

Necessidade de sacarose no cultivo *in vitro* de bananeira (*Musa spp*)

Belton Henrique Condela Guambe^{1*}, Eduardo Pinto Mulima²,
Gisela Manuela De Franca Bettencourt¹

¹Instituto Superior Politécnico de Manica (ISPM), Matsinho, Moçambique.

²Universidade Púnguè, Manica, Moçambique.

Autor-correspondente:

belton@estudante.ufscar.br

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, micropropagação, banana, meio de cultivo, fonte de carbono, sacarose.

Submetido em: 26/09/2023.

Aceito em: 27/03/2024.

DOI: <https://doi.org/10.20396/bioe.v2i00.18561>

Resumo: O cultivo de plantas *in vitro* é uma tecnologia que vem ganhando espaço em várias áreas do saber, desde a produção de fármacos, o melhoramento genético até a micropropagação de espécies de difícil multiplicação convencional. O meio de cultura é um elemento essencial para o alcance dos objetivos do cultivo *in vitro* e para a micropropagação de espécies vegetais, e dentre os componentes do meio de cultura, as fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura são determinantes para o desenvolvimento dos explantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo *in vitro* da banana (*Musa spp*), da cultivar Banana maçã em diferentes concentrações de sacarose, como fonte de carbono para seu desenvolvimento. Os cultivos foram realizados tendo como explantes rizomas de bananeira, do tipo chifrinho, cultivados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura Murashige e Skoog (MS), complementado por reguladores vegetais a 4 mL L⁻¹ de Benzilaminopurina (BAP) e 175 µL L⁻¹ de Ácido indol-3-acético (AIA) em diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30 g L⁻¹), com o pH 5.8. O desenho experimental usado foi o delineamento completamente casualizado, com quatro tratamentos e oito repetições. Todos os dados coletados foram analisados e na comparação de médias foi usado o teste de Duncan à 5% de significância. O meio de cultura com 30 g L⁻¹ de sacarose causou o maior número de brotações, folhas e altura de plantas, todavia foi o meio mais propenso à contaminação. Portanto, há necessidade de se incorporar ao meio de cultura bactericidas e fungicidas para um controle efetivo de contaminantes. Observou-se perda de vigor de crescimento nas plantas de todos os tratamentos 30 dias após o início do cultivo *in vitro*, o que deve estar relacionada à oxidação dos explantes ou à ausência de renovação do meio de cultura.

INTRODUÇÃO

As bananeiras pertencem à classe Liliopsida, ordem Scitaminales, família Musaceae, na qual se encontram as subfamílias Heliconioideae, Strelitzioideae e Musoideae. Esta última é caracterizada por seus sistemas foliares serem dispostos em espirais e possuírem flores funcionalmente unissexuais. A subfamília Musoideae é composta por dois gêneros, Ensete e Musa, sendo este último constituído por quatro sessões: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys e Eumusa (CARVALHO, JESUS e SANTOS, 2012).

Segundo Fioravanco (2003), a banana é uma das frutas mais importantes do mundo, tanto no que se refere à produção quanto à comercialização. Em muitos países, além de participar diretamente na dieta da população, esta fruta representa fonte de renda para muitas famílias de agricultores, gerando postos de trabalho no campo e na cidade e contribuindo para o desenvolvimento das regiões envolvidas em sua produção (PEREIRA et al., 2020; MEHBUB et al., 2022).

As práticas de propagação desta cultura podem ser por sementes oriundas da sua inflorescência, ou vegetativamente por meio de mudas tipo chifrão, chifre, chifrinho, fracionamento de rizoma ou *in vitro* (PEREIRA et al., 2020; MEHBUB et al., 2022). Entretanto, a propagação da bananeira através de brotação espontânea de rizoma,

além de apresentar baixa taxa de multiplicação e ser mais lenta, favorece a disseminação de doenças e pragas para novas áreas (CARVALHO, JESUS e SANTOS, 2012; PEREIRA et al., 2020). Diante disso, a adoção do cultivo *in vitro*, ainda que apresente algum perigo de reinfecção no campo, permite produzir material livre de patógenos, estabelecer cultivos com plantas saudáveis e aumentar de maneira considerável a produção de plantas em curto tempo (PEREIRA et al., 2020).

