

CRESCIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DA BANANEIRA PRATA ANÃ EM FUNÇÃO DE MARCAS E CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR¹

Marcio Akira Couceiro²
Dalmo Lopes de Siqueira³
Walter E. Pereira³

RESUMO

Avaliou-se o efeito de várias marcas e concentrações de ágar sobre algumas características relacionadas com o crescimento *in vitro* de explantes da bananeira Prata Anã. Em um dos experimentos, foram utilizadas as seguintes marcas de ágar: Grupo-Química, Micro-Med, Reagen e Vetec. No outro experimento, avaliaram-se cinco concentrações de ágar: 0, 2, 4, 6, e 8 g L⁻¹. Os experimentos foram conduzidos no delineamento em blocos casualizados, com quatro ou cinco repetições. As marcas Vetec e Micro-Med apresentaram os melhores resultados para o estabelecimento dos explantes. Não foram observadas diferenças significativas entre as várias marcas de ágar na produção de gemas, de massa fresca e de massa seca, pelos explantes na fase de multiplicação. Nesta fase, observou-se que as diferentes concentrações de ágar não influenciaram na produção de gemas, porém a produção de matéria seca e de matéria fresca diminuíram linearmente com o aumento da concentração de ágar no meio de cultura. Na fase de enraizamento, verificou-se que os valores de todas as características avaliadas tiveram um aumento com o acréscimo da concentração de ágar até determinado valor, a partir do qual diminuíram. Considerando o acúmulo de massa seca, recomenda-se a utilização de 2,5 g L⁻¹ de ágar no meio de cultura.

Palavras-chaves: *Musa* sp., gemas, massa fresca, massa seca.

¹ Aceito para publicação em 06.08.2001.

² Bolsista de Iniciação Científica do CNPq-UFV, 36571-00 Viçosa, MG. E-mail: marcioakira@bol.com.br

³ Departamento de Fitotecnia da UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

ABSTRACT

IN VITRO GROWTH OF PRATA ANÃ BANANA EXPLANTS AS A FUNCTION OF AGAR BRANDS AND CONCENTRATIONS

This work aimed to evaluate the effect of various agar brands and concentrations on some characteristics related with *in vitro* growth of the Prata Anã banana plant. The treatments in one of the experiments consisted in using the following agar brands: Grupo-Química, Micro Med, Reagen and Vetec. In the other experiment, the following agar concentrations were evaluated: 0, 2, 4, 6 and 8 g L⁻¹. The experiments were arranged in a randomized complete-block design with four or five replications. The brands Vetec and Micro-Med presented the best results for the establishment of the explants. No significant differences were found among the different agar brands used for bud, fresh matter and dry matter productions by the explants during the multiplication phase. During this phase, the different agar concentrations were not found to influence bud production. However, dry matter yields decreased linearly with the increase of agar concentration in the culture medium. During rooting, all the characteristics related with growth had an increase as agar concentration increased up to a certain value, decreasing afterwards. A concentration of 2.5 g L⁻¹ of agar is recommended.

Key words: *Musa* sp., bud, fresh matter, dry matter.

INTRODUÇÃO

A micropropagação desempenha um papel importante no processo de multiplicação de plantas e de transferência de tecnologia, pois facilita o intercâmbio de plantas sadias de uma região para outra, promovido por instituições nacionais e internacionais. Constitui-se ainda, em um grande potencial de aplicação nos programas de seleção e melhoramento genético, permitindo a multiplicação de novos cultivares e híbridos selecionados (1).

As características das plantas obtidas através da cultura de tecidos variam de acordo com as concentrações dos reguladores de crescimento, dos nutrientes e da natureza física do meio de cultura (15).

Diversas formulações de meio básico têm sido utilizadas nos cultivos. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS (7), suas modificações e diluições têm apresentado resultados satisfatórios (2).

A natureza física do meio de cultivo também influencia no crescimento e na multiplicação das culturas, durante a micropropagação. O principal solidificador dos meios de cultura é o ágar, porém as diferentes marcas apresentam diferentes graus de pureza, podendo influenciar na qualidade das plantas desenvolvidas em seu meio (15).

