**CRESCIMENTO E ABSORÇÃO MINERAL EM EXPLANTES DE
BANANEIRA (*Musa sp.* AAB), cv. PRATA ANÃ, *IN VITRO***

JOSEFA DIVA NOGUEIRA DINIZ

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. KEIGO MINAMI

Tese apresentada ao Departamento de
Horticultura da Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz” da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia. - Área
de concentração: Fitotecnia

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Diniz, Josefa Diva Nogueira

Crescimento e absorção mineral em explantes de bananeira (*Musa sp.* AAB),
cv. prata anã, *in vitro* / Josefa Diva Nogueira Diniz. - - Piracicaba, 1996.
96p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia

1. Banana prata-anã - Cultivo "in vitro" 2. Banana prata-anã - Nutrição 3.
Nutriente em banana prata-anã I. Título

CDD 634.772

**CRESCIMENTO E ABSORÇÃO MINERAL EM
EXPLANTES DE BANANEIRA (*Musa sp.* AAB), cv. PRATA
ANÃ, *IN VITRO***

JOSEFA DIVA NOGUEIRA DINIZ

Aprovada em: 20.02.1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Keigo Minami	ESALQ/USP
Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves	ESALQ/USP
Prof. Dr. João Alexio Scarpate Filho	ESALQ/USP
Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald	UFSCAR/SP
Prof. Dr. Antonio Carlos Torres	CNPq/EMBRAPA/DF

Prof. Dr. KEIGO MINAMI

Orientador

À memória de meus pais

ALVARO DINIZ E SILVA

pelo exemplo de honradez e tolerância que sempre soube
transmitir

e MARIA DULCE NOGUEIRA DINIZ

cujo convívio me foi tirado durante essa caminhada, pela
felicidade de cada momento ao seu lado ao longo da vida

Ao FERNANDO

meu esposo, que mesmo nas minhas ausências, com
paciência e generosidade, sempre soube estar presente,
auxiliando em todas as etapas e permitindo que a realização
do curso se tornasse viável

À NICOLE

minha filha, que veio como uma benção durante o curso,
para dar um novo significado a minha vida

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS por me ter ajudado a enfrentar as dificuldades com serenidade e otimismo;

Ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará que me deu condições para realização do meu Curso de Doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela ajuda concedida através de bolsa de estudo;

Ao Professor Keigo Minami, pela orientação, ensinamentos e lições de vida, durante as aulas e durante o curso;

Ao Professor Antonio Natal Gonçalves, pela experiência, apoio e valiosas sugestões durante a realização do trabalho;

Aos Professores João Alexio Scarpate Filho (ESALQ/USP), Lee Tseng Sheng Gerald (UFSCAR/SP) e Antonio Carlos Torres (CNPq/EMBRAPA), pela participação na banca examinadora e sugestões apresentadas;

Ao Professor Fernando Felipe Ferreyra Hernandez, do Departamento de Ciências do Solo do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração na realização das análises químicas, estatísticas e valiosas sugestões apresentadas durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos colegas do Curso de Mestrado e Doutorado, especialmente aos amigos, Ana Rita de Moraes Brandão Brito e seu esposo Gilberto pelo convívio amigo e solidariedade e a Marcia Hiromi Habiro, com quem a troca de idéias tornou mais interessante as longas horas de estudo;

Aos meus irmãos e irmãs, especialmente a Maria Dalva Nogueira Diniz, pelo apoio nas horas certas;

Aos meus enteados Ernesto, Érika e Fernando, que compreenderam as ausências de seu pai para me acompanhar quando necessário;

