

# CRESCIMENTO E OXIDAÇÃO DE EXPLANTES DE BANANEIRA-PRATA (*Musa AAB*) *IN VITRO*. I. CONCENTRAÇÕES DE SAIS DE FERRO, COBRE E ZINCO <sup>1</sup>

SERGIO UTINO<sup>2</sup>, IRAÍDES FERNANDES CARNEIRO<sup>3</sup>, LÁZARO JOSÉ CHAVES<sup>3</sup>

**RESUMO** - Este experimento teve como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de ferro, cobre e zinco do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) no controle da oxidação de explantes iniciais de bananeira-Prata (*Musa AAB*). Foram utilizadas três concentrações (100, 50 e 0 µM) de FeEDTA, duas concentrações (0,1 e 0 µM) de (CuSO<sub>4</sub>).5H<sub>2</sub>O e duas concentrações (30 e 0 µM) de (ZnSO<sub>4</sub>).7H<sub>2</sub>O, num delineamento inteiramente casualizado, arranjado em um fatorial completo 3 x 2 x 2, utilizando-se de 15 repetições. Ápices caulinares foram inoculados em meio MS modificado e, decorridos 28 dias após a inoculação, avaliaram-se a massa de matéria fresca, altura e grau de oxidação. Observou-se que esses micronutrientes são essenciais para o crescimento dos explantes e que a concentração de ferro influencia na oxidação de explantes, sendo que maiores graus de escurecimento foram observados nas concentrações mais elevadas. A redução ou retirada destes elementos do meio MS, isoladamente ou em combinações, não foi suficiente para eliminar a oxidação dos explantes.

**Termos para indexação:** cultura de tecidos, *Musa AAB*, oxidação fenólica, ferro, cobre, zinco.

## EXPLANTS GROWTH AND OXIDATION OF BANANA CV. PRATA (*Musa AAB*) *IN VITRO*. I. IRON, COPPER, AND ZINC SALT CONCENTRATIONS.

**ABSTRACT** - This research work was carried to verify the effects of salt concentrations with iron, copper and zinc of the MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) medium on explants oxidation control for banana plants, cv. Prata (*Musa AAB*). Three salt concentrations (100, 50, 0 µM) of FeEDTA and two concentrations (100, 0 µM) of (CuSO<sub>4</sub>). 5H<sub>2</sub>O and two concentration (30 e 0 µM) of (ZnSO<sub>4</sub>). 7H<sub>2</sub>O were utilized. Completely randomized in a 3x2x2 factorial scheme with fifteen repetitions were utilized. Shoot tip apices were inoculated in MS medium. Explants fresh matter weight, height and oxidation grade were evaluated 28 days after inoculation. It was observed that iron, copper and zinc are essential to explants growth. Iron concentration reduction caused decrease in oxidation grade, the reduction or elimination of iron, copper and zinc in MS medium, isolated or in combination forms was not sufficient to eliminate the oxidation grade.

**Index terms:** tissue culture, *Musa AAB*, phenolic oxidation, iron, copper and zinc.

### INTRODUÇÃO

Dentre as frutas tropicais, a banana é considerada uma das mais consumida no mundo, ocupando o segundo lugar em área cultivada, no Brasil (IBGE, 1998). Em Goiás, a bananeira foi à atividade principal dentro da fruticultura, em 1996, sendo que a banana-Prata ocupa o terceiro lugar na preferência do consumidor (CEASA, 1996).

A bananeira é propagada vegetativamente, sendo a qualidade da muda de primordial importância para o sucesso da cultura. Com o objetivo de elevar a taxa de multiplicação e reduzir a disseminação de pragas e doenças, o uso da micropropagação vem sendo estimulado no Brasil, a exemplo de outros países, grandes produtores e/ou exportadores (Vuylsteke & Ortiz, 1996; Souza *et al.*, 1998).