A utilização do ágar como agente solidificante do meio de cultura apresenta algumas desvantagens, como: prevenir a morfogênese em certas culturas, devido à presença de substâncias inibidoras (4); tornar o crescimento lento, devido à ocorrência de adsorção seletiva dos componentes pelo ágar (1); e difundir exsudatos tóxicos provenientes dos

explantes, vagorosamente, no meio com ágar, restringindo a absorção dos outros componentes do meio, pelos explantes (15).

Tem sido relatado que o tipo de ágar utilizado como solidificante do meio afeta o desenvolvimento e o crescimento de protoplastos de repolho vermelho (5), de anteras de fumo (6) e de ramos juvenis e adultos de *Quercus robur* (8).

Também, a concentração do ágar influi na propagação das plantas, apresentando efeito marcante sobre o potencial matricial do meio de cultura (2).

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de várias marcas e concentrações de ágar sobre algumas características relacionadas com o crescimento de explantes *in vitro* da bananeira Prata Anã.

MATERIAL E MÉTODOS

Fase de estabelecimento com marcas de ágar

Para realização deste trabalho, foram utilizadas bananeiras do cultivar Prata Anã, provenientes do pomar da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e explantes existentes no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais (LCCTV) do Setor de Fruticultura, situados no município de Viçosa, Minas Gerais.

Os experimentos foram realizados no LCCTV e na Casa de Vegetação do Setor de Fruticultura, do Departamento de Fitotecnia da UFV.

Mudas do tipo "chifre" e "chifrinho" foram dissecadas até se obterem ápices caulinares com tamanho de 5 cm de comprimento e 2 cm de largura, aproximadamente. Os ápices foram mantidos em água deionizada até serem transferidos para a câmara de fluxo laminar, onde os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v), por 60 segundos, para quebra da tensão superficial. Posteriormente, foram transferidos para solução de 20 g L⁻¹ de hipoclorito de sódio (acrescida de 1 gota de Tween 20 para cada 100 ml de solução), por 10 min. Em seguida, o material foi reduzido a aproximadamente 10 mm e colocado em tubos de ensaio contendo meio de cultivo.

Na fase de estabelecimento, os ápices foram cultivados em tubos de ensaio (2 x 15 cm) e em meio de cultura contendo os sais básicos do meio MS, suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de AIA, 100 mg L⁻¹ de i-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose, mais os tratamentos que consistiram em quatro marcas de ágar (Grupo-Química, Micro-Med, Reagen e Vetec), todas na concentração de 4 g L⁻¹. Foram adicionados 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico ao meio para reduzir a oxidação. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, com o uso de KOH ou de HCl, a 0,1 mol L⁻¹. Posteriormente, o meio foi autoclavado

durante 15 minutos. Os explantes, no meio de cultura, foram submetidos a um período inicial de 24 h no escuro e, em seguida, transferidos para o regime de 16/8 h de luz/escuro, intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Os explantes ficaram 30 dias em meio de cultura.

Os tratamentos foram dispostos no delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições. A parcela experimental foi constituída por quatro explantes.

O estabelecimento de cada cultivar no meio foi avaliado por uma escala de notas (Quadro 1) descritas por Rodrigues (9).

QUADRO 1 - Escala de notas para avaliação de adaptação de ápices caulinares de bananeira <i>in vitro</i>	
Observação	Nota
Gema completamente oxidada	1
Gema branca com base oxidada	2
Gema branca	3
Ponta da gema clorofilada com base oxidada	4
Ponta clorofilada	5
Gema toda clorofilada com base oxidada	6
Gema toda clorofilada	7

Fase de multiplicação com marcas de ágar

Foram utilizadas as gemas desenvolvidas no laboratório de cultura de tecidos. As gemas foram cultivadas em magentas de 6 x 6 cm, contendo o meio de cultura com os sais básicos do meio MS, suplementado com BAP $6,75 \text{ mg L}^{-1}$, 100 mg L^{-1} de i-inositol e 30 g L^{-1} de sacarose. Foram adicionados 100 mg L^{-1} de ácido cítrico ao meio, para reduzir a oxidação. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, com o uso de KOH ou de HCl, a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Nos tratamentos foram utilizadas quatro marcas de ágar (Grupo-Química, Micro-Med, Reagen e Vetec), todas na concentração de 4 g L^{-1} . O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com cinco repetições. A parcela experimental foi constituída por uma magenta contendo quatro explantes.