A todos que de alguma forma contribuíram para que fosse possível a realização desse trabalho e do curso de doutorado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	<i>viii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>x</i>
RESUMO	<i>xiii</i>
SUMMARY	<i>xv</i>
1. - INTRODUÇÃO	1
2. - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. - Nutrição mineral da bananeira	3
2.2. - Micropropagação da bananeira	16
2.2.1. - Tipos de explantes	17
2.2.2. - Meio de cultura	19
2.2.3. - Reguladores do crescimento	24
2.2.3.1. - Citocininas	24
3. - MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. - Fonte e preparo dos explantes	26
3.2. - Meio de cultura	26
3.3. - Tratamentos	27
3.4. - Condução do experimento	27
3.5. - Parâmetros avaliados	29
3.6. - Análise química dos explantes e propágulos	30
3.7. - Delineamento estatístico	31
4. - RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. - Massa dos explantes e propágulos	32
4.2. - Altura, número de folhas, gemas e raízes por propágulo	36

4.3. - pH	38
4.4. - Macronutrientes	41
4.4.1. - Nitrogênio	41
4.4.2. - Fósforo	47
4.4.3. - Potássio	50
4.4.4. - Cálcio	53
4.4.5. - Magnésio	55
4.4.6. - Enxofre	59
4.5. - Micronutrientes	61
4.5.1. - Ferro	61
4.5.2. - Zinco	68
4.5.3. - Manganês	70
4.5.4. - Cobre	72
4.5.5. - Boro	75
4.6. - Considerações finais	76
5. - CONCLUSÕES	80
6. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE TABELAS

			Pág.
Tabela	1	Composição do meio básico de Murashige & Skoog (1962), utilizado no cultivo <i>in vitro</i> de explantes de bananeira (<i>Musa</i> sp.) cv. Prata anã	28
Tabela	2	Massa da matéria fresca, massa da matéria seca e relação massa da matéria seca/massa da matéria fresca no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, durante o cultivo <i>in vitro</i> (média de 3 repetições).....	33
Tabela	3	Concentração de macronutrientes no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, durante o cultivo <i>in vitro</i> (média de 3 repetições).....	42
Tabela	4	Extração de macronutrientes do meio de cultura pelo rizoma, pseudocaule, folhas e pelos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã e nutrientes remanescentes no meio durante o cultivo <i>in vitro</i> (média de 3 repetições).....	43
Tabela	5	Porcentagem de macronutrientes remanescentes no meio básico MS em função do tempo de cultivo de propágulos de bananeira, cv. Prata anã, e a contribuição em relação ao meio, dos propágulos iniciais.....	44

Tabela 6	Concentração de micronutrientes no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, durante o cultivo, <i>in vitro</i> (média de 3 repetições).	64
Tabela 7	Extração de micronutrientes do meio de cultura pelo rizoma, pseudocaule, folhas e pelos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã e quantidades remanescentes no meio, durante o cultivo <i>in vitro</i> (média de 3 repetições).....	65
Tabela 8	Porcentagem de micronutrientes remanescentes no meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) em função do tempo de cultivo de propágulos de bananeira, cv. Prata anã, e a contribuição, em relação ao meio, dos propágulos iniciais.....	66

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Incrementos relativos da massa da matéria fresca (Δmmf) no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, em períodos de 10 dias, durante 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	34
Figura 2	Incrementos relativos da massa da matéria seca (Δmms) no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, em períodos de 10 dias, durante 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	34
Figura 3	Altura e número médio de folhas em função do tempo de cultivo, em propágulos de bananeira, cv Prata anã.....	37
Figura 4	Percentagem de propágulos de bananeira, cv. Prata anã, com gemas e raízes em função do tempo de cultivo.....	37
Figura 5	Variação do pH do meio básico de cultivo de Murashige & Skoog (1962), durante o preparo.....	39
Figura 6	Variação do pH do meio de cultivo em função do tempo, sem propágulos e com propágulos de bananeira cv. Prata anã, de 0 - 10 dias (a) e de 0 - 60 dias (b).....	39

Figura 7	Distribuição percentual de nitrogênio (a), fósforo (b) e potássio (c) no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos de bananeira, cv. Prata anã.....	45
Figura 8	Variação da relação N/P no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de bananeira, cv. Prata anã.....	48
Figura 9	Variação da relação N/K no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de bananeira, cv. Prata anã.....	48
Figura 10	Variação da relação K/P no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de bananeira, cv. Prata anã.....	52
Figura 11	Variação da relação K/Ca no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de bananeira, cv. Prata anã.....	52
Figura 12	Distribuição percentual de cálcio (a), magnésio (b) e enxofre (c) no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos de bananeira, cv. Prata anã.....	56
Figura 13	Variação da relação Ca/Mg no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de bananeira, cv. Prata anã.....	57

