pode ser antecipada em 60 a 70 dias, quando comparada com a das mudas convencionais (SINGH et al., 2011). Além de maior precocidade, as plantas são mais produtivas, e a uniformidade de produção facilita os tratamentos culturais (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2009). As mudas advindas de micropopagação apresentam essas vantagens sobre as convencionais por serem obtidas a partir de matrizes selecionadas e estarem isentas de doenças (DREW; SMITH, 1990).

As mudas não devem apresentar variação somaclonal (variabilidade genética gerada durante a cultura *in vitro* que permite o aparecimento de indivíduos diferentes da planta matriz) (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). A identificação dos variantes somaclonais deve ser feita antes do estabelecimento das mudas no campo, preferencialmente ainda nas condições *in vitro*, ou na fase de aclimatização (Figura 19). A eliminação desses materiais nessa fase tem grande significado para a propagação de bananeira *in vitro*, haja vista que isso evita um grande prejuízo econômico e a multiplicação de material fora do padrão. A ausência de mudas micropropagadas com variação somaclonal é importante para o sucesso da ação e a superioridade na performance em campo das plantas micropropagadas em comparação com as mudas convencionais (BERNARDI et al., 2004). Assim, pode-se inferir que a utilização de mudas micropropagadas, para plantio comercial (Figura 20-A, B), oferece melhor garantia de produtividade elevada.



Foto: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 19. Identificação de variantes somaclonais (plantas apresentando nanismo e variação de cor das folhas) em mudas micropropagadas de bananeira cv. Maçã, durante a fase de aclimatização, na Fazenda FrutaCor, em Limoeiro do Norte, no Estado do Ceará.



Fotos: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 20. Plantio comercial de bananeira cv. Prata Catarina, com mudas micropropagadas, em fase de desenvolvimento vegetativo (A) e em fase de produção (B), na Fazenda FrutaCor, em Limoeiro do Norte, no Estado do Ceará.

Referências

- ÁLVARES, M. C.; CALDAS, L. S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, n. 3, p. 415-420, 2002.
- ALVES, É. J.; BEZERRA, M. L.; SANTOS-SEREJO, J. A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Org.). **A cultura da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 59-86.
- ARIAS, O. Commercial micropropagation of banana. In: WORKSHOP ON BIOTECHNOLOGY APPLICATIONS FOR BANANA AND PLANTAIN IMPROVEMENT, 1992, San José. **Proceedings...** San José: INIBAP, 1992. p. 139-142.
- ARIEL, T. Micropropagación de la banana usando técnicas de cultivo de tejidos. **Guia de Agrotecnología em Israel**, p. 54- 55, 1997.
- BERNARDI, W. F.; RODRIGUES, B. I.; CASSIERE NETO, P.; ANDO, A.; TULMANN NETO, A.; CERAVOLO, L. C.; MONTES, S. M. N. M. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 503-506, 2004.
- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured plants to low relative humidity. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.
- BUAH, J. N.; DANSO, E.; TAAH, K. J.; ABOLE, E. A.; BEDIKO, E. A.; ASIYEDU, J.; BAIDOO, R. The effects of different concentrations of cytokinins on the *in vitro* multiplication of plantain (*Musa sp.*). **Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 343-347, 2010.
- CHAVAN-PATIL, V. B.; AREKAR, C. D.; GAIKWAD, D. K. Field performance of *in vitro* propagated banana plants from 8th and 15th subculture. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 1, n. 2, p. 96-103, 2010.
- DREW, R. A.; SMITH, M. K. Field evaluation of tissue-cultured bananas in South-Eastern Queensland. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 30, n. 4, p. 569-574, 1990.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP:EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-170.
- HIRIMBUREGAMA, K.; GAMAGE, N. Cultivar specificity with respect to *in vitro* micropropagation of *Musa spp* (banana and plantain). **Journal of Horticultural Science**, v. 72, n.2, p. 205-211, 1997.
- IKRAM-UL-HAQ; DAHOT, M. U. Micro-propagation efficiency in banana (*Musa sp.*) under different immersion systems. **Pakistan Journal of Biology Sciences**, v.10, n.5, p. 726-733, 2007.
- JAMBHALE, N. D.; PATIL, S. C.; JADHAV, A. S.; PAWAR, S. V.; WAGHMODE, B. D. Effect of number of subcultures on *in vitro* multiplication of four banana clones. **Infomusa**, v. 10, n. 1, p. 38-39, 2001.
- KHAN, S.; SAEED, B.; KAUSER, N. Establishment of genetic fidelity of *in-vitro* raised banana plantlets. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 1, p. 233-242, 2011.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LEE, S. W. **Micropropagation of Cavendish banana in Taiwan**. 2006. Disponível em: <<http://www.agnet.org/library/abstract/tb163a.html.2006>>. Acesso em: 21 out. 2010.
- MATSUMOTO, K.; CALDAS, L. S.; YAMAMOTO, Y. Response of banana dwarf somaclonal variants to benzylaminopurine. **Infomusa**, v. 15, n. 1-2, p. 27-29, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NOMURA, E. S.; FUZITANI, E. J. Propagação de bananeira. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 13., 2005, Registro. **Anais...** São Paulo : Instituto Biológico, 2005. p. 59-65, 2005.
- PEREIRA, L. V.; SILVA, C. R. R.; ALVARENGA, A. A. Influência do tipo de muda no comportamento vegetativo e produtivo da bananeira cv. Prata Anã. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 164-167, 2001.
- RESMI, L.; NAIR, A. S. Differential effect of cytokinins in the micropropagation of diploid and triploid *Musa* cultivars. **International Journal of Integrative Biology**, v. 11, n.1, p. 35-38, 2011.
- REUVENI, O.; ISRAELI, Y.; DEGANI, H.; ESHDAT, Y. Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. In: INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES MEETING, 1986, Rome. **Resumos ...** Rome: IBPGR, 1986. p. 36.
- ROBINSON, J. C.; CONNIE FRASER.; ECKSTEIN, K. A field comparison of conventional suckers with tissue banana planting material over three crop cycles. **Journal of Horticultural Science**, v. 68, n.6, p. 831-836, 1993.
- RODRIGUES, P. H. V.; TULMANN NETO, A.; CASSIERI NETO, P.; MENDES, B.M.J. Influence of the number of subcultures on the somaclonal variation of banana plantlets cv. Nanica in Vale do Ribeira-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 20, n. 1, p. 74-79, 1998.
- 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.
- SANTOS, C. C. C.; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.
- SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; SOUZA, F. V. D.; JUGHANS, T. G.; LINO, L. S. M.; SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.