Posteriormente, o meio foi autoclavado durante 15 minutos. Os explantes, no meio de cultura, foram transferidos para o regime de 16/8 h de luz/escuro, intensidade luminosa $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Os explantes ficaram 60 dias em meio de cultura.

Foram avaliados o número de brotações emitidas pelos explantes e a massa fresca e seca.

Os resultados obtidos nas duas fases passaram pela análise de variância, sendo as médias dos efeitos das marcas de ágar submetidas ao teste de Tukey, a 5%.

Fase de multiplicação com concentrações de ágar

Foram utilizadas gemas desenvolvidas no LCCTV, provindas da fase de estabelecimento. As gemas foram cultivadas em magentas (6 x 6 cm) contendo o meio de cultura com os sais básicos do meio MS, suplementado com BAP 6,75 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹ de i-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose, mais os tratamentos que consistiram em cinco concentrações de ágar (0, 2, 4, 6 e 8 g L⁻¹), usando ágar da marca Vetec. Foi utilizado o meio líquido para a avaliação de algum tipo de efeito inibitório relacionado a presença do ágar, e as gemas submetidas a esse meio foram colocadas diretamente no meio de cultura, sem o auxílio de pontes de papel. Os tratamentos foram dispostos em blocos casualizados, com cinco repetições. A parcela experimental foi constituída por uma magenta com quatro explantes. Foi adicionado ácido cítrico (100 mg L⁻¹) ao meio, para reduzir a oxidação dos explantes. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, com o uso de KOH ou de HCl, a 0,1 mol L⁻¹. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 15 minutos.

Os explantes foram transferidos para a condição de 16/8 h de luz/escuro por dia, intensidade luminosa média de 45 µmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 27 ± 2 °C. Os explantes ficaram 60 dias em meio de cultura. Foram avaliados o número de brotações emitidas pelos explantes nas diferentes concentrações de ágar e a massa fresca e seca.

Fase de enraizamento com concentrações de ágar

Foram utilizadas gemas de aproximadamente 1,5 cm de altura, desenvolvidas no laboratório de cultura de tecidos, provindas da fase de multiplicação. As gemas foram cultivadas em tubos de ensaio (2 x 15 cm) contendo o meio de cultura com os sais básicos do meio MS, suplementado com AIA 0,5 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹ de i-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose. Os tratamentos aplicados apresentaram as concentrações de ágar 0, 2, 4, 6 e 8 g L⁻¹, totalizando quatro repetições. Os explantes ficaram 30 dias em meio de cultura. Foram avaliados o número de folhas emitidas pelos explantes, o comprimento e o diâmetro do explante e a massa fresca e seca.

Os resultados obtidos nas duas fases foram analisados por análise de regressão, testando-se a significância dos coeficientes dos modelos até 5% de probabilidade, pelo teste F.