Figura 14	Variação da relação N/S no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de bananeira, cv. Prata anã.....	57
Figura 15	Distribuição percentual de ferro (a), zinco (b) e manganês (c) no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos de bananeira, cv. Prata anã.....	67
Figura 16	Distribuição percentual de cobre (a) e boro (b) no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos de bananeira, cv. Prata anã.....	74

CRESCIMENTO E ABSORÇÃO MINERAL EM EXPLANTES DE BANANEIRA
(*Musa sp.* AAB), cv. PRATA ANÃ, *IN VITRO*

Autora: Josefa Diva Nogueira Diniz

Orientador: Prof. Dr. Keigo Minami

RESUMO

Foi estudada *in vitro* a absorção de nutrientes minerais por explantes de bananeira, cv. Prata Anã, em função do período de tempo de cultivo, visando fornecer subsídios para ajuste do meio de cultura e estabelecimento do melhor período de repicagem. O cultivo de gemas apicais foi realizado em meio semi-sólido contendo macro, micronutrientes e vitaminas de Murashige & Skoog (1962), durante 60 dias. Foram utilizados sete tratamentos representados pelos períodos de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias de cultivo, com três repetições, avaliando-se nos propágulos os seguintes parâmetros: altura das plantas, número de gemas, número de raízes e variação do pH do meio durante o preparo e durante o cultivo. No rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros, também, foram avaliadas as massas da matéria fresca e seca, os teores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S); teores de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) e as quantidades de nutrientes absorvidas. Com base nos resultados obtidos, observou-se que as massas da matéria fresca e seca e o crescimento em altura dos propágulos aumentaram até os 60 dias, sendo este aumento maior nos primeiros 10 dias, enquanto que, o número de folhas e gemas até os 30 dias, data em que se estabilizou e o número de propágulos com raízes começou a aumentar significativamente. O pH do meio de cultura variou durante o preparo após a adição do ágar, aquecimento e esterilização

em autoclave. Com a inoculação dos explantes, o pH decresceu de 5,61 para 4,0 aos cinco dias, permanecendo estável até os 60 dias de cultivo. Em todos os nutrientes observou-se que a maior taxa de absorção ocorreu durante os primeiros 20 dias de cultivo, com exceção do Mn, cuja absorção permaneceu constante durante todo o cultivo. Exceto para o P, as quantidades de nutrientes fornecidas pelo meio de cultivo foram suficientes para suprir as exigências da cultura. O P foi o nutriente mais rapidamente absorvido pelos propágulos, extraindo 75% do inicial do meio, aos 30 dias de cultivo, cessando sua absorção aos 50 dias, com 9% remanescente no meio. Todos os micronutrientes foram fornecidos em quantidades suficientes para o desenvolvimento dos propágulos, no entanto, com base nas quantidades de Zn, Mn, Cu e B (58,5, 77,3, 78,4 e 49,7%, respectivamente) remanescentes no meio, pode-se afirmar que os mesmos estavam em excesso. Para o cultivo *in vitro* de explantes de bananeira no meio MS, a proporção de P pode ser duplicada, enquanto que as concentrações dos micronutrientes: Zn, Mn, Cu e B, podem ser reduzidas, para a obtenção de maiores taxas de crescimento por períodos mais longos. Os propágulos desenvolvidos no meio MS apresentaram bom desenvolvimento em altura, número de folhas e gemas, com poucas raízes e boas condições nutricionais aos 30 dias, indicando que o período recomendável para a realização da repicagem deve ser em torno dessa data.