A sacarose deve ser utilizada como fonte de vários nutrientes, entre eles, açúcar, vitaminas e íons metálicos inorgânicos necessários para indução de calos e para a formação de brotos (RIBEIRO et al., 2012; MEHBUB et al., 2022). Diante do exposto, o artigo tem como objetivo principal o estudo de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura para cultivo de bananeira.

MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Superior Politécnico de Manica, Moçambique, e teve a duração de 8 meses. O experimento foi realizado em etapas: coleta e preparo dos explantes, preparo de soluções e meio de cultura; desinfecção dos explantes; inoculação; e crescimento (Figura 1).

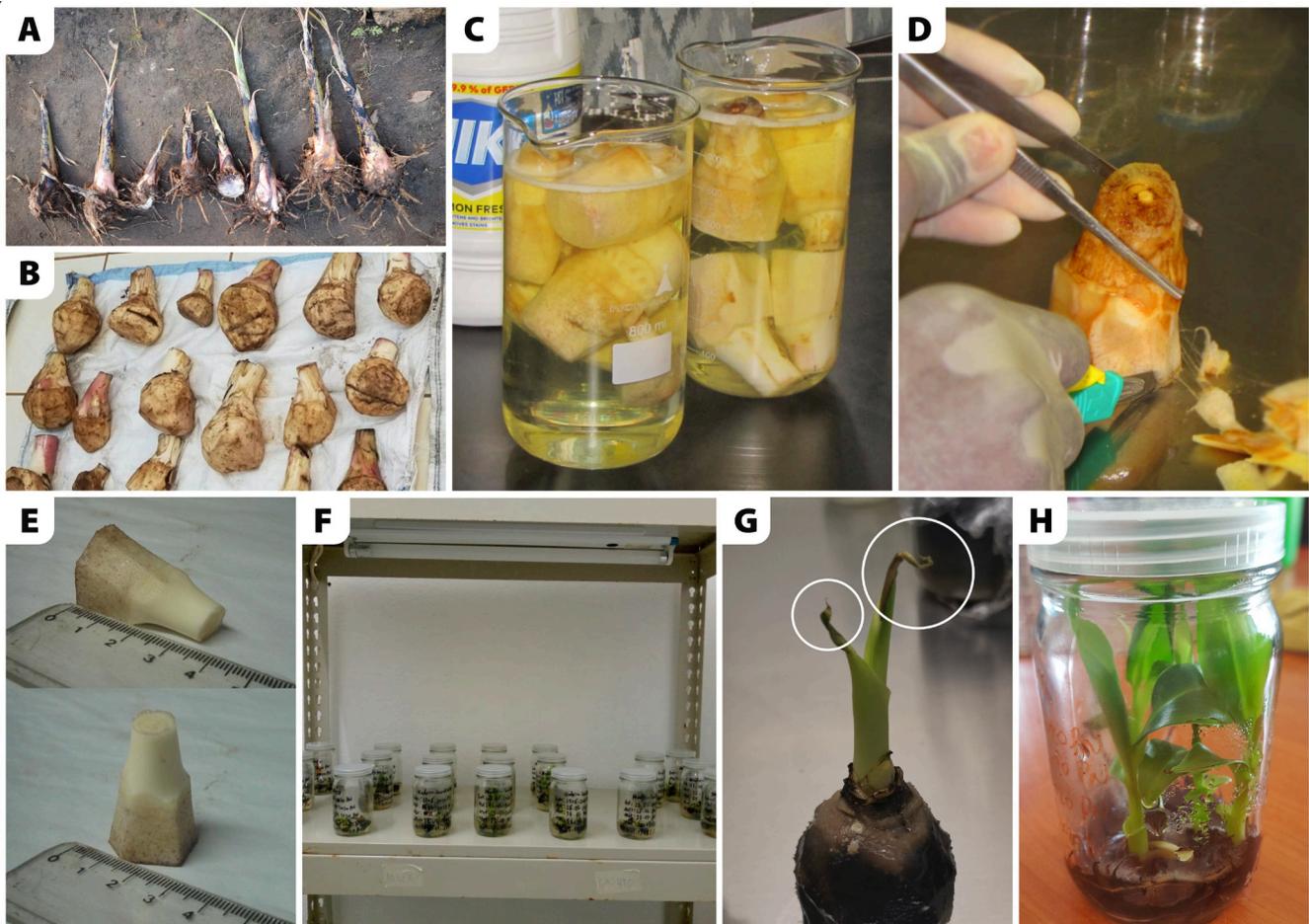


FIGURA 1. Etapas realizadas no processo de cultivo *in vitro*: explantes do tipo chifrinho coletados no bananal caseiro (A), explantes seccionados e lavados (B), desinfecção dos explantes (C), redução dos explantes para introdução no frasco de crescimento (D), explantes reduzidos em 3,5 cm de comprimento e 2 cm de base (E), organização dos frascos com explantes para crescimento em bancada equipada com lâmpadas fluorescentes frias de 18 W (F), explante com broto perdendo o vigor aos 32 dias após a introdução *in vitro* (G) e brotações de explantes aos 25 dias após o subcultivo (H).

COLETA E PREPARO DE EXPLANTES

Foi feita coleta de rizomas do tipo chifrinho de Banana maçã no bairro Tambara 2, em um bananal familiar. Os explantes foram retirados com auxílio de uma enxada, tomando o cuidado de não os ferir, pois qualquer lesão pode causar contaminação ou oxidação dos tecidos, bem como lesões ao meristema, que é a parte de interesse nesta coleta (CARVALHO, JESUS e SANTOS, 2012). Antes da entrada ao laboratório para assepsia, fez-se uma primeira limpeza que consistiu em remover todo excesso de terra, raízes, e outros detritos da parte superficial do rizoma, bem como toda a parte escura superficial, conforme prediz o protocolo de limpeza do explante descrito por Justine e colaboradores (2022).

DESINFECÇÃO DOS EXPLANTES