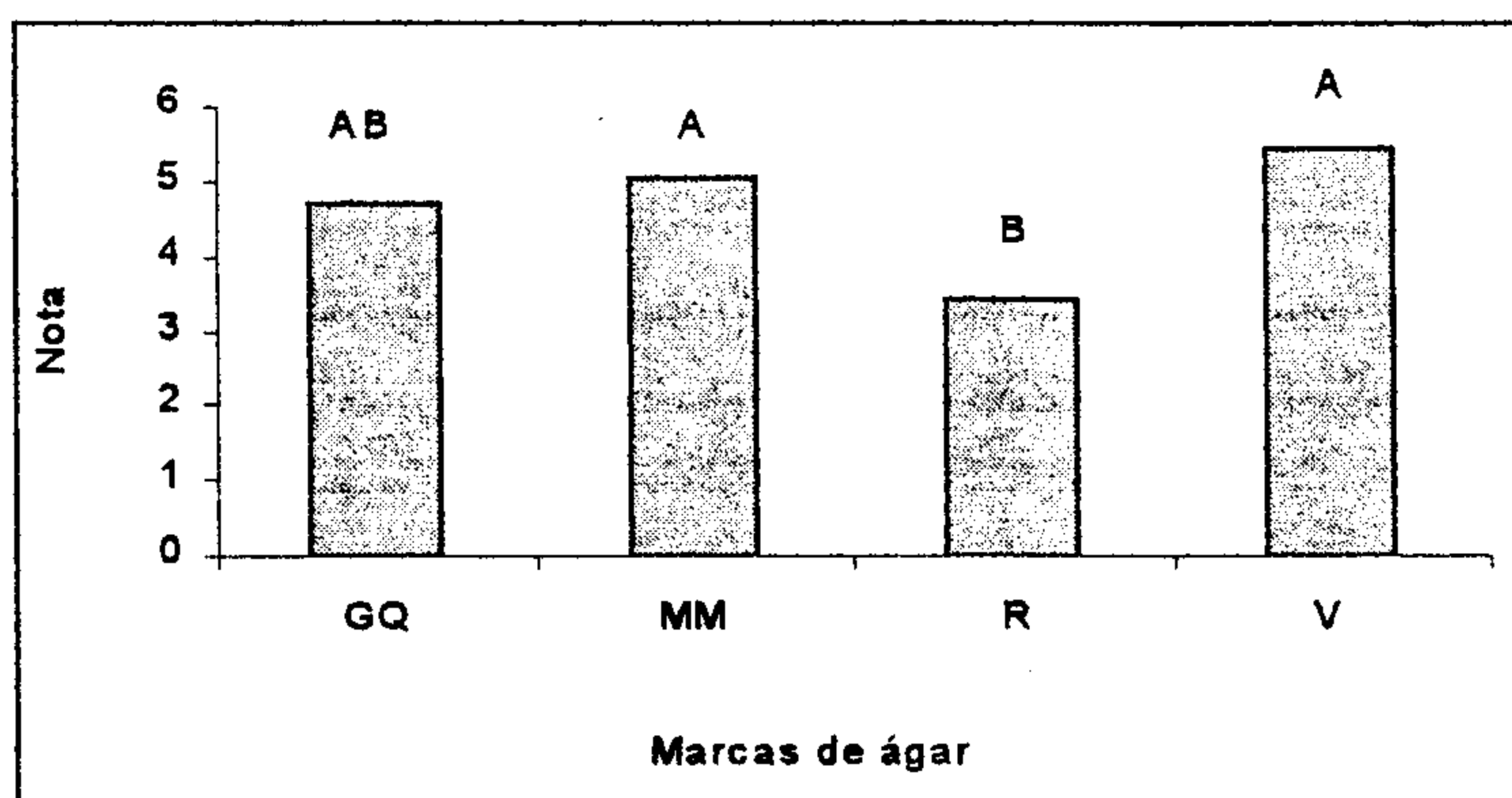
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcas de ágar

Na Figura 1, pode-se observar que as diferentes marcas de ágar afetaram significativamente o estabelecimento dos explantes em meio de cultura. As marcas Vetec e Micro-Med alcançaram as maiores médias; a marca Grupo-Química teve desempenho intermediário em relação ao estabelecimento dos explantes; e a marca Reagen foi a que apresentou o pior resultado.