**GROWTH AND MINERAL ABSORPTION IN BANANA (*Musa sp.* AAB) cv.
“PRATA ANÃ” EXPLANTS *IN VITRO***

Author: Josefa Diva Nogueira Diniz

Adviser: Prof. Dr. Keigo Minami

SUMMARY

In vitro, growth and mineral nutrients absorption studies, taking in account cultivation time, with banana cv. “Prata Anã”, were developed to provide information to adjust the artificial medium in order to establish the best explantation time for this cultivar. The cultivation was carried out in a Murashige and Skoog’s semi-solid medium for 60 days. The experimental units were submitted to seven treatments, replicated three times, made up of 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60-day of cultivation periods. The following parameters were evaluated: visual symptoms of deficiency and/or toxicity, plant heights, bud numbers, root numbers, medium pH during the preparation and through the plant cultivation. Fresh and dried matter weight, macronutrients (N, P, K, Ca, Mg and S), micronutrients (B, Cu, Fe, Mn, and Zn) as well as the amount of nutrients absorbed by the rhizome, pseudotrunk, leaves and full explants were also assessed. Fresh and dried matter weights and explant heights have increased up to the 60th cultivation day. The highest increments were observed for the first ten days of cultivation. In respect to the number of leaves and number of buds, they have increased up to 30th cultivation day and reached the stabilization. By this cultivation day (30th), the number of explants with roots have significantly expanded. The medium pH has fluctuated during the preparation and agar adding, heating and autoclave sterilization. When the explants were inoculated the medium pH changed from 5,61 to 4,00 and remained to the lowest value up to the 5th

cultivation day. This condition was sustained up to the 60th day. Except to Mn which has exhibited a constant absorption level throughout the bioassay, all nutrients have depicted the highest absorption rate during the first 20 days of cultivation. All nutrients supplied by the medium were adequate to match the plant requirements. However, P was the nutrient with the fastest absorption rate by the explants. Seventy-five percent of this element was extracted from the medium up to the 30th cultivation day. Its absorption was stopped by the 50th day with 9% of it remaining in the medium. All micronutrients were sufficient to promote the explants' growth. Nevertheless, the remanent amounts in the medium have indicated that Zn, Mn, Cu and B (58,5, 77,3, 78,4 and 49,7%, respectively) were in excess. The data support the reasoning that *in vitro* banana explants cultivation, in MS medium, the amount of phosphorous must be duplicated. On the other hand, the concentrations of the micronutrients, v.g., Zn, Mn, Cu and B could be reduced in order to allow higher rates of growth for more extended period of cultivation. The explants which have grown in MS medium have exhibited a satisfactory development in terms of height, number of leaves and buds, few roots and proper nutritional conditions up to the 30th cultivation day. Consequently, it is advisable to keep this time period as the best suggestion for banana cv. "Prata Anã" explantation.

1. INTRODUÇÃO

A banana é um fruto tropical de grande importância alimentícia, social e econômica. O Brasil é hoje o segundo maior produtor mundial de banana, com uma produção de 5.593.000t no ano de 1993, equivalente a 11% da produção mundial, perdendo apenas para a Índia (Fao, 1994).

A produtividade da cultura no Brasil é baixa quando comparada com outros países produtores. Ante a necessidade de incrementar a produtividade da cultura se faz necessário, além do emprego de práticas de manejo adequadas, o uso de cultivares melhoradas, assim como, dispor de quantidades suficientes de material de propagação.

São diversas as cultivares utilizadas, sendo a ‘Prata’ uma das mais cultivadas principalmente nas Regiões Norte e Nordeste, que juntamente com as cultivares ‘Branca’ e ‘Pacovan’ respondem por 75% da área cultivada com banana no Brasil (Alves, 1990). Na última década, o plantio da cultivar ‘Prata anã’ vem sendo recomendado em substituição a ‘Prata’, não existindo qualquer restrição para efeito de comercialização a esta cultivar, que além de apresentar menor susceptibilidade ao mal de sigatoka e maior resistência ao vento (Marciani-Bendezú *et al.*, 1986), apresenta, ainda, as seguintes vantagens sobre a ‘Prata’: maior produtividade, menor porte, o que facilita a realização de tratos culturais e a colheita. Permite também, o uso de espaçamentos menores, aumentando bastante o número de plantas/ha e, conseqüentemente, a produção e a produtividade. Quanto aos frutos, são semelhantes aos da ‘Prata’ na forma, tamanho, sabor, resistência ao transporte, com boa duração na prateleira e excelente aceitabilidade comercial.