A limpeza e desinfecção foi feita em cinco períodos nomeadamente: I – retirada de todo excesso de terra e lavagem dos explantes com água e detergente líquido, fora do laboratório; II – lavagem com sabão líquido dentro do laboratório; III – desinfecção dos explantes com hipoclorito 2,5% por 30 min, outra desinfecção com

hipoclorito 1% por 15 min; IV – desinfecção com álcool etílico a 70% dentro da cabine de segurança biológica por 20 min; V – tríplice lavagem dos explantes com água Milli-Q® autoclavada, dentro da cabine de segurança biológica.

PREPARO DE SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Previamente, todos materiais utilizados nos experimentos foram preparados assepticamente. Após a desinfecção, iniciou-se a preparação do complexo vitamínico, seguida da preparação de reguladores vegetais Benzilaminopurina (BAP) e Ácido indol-3-acético (AIA), por fim preparou-se o meio de cultura Murashige e Skoog (MS). Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), contendo 4 mL L⁻¹ de BAP + 175 µL L⁻¹ de AIA, solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel®, acrescido de 0,1 g L⁻¹ de ácido ascórbico e com diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30 g L⁻¹), com o pH ajustado para 5.8. Os meios de cultura foram distribuídos em frascos contendo 40 mL por frasco. Os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos a 1 atmosfera e solidificados, fechados e guardados no escuro por três dias antes do uso.

INOCULAÇÃO E CRESCIMENTO DOS EXPLANTES

O processo de inoculação começou com a redução dos explantes (rizoma tipo chifrinho) dentro da cabine de segurança biológica, com auxílio de uma pinça para segurar o explante e um bisturi para efetuar cortes. Para garantir a assepsia do processo, a pinça e o bisturi eram flambados com álcool etílico à 70%. A flambagem era feita após o manuseio de um explante para não passar possíveis contaminantes de um explante ao outro. Terminada a redução dos explantes, com auxílio de uma pinça, foi feita a inoculação de um (1) explante por frasco, aos frascos contendo 40 mL de meio de cultura e depois os frascos foram tampados com papel aderente. Após a inoculação em meio de cultura, os frascos foram colocados na sala de crescimento, com lâmpadas fluorescentes frias de 18 W, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com um fotoperíodo de 16 horas de luz.