Micropropagação da bananeira. In: JUGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 237-255.

SCARPARE FILHO, J. A.; MINAMI, K.; KLUGE, R. A.; TESSARIOLI NETO, J. Estudo do primeiro ciclo produtivo da bananeira 'Nanicão' (*Musa sp.*) desenvolvida a partir de diferentes tipos de mudas. **Scientia Agricola**, v.55, n.1, p. 86-93, 1998.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. da S.; OLIVEIRA, J. P. de. Micropropagação de bananeira visando à produção massal de mudas de elevado padrão genético e fitossanitário. In: GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. de (Org.). **Embrapa: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do sudoeste da Amazônia**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2009, v. 1, p. 253-290.

SINGH, H. P.; SELVARAJAN, S. U.; KARIHALOO, J. L. **Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific**. Nova Delli: APCoAB/APAARI, 2011, 94p.

SOUZA, A da S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. Produção de mudas. In: CORDEIRO, Z.J.M (Org.). **Banana. Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000, p. 39-46.

TEIXEIRA, L. A. J.; BETTIOL NETO, J. E. Comportamento agrônomo de bananeira 'Prata Anã' em função do tipo de muda. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33. n. 1, p. 89-95, 2011.

YAMANISHI, O. K.; FAGUNDES, G. R.; MACHADO FILHO, J. A.; VALONE, G. V. Efeito de diferentes substratos e duas formas de adubação na produção de mudas de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 1, n. 2, p. 276-279, 2004.

Apoio



Circular Técnica, 37

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici
Fone: (0xx85) 3391-7100
Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7195
E-mail: negocios@cnpat.embrapa.br

1ª edição (2012): on-line

Comitê de Publicações

Presidente: Marlon Vagner Valentim Martins
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama

Membros: José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cássia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim e Fábio Rodrigues de Miranda

Expediente

Revisão de texto: Marcos Antonio Nakayama
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira
Normalização bibliográfica: Rita de Cassia C. Cid.