Atualmente, o cultivo *in vitro* de gemas de bananeira constitui uma metodologia de propagação assexuada eficaz, que permite uma rápida multiplicação em grande escala a partir de um explante. Esta metodologia alternativa pode ser realizada o ano todo e ser

programada para facilitar a disponibilidade de material para plantio em novas áreas (Lameira *et al.*, 1990). Além disso, permite a produção e intercâmbio de material livre de vírus e de outros patógenos, manutenção da fidelidade de genótipos selecionados e facilita a transferência de germoplasma de uma região para outra.

Para o sucesso do cultivo *in vitro*, é de grande importância a composição mineral e orgânica do meio de cultivo. A determinação das mudanças na composição de nutrientes do meio de cultura, durante o crescimento dos explantes, proporciona informações importantes que podem ser empregadas na melhoria do meio para otimização do crescimento. Por outro lado, permite o entendimento de alguns aspectos da fisiologia da nutrição *in vitro*, que ainda são pouco conhecidos.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o crescimento e a absorção de nutrientes minerais *in vitro* por explantes de bananeira em meio semi-sólido de Murashige e Skoog (1962), a fim de fornecer subsídios para o ajuste da proporção de nutrientes fornecidos ao meio de cultura e para determinar o melhor período de repicagem.

Tendo em vista o objetivo estabelecido nesta pesquisa, foram propostas as seguintes hipóteses:

1. Se o equilíbrio e a disponibilidade dos nutrientes do meio de cultura são adequados, estes devem ser absorvidos pelos explantes em proporções similares, de maneira que o excesso ou deficiência de um não interfira na absorção do outro e conseqüentemente, no desenvolvimento dos explantes.
2. Se durante o desenvolvimento, os explantes extraem nutrientes em proporções diferentes das fornecidas ao meio, é possível fazer o ajuste de modo a manter por mais tempo o equilíbrio iônico e sua capacidade de difusão, para favorecer maiores taxas de desenvolvimento dos explantes.
3. Se se conhece as quantidades de nutrientes extraídas pelos explantes, é possível determinar o período ótimo para a repicagem, antes que deficiências afetem o desenvolvimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nutrição mineral da bananeira

A bananeira é uma herbácea de porte alto, com ciclo de desenvolvimento em geral, independente das estações e um intenso poder de crescimento, que tem como consequência uma exigência em elementos minerais relativamente elevada, quando se deseja alta produtividade (Carvalho *et al.*, 1986).

A maioria dos estudos sobre nutrição mineral de plantas tem sido realizada com plantas adultas, sob condições de campo ou de casa de vegetação, sendo poucas as informações existentes na literatura sobre o comportamento das plantas de bananeira com relação a nutrição *in vitro*. Atualmente, o método da micropropagação está sendo amplamente utilizado na multiplicação e produção de mudas comerciais de boa qualidade desta espécie.

Segundo Nóbrega (1983), a determinação das necessidades nutricionais da bananeira utilizando somente a análise de solo, não é suficiente para garantir um programa correto de fertilização. O solo é um meio extremamente heterogêneo e as extrações de nutrientes feitas durante sua análise não levam em conta as características do plantio. A análise foliar foi desenvolvida como um meio para se obter, diretamente da planta, informação mais precisa sobre seu estado nutricional.