Um problema freqüentemente encontrado no cultivo *in vitro* é o escurecimento dos tecidos lesados do explante causado pela oxidação de compostos polifenólicos (George & Sherrington, 1984) o que prejudica o crescimento dos explantes,

além de ser um fator de redução da taxa de multiplicação (Carneiro, 1997).

Os micronutrientes Fe, Cu e Zn influenciam na oxidação de explantes, sendo Fe e Cu constituinte de enzimas as quais são liberadas quando os tecidos são lesados (Pasqual *et al.*, 1997). O cobre faz parte das enzimas denominadas polifenoloxidase, fenolase e tirosinase (Pasqual *et al.*, 1997) enquanto o ferro é constituinte de peroxidase (Amorim, 1985). Também desempenha papel redox, a catalase e a lacase, com ferro e cobre, respectivamente (Mengel & Kirkby, 1987). A deficiência de zinco pode causar o aumento da atividade da polifenoloxidase e da peroxidase (Malavolta *et al.*, 1974).

Após o ferimento dos tecidos e conseqüente oxidação dos polifenóis há a formação de quinona, substância fitotóxica inibidora do crescimento celular (Amorim, 1985). As quinonas são substâncias altamente ativas e, posteriormente à sua produção, polimerizam e/ou oxidam proteínas para formar compostos melânicos (George & Sherrington, 1984). Havendo a redução da produção destas enzimas oxidativas, tem-se como

<sup>1</sup> Trabalho nº 126/2000. Recebido: 05/07/2000. Aceito para publicação: 27/06/2001. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

<sup>2</sup> Eng. Agr., MS, Embrapa-Negócios Tecnológicos, CP 714, CEP 74001-970 Goiânia- GO, sntgyn@zaz.com.br.

<sup>3</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>, Escola de Agronomia/UFG, CP 131, CEP 74001-970 Goiânia-GO., iraidés@agro.ufg.br

<sup>4</sup> Eng. Agr., Dr., Escola de Agronomia/UFG, CP 131, CEP 74001-970 Goiânia -GO, lchaves@agro.ufg.br

consequência uma menor rapidez na oxidação fenólica dos tecidos lesados (Pasqual *et al.*, 1997). É uma das formas de redução da produção destas enzimas seria uma menor absorção dos micronutrientes Fe e Cu e maior absorção de Zn presentes no meio de cultura.

Este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos de concentrações de cobre, ferro e zinco sobre o crescimento e a oxidação de explantes iniciais de bananeira-Prata.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. Utilizaram-se como explantes os ápices caulinares de mudas obtidas através das brotações laterais de rizomas de bananeira-Prata, colocadas em canteiro de areia para propagação rápida *ex situ*. Blocos contendo o meristema apical, com as dimensões de 30 mm x 15 mm x 15 mm, receberam o tratamento para descontaminação, pela imersão numa solução de 35 mL<sup>-1</sup> de NaOCl acrescido de 30 gotas de Tween-20 L<sup>-1</sup>, durante 20 minutos. Em condições assépticas, os explantes foram lavados por três vezes com água destilada, deionizada e autoclavada, após o que, procedeu-se à redução do explante para 10 mm x 5 mm x 5 mm, deixando o meristema recoberto por primórdios foliares e porção subjacente do rizoma.

Na preparação do meio de cultura, utilizou-se o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), retirando-se completamente ou parte do ferro, do cobre e do zinco, conforme a Tabela 1. Ao meio, foram acrescentados sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>) e BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>). O meio teve o pH ajustado para 5,8 e foi solidificado com o gelatin Phytigel™ (2 g L<sup>-1</sup>) para, em seguida, ser autoclavado a uma temperatura de 120°C, pressão de 1,05 kgf cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos. Foram distribuídos 10 ml do meio para cada tubo de ensaio, os quais foram vedados com Vitafilm (Good Year, 17 micras). Após a inoculação, os tubos de ensaio permaneceram, por uma semana, em câmara escura e, depois, foram levados para a sala de crescimento sob temperatura de 28±2°C com intensidade luminosa aproximada de 35 µEinstein, por um período de 16 horas diárias.