O fato de a marca Reagen ter apresentado a nota mais baixa, pode estar relacionado com o grau de impureza presente, como concentrações de Na^+ , Ca^{++} e Mg^{++} e concentrações relativamente altas de sulfato, cloreto e Boro (15). Isso resultou em ápices com gemas de coloração branca. Outros fatores que podem estar relacionados com o efeito das marcas de ágar verificados na fase de estabelecimento são: força do gel (13), composição mineral (2), disponibilidade de minerais (8, 12) e compostos inibitórios (6). A disponibilidade de água também foi assunto de alguns estudos realizados (14).

Observa-se no Quadro 2 que nenhuma característica avaliada na fase de multiplicação foi afetada significativamente pela utilização das quatro marcas de ágar. Isso indica que os explantes obtidos no meio de cultivo contendo ágar da marca Reagen, mesmo apresentando gemas de coloração branca, não foram afetados no crescimento, durante a fase de multiplicação.



Notas seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%

FIGURA 1 - Notas dadas aos explantes, na fase de estabelecimento, em função das marcas de ágar GQ (Grupo-Química), MM (Micro-Med), R (Reagen) e V (Vetec).

Em casos em que não se pôde detectar diferença significativa entre marcas de ágar, o efeito foi menor que a grande variação observada freqüentemente, especialmente quando ramos ou raízes foram regenerados (8, 12). Neste experimento, o coeficiente de variação foi de 49 a 53% (Quadro 2), sendo, talvez, um dos motivos pelo qual não foram detectadas diferenças significativas.

QUADRO 2 - Médias de produção de gemas, massa fresca (MF) e massa seca (MS) dos explantes na fase de multiplicação, em função das quatro marcas de ágar (*)

Marcas de ágar	Número de gemas	MF (g)	MS (g)
Grupo-Química	9,20 A	5,24 A	0,33 A
Micro-Med	10,60 A	5,21 A	0,37 A
Reagen	8,40 A	4,16 A	0,28 A
Vetec	10,00 A	5,96 A	0,38 A
CV (%)	53	53	49
(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5 %.			

Concentrações de ágar

As diferentes concentrações de ágar, da marca Vetec, não afetaram significativamente a produção de gemas pelos explantes; cada parcela produziu, em média, 7,56 gemas (dados não mostrados).

As massas fresca ($Y = 15,41 - 1,23^{**} X$, $R^2 = 0,99$) e seca ($Y = 0,71 - 0,049^{**} X$, $R^2 = 0,98$) apresentaram comportamento linear negativo em função das concentrações de ágar, ou seja, a produção de massa fresca e seca diminui com o aumento das concentrações de ágar no meio de cultura. Por exemplo, os explantes submetidos a uma concentração de 0 g L⁻¹ de ágar no meio de cultura tiveram uma produção 179% maior de massa fresca e 122% maior de massa seca, em relação aos que foram submetidos a uma concentração de 8,0 g L⁻¹.

Uma possível explicação desses resultados é que o crescimento dos explantes foi prejudicado devido à ocorrência de adsorção seletiva dos nutrientes pelo ágar (1), e também porque exsudatos tóxicos provenientes dos explantes difundem vagarosamente no meio com ágar, restringindo a absorção dos outros componentes do meio, pelos explantes (15).

Na fase de enraizamento, todos os valores obtidos das características

avaliadas aumentaram até determinada concentração de ágar e depois começaram a diminuir. Dessa forma, o máximo valor estimado da produção de folhas foi obtido com $4,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar. Para o comprimento e diâmetro dos explantes, os valores máximos estimados foram obtidos com a concentração de $3,5$ e $2,7 \text{ g L}^{-1}$ de ágar, respectivamente, e as concentrações $2,3$ e $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar apresentaram maior produção estimada de massa fresca e seca, respectivamente (Figura 2).

Resultados semelhantes foram obtidos por Debergh (3), no enraizamento de explantes de bananeiras, Singh (13), na multiplicação da macieira, e Ruzic e Cerovic (11), na multiplicação de pereira e de cerejeira, em que a melhor concentração de ágar foi de $4,0 \text{ g L}^{-1}$.