Os teores de nutrientes nas plantas de bananeira variam entre cultivares, entre as diferentes partes da planta e nos diferentes estádios de desenvolvimento. Samuels *et al.* (1978) observaram que na cultivar ‘Maricongo’, grupo AAB, subgrupo Plantain, onde foram coletadas amostras mensais desde o plantio até a colheita, os seguintes resultados foram obtidos: os teores de NPK tenderam a diminuir com o aumento da idade da planta; esta diminuição deve-se à redistribuição de nutrientes a partir do limbo e pseudocaule para o fruto;

o teor de Ca permaneceu relativamente estável. Na cultivar ‘William’ (‘Giant Cavendish’) foi observada uma tendência de elevação do teor de Ca com a idade da planta. O contrário ocorreu com o P, cujo teor diminuiu com a idade (Turner & Barkus, 1974). A planta nova tem maior necessidade de N do que de K, quando comparada com uma planta no final do ciclo (Martin-Prével, 1964).

Estudando a influência da adubação potássica nas modificações dos teores de N, P, K, Ca e Mg nos estádios de diferenciação, antes e depois da floração, Garcia *et al.* (1980) constataram que, a medida que a planta se desenvolvia, ocorria uma diminuição nos teores de N e K e um aumento no teor de Ca; os teores de P e Mg permaneceram mais ou menos constantes.

Nóbrega (1983) constatou que os estádios de desenvolvimento da planta, a idade da folha e a secção foliar, influenciaram os teores de macronutrientes na folha, sendo os maiores valores assim obtidos:

- a) N e P, no estágio de indução floral e floração, no limbo da folha 1;
- b) K, no estágio de indução floral, no pecíolo da folha 1;
- c) Ca, no estágio de colheita, no pecíolo da folha 1;
- d) Mg, no estágio de floração e colheita, na folha 1. No limbo, quando no estágio de floração e em todas as secções estudadas, quando no estágio de colheita;
- e) S, em todos os estádios estudados, no limbo da folha 7. O autor verificou que, de modo geral, a medida que as plantas se desenvolvem quanto a idade, os teores de N, P e K decrescem, os de Ca aumentam, enquanto os de Mg e S modificam pouco. Quanto a localização, observou que os teores de N e P são mais elevados no limbo que no pecíolo, enquanto que este é mais rico em K do que o limbo, não constatando diferenças marcantes nos teores de Ca e Mg entre o limbo e o pecíolo.

Quanto às exigências nutricionais para a variedade Nanicão, Gallo *et al.* (1972) citam a seguinte ordem decrescente quanto às exigências totais:

macronutrientes: K, N, Ca, Mg, P, S.

micronutrientes: Cl, Mn, Fe, B, Zn, Cu, Mo.

O nitrogênio (N) é considerado o elemento mais importante para o crescimento da bananeira (Lahav & Turner, 1983). É o elemento cujo sintoma de carência geralmente aparece mais cedo na bananeira, podendo se manifestar até no seu primeiro mês de vida (Medina, 1990). A deficiência aguda de N causa clorose generalizada, principalmente nas folhas velhas, coloração verde-amarelada nos limbos, verde-amarelada e rósea nos pecíolos e bainhas. Enfraquecimento geral da planta e, em casos extremos, morte por podridão fisiológica generalizada, sem diferenciação dos primórdios florais (Carvalho *et al.*, 1986). Por outro lado, o excesso de N causa rápido crescimento em altura do pseudocaule que perde a resistência. O rebento tem a fase vegetativa prolongada pelo excesso de folhas emitidas durante maior período de tempo (Medina, 1990).

Os teores médios de N encontrados para a maioria das plantas são em torno de 3 a 5%. Para a bananeira, dados da EMBRAPA (1985) mostram na terceira folha em época de floração, níveis de 3,01, 3,06, 3,16, 3,26 e 3,68% de N para as cultivares, 'Mysore', 'Prata', 'Pacovan', 'Nanicão' e 'Nanica', respectivamente. Para as cultivares 'Nanica' e 'Nanicão', Hewitt (1955) cita teores médios de 2,67% considerando níveis adequados, em torno de 2,60%. Para a cultivar 'Pacovan', Neves *et al.* (1991) encontraram 2,02% de N em limbo foliar de planta adulta, enquanto que em rebentos o teor de N encontrado foi de 1,44%.