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial completo 3x2x2 (concentrações de Fe x concentrações de Cu x concentrações de Zn). Cada tratamento constituiu-se de 15 repetições, sendo que cada tubo de ensaio contendo um explante foi considerado uma repetição. A avaliação foi feita aos 28 dias após a inoculação. As características dos explantes avaliadas foram as seguintes: grau de oxidação, massa da matéria fresca (g) e altura (cm). A avaliação da oxidação foi efetuada subjetivamente, de forma visual, observando-se o grau de escurecimento e usando uma escala de classificação segundo a qual: 0 = sem oxidação, 1 = muito baixa oxidação, 2 = baixa oxidação, 3 = oxidação intermediária e 4 = oxidação intensa.

Após a transformação para  $(x+0,5)^{1/2}$  dos dados relativos ao grau de oxidação, estes e os demais foram submetidos à análise de variância. Quando constatada significância estatística, procedeu-se a análise de regressão ou a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância mostrou que as concentrações utilizadas de Fe influenciaram significativamente sobre o crescimento do explante em altura, em massa da matéria fresca e sobre o grau de oxidação. A variação na concentração de Cu também apresentou diferença significativa em relação ao crescimento dos explantes, ao passo que o Zn não afetou nenhuma das características avaliadas. Diniz *et al.* (1999) confirma a necessidade desses micronutrientes para os explantes de banana-prata anã nos primeiros 20 dias, através da absorção dos mesmos do meio de cultura. As interações Fe x Cu, Fe x Zn e Cu x Zn foram altamente significativas para o grau de oxidação, ao passo que não influenciaram o crescimento em altura. A massa da matéria fresca foi influenciada significativamente apenas pela interação Cu x Zn.

Pela Figura 1, verifica-se que existe um efeito linear crescente para massa da matéria fresca à medida que aumenta a concentração de Fe no meio de cultura. O ferro, considerado elemento essencial nas transformações energéticas, ocorre em proteínas do grupo heme e não-heme e está diretamente implicado no metabolismo de ácidos nucléicos e atua como ativador enzimático (Dechen *et al.*, 1991). O ferro, de forma isolada, exerceu efeito linear sobre o grau de oxidação dos explantes sendo que, para a concentração de 5,58 mg L<sup>-1</sup>, os explantes receberam, em média, nota 3,14. Em contrapartida, quando o meio de cultura não continha ferro, os explantes apresentaram-se pouco oxidados, recebendo, em média, nota 2,14.

Verifica-se, pela Tabela 2, que o crescimento dos explantes foi menor na ausência de Cu, enquanto o grau de oxidação não foi influenciado pela presença deste nutriente. A retirada do Cu do meio MS, portanto, não deve ser recomendada, visto que o crescimento em massa e em altura dos explantes é reduzido, sem, no entanto, reduzir o escurecimento do mesmo. A redução do crescimento em massa dos explantes, em cultivo *in vitro* de bananeira, pode ser prejudicial, pois levaria um maior tempo para possibilitar a divisão do explante, com o objetivo de quebra da dominância apical (Carneiro, 1997).

Na ausência do Zn e presença de Cu, houve um aumento significativo da massa de matéria fresca; entretanto, quando o Zn foi mantido no meio de cultura, os explantes apresentaram-se com o crescimento em massa semelhantes, tanto na presença como na ausência de Cu. Ao analisar os efeitos significativos do Cu dentro das concentrações do Zn (Tabela 3), verifica-se que a ausência do Zn e do Cu determinou uma oxidação significativamente maior do que quando o Cu estava presente, ao passo que, na presença do Zn, a oxidação foi maior com a retirada do Cu. Na presença do Cu, o Zn não causou efeito significativo na oxidação. Relacionando a massa da matéria fresca e o grau de oxidação dos explantes para os diferentes tratamentos de Cu e Zn, constata-se que maior massa da matéria fresca foi alcançada quando o grau de oxidação foi menor, indicando, neste caso, que o crescimento sofreu influência negativa da oxidação, pela liberação de compostos melânicos tóxicos ao explante que inibem a atividade das enzimas (Araujo, 1995, e Pasqual *et al.*, 1997).