COLETA E ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram coletados 15 e 30 dias após a introdução *in vitro* dos explantes. A medição da altura das plantas foi feita através de uma régua de 30 cm dentro da cabine de fluxo laminar. O número de folhas e brotos foi obtido a partir da contagem por meio de observações diretas. O desenho experimental usado foi completamente casualizados com quatro tratamentos e oito repetições. Todos os dados coletados foram analisados estatisticamente usando o pacote estatístico GENSTAT versão 14. Para a comparação de médias foi usado o teste de Duncan à 5% de significância.

RESULTADOS

A brotação dos explantes iniciou 8 dias após o estabelecimento, com 100% dos explantes reagidos positivamente, porém, verificou-se contaminações por fungos em 25% do total dos explantes sendo dois frascos de tratamento com 30 g L^{-1} de sacarose e um do tratamento 20 g L^{-1} de sacarose, enquanto que os tratamentos com 0 e 10 g L^{-1} de sacarose não apresentaram contaminações (Figura 2).

Passados 30 dias após a introdução dos explantes *in vitro*, foi feito o subcultivo. Tanto na introdução *in vitro* como no subcultivo, verificou-se que o maior número de contaminações e maior concentração dos contaminantes foram no tratamento com 30 g L^{-1} de sacarose, seguidos do tratamento 20 g L^{-1} de sacarose (Figura 2).

Na comparação das médias dos tratamentos, observou-se que 30 g L^{-1} de sacarose causou o melhor desempenho em relação aos demais tratamentos em todas variáveis analisadas de crescimento, tais como número de brotos, altura e número de folhas (Figura 3). Apenas para as brotações (Figura 3A), o meio com 30 g L^{-1} de sacarose não diferiu estatisticamente do tratamento com 20 g L^{-1} de sacarose.

Em todos os tratamentos observou-se uma perda de vigor de crescimento em cerca de 100% dos explantes 30 dias após o estabelecimento (marcado por escurecimento do rizoma, do caule brotado e murcha das folhas), resultando em morte após 32 dias. Os explantes nos

tratamentos com 20 e 30 g L^{-1} de sacarose resistiram à perda de vigor até aos 32 dias, enquanto que os explantes com 0 e 10 g L^{-1} perderam o vigor de crescimento mais rapidamente, mostrando os primeiros sinais já aos 28 dias.

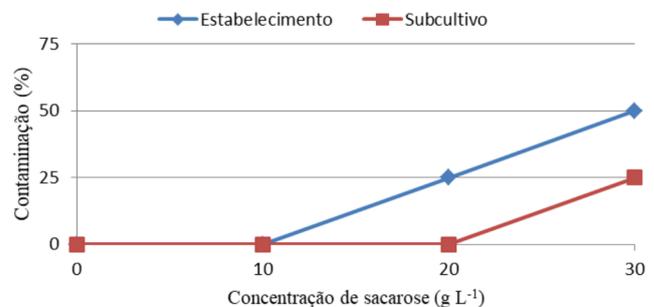


FIGURA 2. Níveis de contaminação fúngica nas diferentes concentrações de sacarose 30 dias após a introdução *in vitro* e no subcultivo.

DISCUSSÃO

Estas observações sugerem que maiores concentrações de sacarose como fonte de carbono proporcionaram maior crescimento de fungos. Segundo Ferreira (2006), o crescimento micelial de *Aspergillus flavus* é maior em concentrações de sacarose variando entre 12 e 36% se comparadas às menores concentrações. Quinsen e colaboradores (2004), Da Cruz Cabral e colaboradores (2013) afirmam que os micro-organismos, como qualquer organismo vivo, necessitam de fontes de energia para o seu desenvolvimento, e alguns micro-organismos como fungos e bactérias utilizam compostos simples como açúcares e aminoácidos para proporcionarem o seu rápido desenvolvimento (NYCHAS e PANAGOU 2011; MEHBUB et al., 2022). Pereira e colaboradores (2020) avaliaram diferentes concentrações (10 e 20 g L^{-1}) de sacarose no cultivo *in vitro* de banana (*Musa* spp.) e notaram que a proporção de contaminações fúngicas foi maior no tratamento com 20 g L^{-1} de sacarose, evidenciando que esse carboidrato influencia o desenvolvimento dos micro-organismos contaminantes. Outros autores trabalhando com a cultura do fumo observaram que é necessária à adição de antibióticos e fungicidas ao meio de cultura para obter um controle efetivo dos micro-organismos contaminantes, pois a utilização apenas de álcool a 70% e hipoclorito de sódio não são suficientes (NAUE et al., 2007).