Na fase de desenvolvimento e enraizamento, não foram encontradas evidências de que a menor disponibilidade de água para os explantes de *Picea abies*, causada pelo aumento de concentração do ágar, seja um dos fatores responsáveis pelo seu menor crescimento (10). Segundo estes autores, a reduzida difusão da invertase, enzima que transforma a sacarose em frutose e glicose, através do ágar, poderia ser um dos fatores que limitam o crescimento. Contudo, encontrou-se correlação significativa entre a diminuição do potencial matricial do meio de cultura, provocada pelo aumento da concentração de ágar e a diminuição do crescimento dos explantes de bananeira (3).

CONCLUSÕES

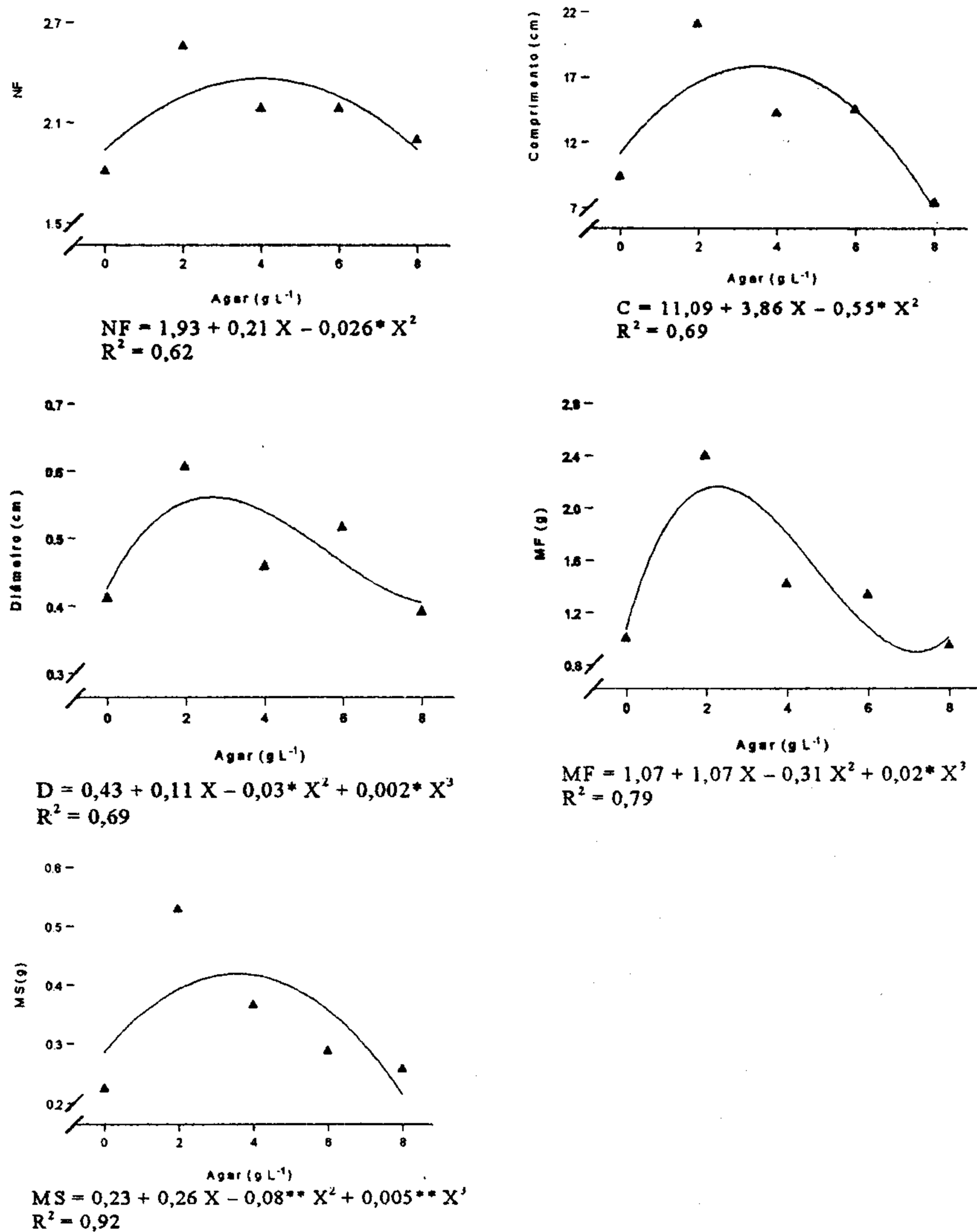
1) As marcas Vetec e Micro-Med apresentam os melhores resultados para o estabelecimento dos explantes, a marca Grupo-Química tem desempenho intermediário e a marca Reagen apresenta o pior resultado.