Na interação Fe x Cu para grau de oxidação dos explantes, quando se compara dentro os níveis de Fe, constata-se que, na ausência de Fe, a presença de Cu não exerceu nenhum efeito

**TABELA 1.** Variação da concentração de sais contendo Fe, Cu e Zn utilizadas em relação ao meio de cultura e quantidade total do nutriente. Goiânia-GO, 1999.

Variação da concentração utilizada em relação ao meio de cultura		Concentração utilizada no meio MS		Total do nutriente (mg L <sup>-1</sup> )
		mg L <sup>-1</sup>	μM	
Fe.EDTA	(1/1)	27,80	100	5,58 de Fe
	(1/2)	13,90	50	2,79 de Fe
	(0/0)	0	0	0,00 de Fe
(CuSO <sub>4</sub> ).5H <sub>2</sub> O	(1/1)	0,025	0,1	0,006 de Cu
	(0/0)	0	0	0,000 de Cu
(ZnSO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	(1/1)	8,60	30	1,96 de Zn
	(0/0)	0	0	0,00 de Zn

**TABELA 2** - Massa da matéria fresca, altura e grau de oxidação dos explantes de bananeira-Prata (*Musa AAB*) na presença e ausência de cobre no meio de cultura. Goiânia-GO, 1999.

Cobre (mg L <sup>-1</sup> )	Massa da matéria Fresca (g)	Altura do explante (cm)	Grau de oxidação
0,000	3,1702 B	3,0585 B	2,5846 A
0,006	3,4558 A	3,7228 A	2,5614 A

Médias seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

**TABELA 3** - Médias referentes à massa da matéria fresca (g) e grau de oxidação por explante de bananeira-Prata (*Musa AAB*) na ausência e presença de cobre e zinco. Goiânia-GO, 1999.

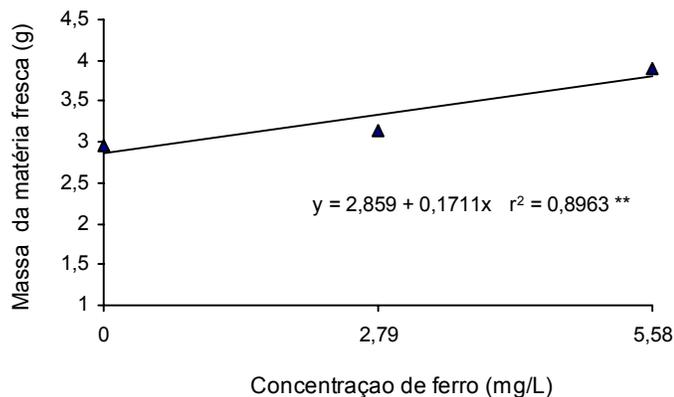
Cobre (mg L <sup>-1</sup> )	Zinco (mg L <sup>-1</sup> )			
	Massa da Matéria Fresca		Grau de Oxidação	
	0,00	1,96	0,00	1,96
0,00	2,964 B b	3,396 A a	2,7647 A a	2,3871 B b
0,006	3,652 A a	3,279 A a	2,4444 B a	2,6666 A a