O tratamento com 30 g L^{-1} de sacarose mostrou-se melhor para o cultivo *in vitro* de *Musa* spp., e os resultados deste estudo foram similares aos obtidos por Pereira e colaboradores (2020), que reportaram que baixas concentrações de sacarose não foram satisfatórias para o desenvolvimento dos explantes. No caso da violeta africana, o tratamento 20 g L^{-1} de sacarose proporcionou mais brotações por explante após 80 dias de cultivo, em relação ao tratamento com 10 g L^{-1} de sacarose (AGRA et al., 2009). O tratamento com 30 g L^{-1} de sacarose também se mostrou satisfatório para orquídeas (DIGNART et al., 2009), resultado que corrobora o apresentado neste

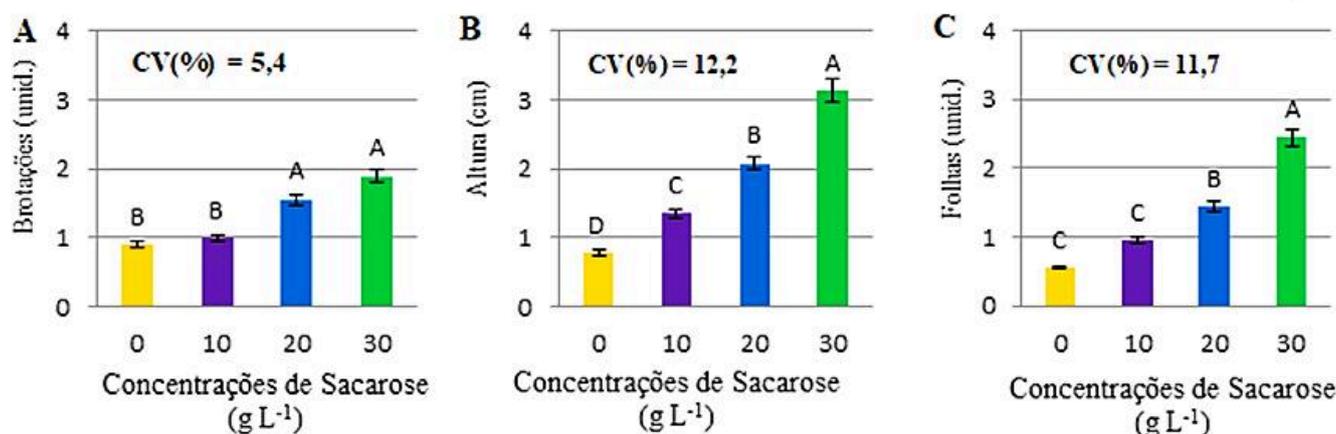


FIGURA 3. Número de brotações (A), altura (B) e número de folhas (C) de bananeiras em cultivo *in vitro* com concentrações variadas de sacarose no meio de cultura. Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Cada barra representa o valor médio de 8 repetições \pm desvio padrão.