2) Não há diferenças entre as marcas de ágar avaliadas, em relação à produção de gemas, massa fresca e massa seca, pelos explantes na fase de multiplicação.

3) Na fase de multiplicação, as diferentes concentrações de ágar não influenciam significativamente o número de brotações emitidas pelos explantes.

4) Na fase de multiplicação, as massas fresca e seca produzidas diminuem de forma linear com o aumento das concentração de ágar no meio de cultura.

5) Na fase de enraizamento, as concentrações de ágar que proporcionam melhor crescimento das mudas variam de $2,3$ a $4,0 \text{ g L}^{-1}$.



** , * : Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

FIGURA 2 - Número de folhas (NF), comprimento (C), diâmetro (D), massa fresca (MF) e massa seca (MS), dos explantes em função das concentrações de ágar (marca Vetec), na fase de enraizamento.

REFERÊNCIAS

1. DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K. & ALVES, E.J. Propagação rápida da bananeira. Informe Agropecuário, 12(133):33-8, 1986.
2. DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y. & LEMEURE, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiologia Plantarum, 53:181-7, 1981.
3. ELOBEIDY, A.A. Effects of water status on in vitro growth and development of banana. Bull. Faculty of Agric., Univ. of. Cairo, 48:655-62, 1997.
4. GODINHO, F.P. Mudanças de bananeira: tecnologia de produção. Belo Horizonte, EPAMIG, 1994. 44p.
5. KODA, T.I.; YAMAGISHI, H. & YOSHIKAWA, H. Effects of phytohormones and gelling agents on plant regeneration from protoplasts of red cabbage. Agric. Biol. Chem., 52:2337-40, 1988.
6. KOHLENBACH, H.W. & WERNICKE, W. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. Z. Pflanzenphysiol., 86: 463-72, 1978.
7. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-97, 1962.
8. PIERIK, R.L.M.; OASTERKAMP, J.; MANSCHOT, G.A.J.; BARTH, T. & SHOLTEN, H.J. Agar brand, a dominating factor for shoot growth on juvenile and adult *Quercus robur* L. 'Fastigiata' in vitro. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 3: 131-40, 1997.
9. RODRIGUES, E.J.R. Micropropagação da bananeira e avaliação de métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* Schlecht. F. sp. *cubense* (E.F.Smith) Snyd & Hans. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1994. 54p. (Tese mestrado).
10. ROMBERGER, J.A. & TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture I. Agar and autoclaving effects. Am. J. Bot., 58: 131-40, 1971.
11. RUZIC, D. & CEROVIC, R. Influence of agar brands and concentration on in vitro shoot multiplication of the cherry rootstock Gisela 5. Acta Horticulturae, 468: 209-16, 1998.
12. SCHOLTEN, H.J. & PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: differential biological effects in vitro. Scientia Horticulturae, 77: 109-16, 1998.
13. SINGH, S. Influence of agar concentration on in vitro shoot proliferation of *Malus* sp. 'Almay' and *Pyrus communis* 'Seckel'. J. Am. Soc. Hort. Sci., 107: 657-60, 1982.
14. STOLTZ, L.P. Agar restriction of the growth of excised mature Iris embryos. J. Am. Soc. Hort. Sci., 96: 618-84, 1971.
15. TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA CNPH, 1990. 433p.