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

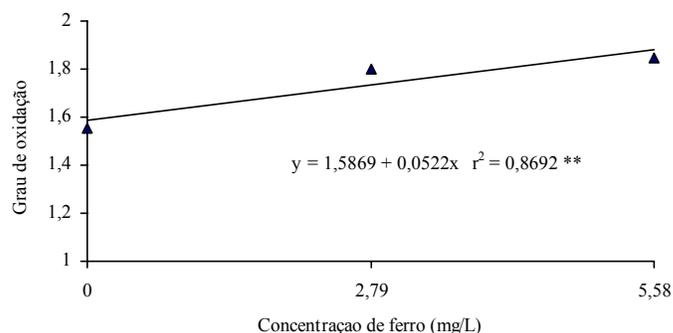
**TABELA 4** - Médias referentes a grau de oxidação de explantes de bananeira-Prata (*Musa AAB*) em relação a diferentes concentrações de ferro e cobre, e ferro e zinco. Goiânia-GO, 1999.

Ferro (mg L <sup>-1</sup> )	Grau de Oxidação			
	Cobre (mg L <sup>-1</sup> )		Zinco (mg L <sup>-1</sup> )	
	0,00	0,006	0,00	1,96
0,00	2,0000 a	2,2727 a	2,5454 a	1,7143 b
2,79	2,7727 a	2,2857 b	2,4762 a	2,5909 a
5,58	2,9545 b	3,4286 a	2,8889 b	3,3889 a

Médias seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

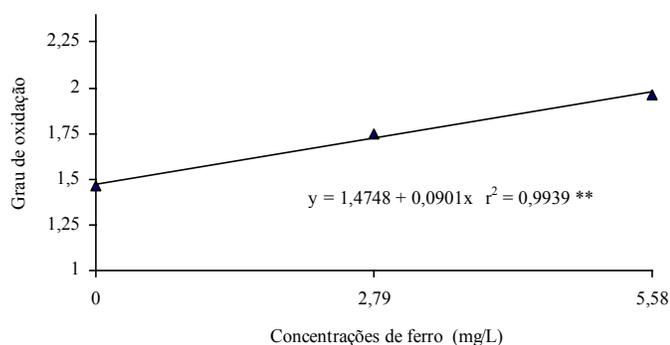


**FIGURA 1** - Média da massa da matéria fresca de explantes de bananeira-Prata (*Musa AAB*) cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de Fe do meio de cultura. Goiânia-GO, 1999.



**FIGURA 2** - Grau de oxidação<sup>1/</sup> de explantes de bananeira-Prata (*Musa AAB*) em diferentes concentrações de Fe, na ausência de Cu. Goiânia-GO, 1999.

<sup>1/</sup> Dados transformados por  $(x + 0,5)^{1/2}$



**FIGURA 3** - Grau de oxidação<sup>1/</sup> de explantes de bananeira-Prata (*Musa AAB*) na presença de zinco ( $1,96 \text{ mg L}^{-1}$ ) e em diferentes concentrações de ferro. Goiânia-GO, 1999.

<sup>1/</sup> Dados transformados por  $(x + 0,5)^{1/2}$

significativo sobre o grau de oxidação dos explantes. Quando se utilizou a concentração de  $5,58 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe, a oxidação foi maior na ausência de Cu (Tabela 4). Observou-se que existe uma tendência de aumento no grau de oxidação quando se aumenta a concentração do ferro, tanto na presença como na ausência de cobre. A análise de regressão para o efeito de diferentes concentrações de ferro, quando o cobre não foi adicionado ao meio de cultura sobre o grau de oxidação dos explantes, mostra um efeito linear crescente à medida que se eleva a concentração de ferro no meio de cultura (Figura 2). Segundo Vagera & Havrānek (1982), quando se adiciona Fe.EDTA ao meio de cultura, este tem relação direta com o escurecimento; entretanto, não foi verificada esta relação com a adição de  $\text{FeSO}_4$  ou EDTA, de forma isolada. A maior absorção de Fe pelo explante pode induzir a maior produção das enzimas peroxidase e catalase, as quais apresentam o ferro no grupo prostético (Araujo, 1995, e Pasqual *et al.*, 1997). Estas aumentam a sua atividade na presença de oxigênio após sua liberação para o meio de cultura pelos tecidos lesados, o que provoca o aumento do escurecimento dos explantes (Amorim, 1985).