estudo. Torres e colaboradores (2006) constataram que as plântulas de tomateiro apresentaram maior crescimento e desenvolvimento do sistema radicular em concentrações acima de 15 g L⁻¹ de sacarose, enquanto que na ausência de sacarose houve menor crescimento e praticamente raízes não foram formadas. Resultados semelhantes foram relatados em plantas de morangueiro, medicinais, menta, batata e videira (RIQUELME et al., 1991; NICOLOSO et al., 2003). Adicionalmente, Santos e colaboradores (2012) relataram que explantes submetidos ao enraizamento *in vitro* em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose produziram raízes finas com características desejáveis ao serem submetidas a aclimação *ex vitro*. A ausência de fontes de carbono no meio de estabelecimento *in vitro* dificulta o desenvolvimento dos explantes, necessitando estes de uma fonte de energia exógena para o seu crescimento e desenvolvimento. Em condições *in vitro* a planta apresenta-se heterotrófica e na ausência de uma fonte de energia suplementar a partir de carboidratos, o crescimento e o desenvolvimento dos órgãos da plântula ficam comprometidos (DAVIS, HAISSIG e SANKHLA, 1991; MEHBUB et al., 2022).

A morte das mudas de bananeira dentro dos frascos de crescimento após passados 28 dias da introdução *in vitro* pode ter sido causada pela escassez de nutrientes no meio, e também pela oxidação dos explantes. Assim, o subcultivo é essencial para o sucesso da propagação *in vitro* de explantes de bananeira, sendo recomendado até quatro semanas de cultivo em cada subcultivo. De modo a manter a estabilidade genética, sugerem-se cinco subcultivos como margem segura para a micropropagação de bananeira (SIQUEIRA et al., 2013; ENOKI e TAKAHARA, 2014; MEHBUB et al., 2022). Utino e colaboradores (2001) relataram que o longo período de subcultivo (28 dias) ocasiona menor crescimento devido à redução da concentração dos sais do meio MS. De fato, o tempo de subcultivo é importante para a micropropagação de bananeira, e Dignart e colaboradores (2009) observaram perda de vigor e consequente morte em mudas que ficaram mais de 30 dias no meio de cultivo. O declínio do vigor está associado

com a produção de substâncias fenólicas ou a outros fatores como virescência ou maturidade dos explantes. O controle da oxidação no cultivo *in vitro* de *Musa* spp. implica diretamente no vigor do explante (DIGNART et al., 2009). Alternativamente, Mehbub e colaboradores (2022) relataram que, durante a micropropagação, as culturas *in vitro* podem com o tempo acumular mutações somáticas ou variações genéticas devido à instabilidade genética associada a esse método, o que pode levar a diferenças na expressão gênica e, consequentemente, à perda de vigor. Enoki e Takahara (2014), estudando a taxa de sobrevivência e diferenças varietais nas características culturais de plantas ornamentais, constataram que após 30 dias da introdução *in vitro*, os explantes perderam o vigor de crescimento devido ao estresse oxidativo e ao envelhecimento dos explantes, resultados que corroboram com o presente estudo.

CONCLUSÃO

O estabelecimento *in vitro* de rizomas da banana é um processo que demanda extrema atenção quanto ao controle de contaminações, devendo-se garantir a assepsia de todo o processo desde o preparo dos explantes até o seu estabelecimento e crescimento das plântulas. A sacarose é um elemento importante para o cultivo *in vitro* da bananeira, servindo como uma fonte de energia exógena. Para *Musa* spp., a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose é a que proporcionou maior crescimento do explante, sendo a concentração indicada para o cultivo *in vitro* de bananeira. Todavia, maiores concentrações de sacarose condicionam o desenvolvimento rápido dos fungos no meio de cultivo, sendo necessário maior atenção na assepsia dos meios de cultura. A perda de vigor vegetativo não esteve relacionada com a variação da concentração de sacarose, pois foi observado em todos os tratamentos. Esta perda pode estar mais relacionada à oxidação dos explantes assim como ao meio de cultura que não foi renovado.



AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Superior Politécnico de Manica (ISPM) pela oportunidade de cursar Biotecnologia, ao Instituto de Bolsas de Estudo (IBE) pela bolsa de estudos e ao Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM) pelo treinamento em técnicas de cultura de tecidos e fitopatologia.