Os efeitos da interação ferro x zinco sobre o grau de oxidação dos explantes e a comparação de médias são mostradas na Tabela 4. Para a concentração de  $1,96 \text{ mg L}^{-1}$  de Zn, verificou-se que houve uma resposta linear em função das diferentes

concentrações de ferro, ou seja, o grau de escurecimento dos explantes cresce à medida que se aumenta a sua concentração (Figura 3). Vagera & Havrānek (1982) verificaram que a intensidade do escurecimento aumentou proporcionalmente com a concentração de Fe.EDTA no meio. Verifica-se que o Fe influenciou positivamente sobre o grau de escurecimento dos explantes, tanto na ausência como na presença de Zn, apresentando valores de 2,89 e 3,39, respectivamente, quando a dose de Fe foi maior. Pelos resultados apresentados na Tabela 4, verifica-se que, mesmo reduzindo o Zn e o Fe do meio de cultura, os explantes ainda se apresentaram escurecidos, ou seja, outros estudos devem ser realizados para obtenção de resultados mais expressivos.

## CONCLUSÕES

- 1 - O ferro, o cobre e o zinco não devem ser retirados do meio de cultura MS, pois são essenciais para o crescimento dos explantes.
- 2 - A concentração de ferro influencia a oxidação de explantes, sendo que maiores oxidações foram observadas em soluções mais concentradas.
- 3 - A redução ou retirada do Cu, Fe e Zn do meio MS, de forma isolada ou em combinações, não foi suficiente para eliminar a oxidação de explantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V. de. Respiração. In: FERRI, M.G. (Coord.) **Fisiologia vegetal**. São Paulo : EPU, 1985. v.1, p.251-279.
- ARAUJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 1985. 355 p.
- CARNEIRO, I.F **Adequação de técnicas de cultura *in vitro* da obtenção de mudas de bananeira (*Musa AAB*) cultivar Maçã**. 1997 f. 106f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.

- CEASA-GO. **Aspectos da oferta e comercialização em 1996**. Goiânia: CEASA, 1996. 175p. (Boletim Informativo, 21).
- DECHEN, A.R.; HAAG, H.P.; CARMELLO, Q.A.C. Funções de micronutrientes na Agricultura. In: FERREIRA, A.A.; CRUZ, M.C.P. (Ed.). **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: POTAFOS, 1991. p. 169-172.
- DINIZ, J.D.N.; GONÇALVES, A.N.; HERNANDEZ, F.F.F.; TORRES, A.C. Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.8, p.1385-1391, 1999.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Hants: Exegetics Limited, 1984. 709p.
- IBGE. **Anuário estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, 1998. v.58, p.3-26.
- MALAVOLTA, E.; HAAG, H.P.; MELLO, F.A.F. *et al.*. **Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas**. São Paulo : Pioneira, 1974. 752p.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Bern: Potash Institute, 1987. 685p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 1997. 159p.
- SOUZA, A. S.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, B.F.V.; CORDEIRO, Z.J.M.; SILVA NETO, S.R.S. Propagação. In: ALVES, E.J. org. **A cultura da banana. Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Cruz das Almas: Embrapa/SPI, 1998. p.151-195.
- VAGER, J.; HAVRÁNEK, P. *In vitro* regulation of androgenesis by iron ions and chelate: a common property of two androgenic species (*Nicotiana tabacum* L. and *Datura innoxia* Mill). **Biologia Plantarum**, Praga, v.24, n.4, p.282-289, 1982.
- VUYLSTEKE, D.R.; ORTIZ, R. Field performance vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB GROUP). **HortScience**, Alexandria, v.31, n.5, p.862-865, 1996.