REFERÊNCIAS

- AGRA, P. F. M. et al. Efeito de ambientes e concentrações de sacarose na contaminação *in vitro* de violeta africana. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 4, p. 43-47, 2009.
- CARVALHO, A. C. P. P.; JESUS, A. A.; SANTOS, E. O. Produção de Mudanças Micropropagadas de Bananeira. **Embrapa Agroindústria Tropical (Circular Técnica 37)**, Fortaleza, p. 14, out 2012.
- DA CRUZ CABRAL, L.; FERNÁNDEZ PINTO, V.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 1-14, ago 2013. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026.
- DIGNART, S. L. et al. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, 33, p. 780-787, mai/jun 2009. DOI:10.1590/s1413-70542009000300017.
- DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (ed.) Adventitious Root Formation in Cuttings. *Advances in Plant Sciences Series. Volume 2. Biologia Plantarum*, v. 33, n. 114, 1991. DOI: 10.1007/BF02897787.
- ENOKI, S.; TAKAHARA Y. Application of a modified MS medium for tissue culture with cutting in Phalaenopsis – Comparison with other conventional media with regard to the survival rate and varietal differences in cultural characteristics. **Shokubutsu Kankyo Kogaku**, v. 26, n. 2, p. 109-117, jun 2014. DOI: 10.2525/shita.26.109.
- FERREIRA, N. R. Micotecnologia aplicada à produção de 5-hidroxi-2-hidroximetil-γ-pirona: uso potencial na indústria de alimentos. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), **Centro Tecnológico, Universidade Federal do Pará**. Belém, p. 101. 2006.
- FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial de banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, v. 33, n. 10, p. 54-57, out 2003.
- JUSTINE, A. K.; KAUR, N.; SAVITA, PATI P. K. Biotechnological interventions in banana: current knowledge and future prospects. **Heliyon**, v. 8, n. 11, e11636, 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11636.
- MEHBUB, H. et al. Tissue Culture in Ornamentals: Cultivation Factors, Propagation Techniques, and Its Application. **Plants (Basel)**, v. 11, n. 23, 3208, nov 2022. DOI: 10.3390/plantas11233208.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- NYCHAS, G. J.; PANAGOUD, E. Microbiological spoilage of foods and beverages. **Food and Beverage Stability and Shelf Life**, p. 3-28. 2011. DOI: 10.1016/B978-1-84569-701-3.50001-3.
- NAUE, C. R.; BENITIZ, L. B.; MEDEIROS, C. V. Eliminação de contaminantes microbianos da cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum* L. In: **XVI Congresso Iniciação Científica, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Resumos. Pelotas, Brasil**. p. 1-5., 2007.
- NICOLOSO, F. T. et al. Efeitos de doses e fontes de carboidratos no crescimento de ginseg brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 27, n.1, p. 84 – 90. 2003. DOI: 10.1590/S1413-70542003000100010.
- PERREIRA, W. J. et al. Estabelecimento *in vitro* de bananeiras em diferentes meios de cultura submetidos a agentes antioxidantes. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 4973-4984, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n1-359.
- QUISEN, R. C., MARI, A. O., LOPES, C. O. Propagação *in vitro* de bananeira cultivar Prata Zulu. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 42, p. 213-220, jul/dez 2004.
- RIBEIRO, J. M. et al. Efeito do melado de cana-de-açúcar no desenvolvimento *in vitro* de bananeira (*Musa* spp.) cv. maçã. **Revista Ceres**, v. 59, n.3, p. 293-298, 2012. DOI: 10.1590/S0034-737X2012000300001.
- RIQUELME, C.; GUIÑAZD, M. E.; TIZIO, R. Preacondicionamiento y aclimatación, em condiciones d invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. **Pyton**, v. 52, n. 1, p. 73- 82, 1991.
- SANTOS, L. R. R. et al. Sobrevivência de plantas durante a fase de aclimatização na micropropagação de pimenteira-do-reino. In: **II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, Brasil**. p. 1-4., 2012.
- SIQUEIRA, D. L. et al. Micropropagação da bananeira 'Maçã', cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. **Revista Ceres**, v. 60, n.6, p. 745-751, nov/dez 2013. DOI: 10.1590/S0034-737X2013000600001.
- TORRES, F. J. B. et al. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* var. Santa clara). In: **X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, Universidade do Vale do Paraíba**. p. 1016 – 1018, 2006.
- UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa* AAB) *in vitro*: IV concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n.2, p. 409-412, 2001.