No campo, a deficiência de N é facilmente corrigida por vários tipos de fertilizantes nitrogenados e seu manejo irá depender de outros fatores que afetam o crescimento tais como, clima e outros nutrientes (Lahav & Turner, 1983). Os fertilizantes nitrogenados mais utilizados são o nitrato de amônio (NH_4NO_3), sulfato de amônio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] e uréia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$]. Normalmente são aplicados cerca de 250kg de N/ha/ano, porém em alguns países são usados até mais de 600kg.

Anjorin & Obigbesan (1983), utilizando os níveis 0, 100, 200, 300 e 400g de N/pl, verificaram um aumento de peso médio do pseudocaule, das folhas verdes e do número médio de folhas por planta até o nível de 300 g, havendo um decréscimo a partir daí.

No cultivo *in vitro*, as formas mais comuns de adicionar N aos meios de cultura, das diversas espécies, são amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), sendo que o íon amônio é

preferencialmente utilizado durante o estágio inicial de crescimento, enquanto que o nitrato é assimilado rapidamente nos estágios finais (Zink & Veliky, 1977).

A maior taxa de absorção de nitrogênio nos primeiros períodos de cultivo, que coincide também com o maior crescimento dos tecidos, provavelmente é causada pela absorção intensa de cátions, principalmente de NH_4^+ pelos explantes, que após seu esgotamento passam a absorver NO_3^- (Desamero *et al.*, 1993; Mezzetti *et al.*, 1991). De acordo com Gautheret (1955), o íon NH_4^+ é menos tóxico, mas seu valor nutritivo é bem mais baixo que do NO_3^- .

Segundo Loretto *et al.* (1988) o N tem uma função importante no desenvolvimento dos tecidos *in vitro*. Estes autores sugerem o uso de baixos níveis de N nos estágios iniciais (multiplicação ou divisão celular) e maiores concentrações, subsequentemente, para aumentar a formação de gemas axilares. Observaram ainda que havia uma correlação entre alto vigor e baixo desenvolvimento de gemas quando o meio inicial era rico em N.

Para Dantas *et al.* (1978), embora o P seja um dos macronutrientes requeridos em menor proporção pela bananeira, tem atuação importante no desempenho e produção da planta. Sua deficiência reflete-se principalmente no sistema radicular bem como no aparecimento de necroses nas folhas mais velhas (Lacoeuilhe & Godefroy, 1971; Charpentier & Martin-Prével, 1965) e limita a absorção de cátions, particularmente de K (Medina, 1990). Segundo Lahav & Turner (1983) a absorção de P pode ser influenciada pelo Mg, ou seja, baixo teor de Mg reduz a absorção pela raiz e restringe a translocação de P para o ápice. Por outro lado, deficiência de outros nutrientes, principalmente de N, leva a um acúmulo de fosfato (Murray, 1960).

A deficiência de P limitando o desenvolvimento dos tecidos *in vitro*, tem sido observada por vários pesquisadores em diferentes culturas devido a rapidez da absorção nos primeiros dias de cultivo. MacCarthy *et al.* (1980), no cultivo de *Catharanthus roseus*, indicam que cerca de 50% do suprimento de P era consumido aos 6 dias, apresentando deficiência completa aos 10 dias. Em maçã, Barroso *et al.* (1985), encontraram o limite de deficiência de P aos 45 dias de cultivo e, Singha *et al.* (1987), em pesquisas realizadas com *Malus* sp e *Pyrus communis*, verificaram que após seis semanas, aproximadamente, 50% do P

inicial havia sido removido do meio. Trabalhando com *Actinidia deliciosa*, Mezzetti *et al.* (1991) observaram que aos 30 dias apenas 5,5% do P inicial permanecia no meio de cultura.

Sabe-se que o teor de P na maioria das plantas cultivadas encontra-se entre 0,2 a 0,4% na matéria seca. Para diversas cultivares de bananeira, tem sido encontrada a quantidade de P variando de níveis críticos como 0,07% em pecíolo de folha no estágio de rebento da cultivar ‘Dwarf Cavendish’ (Lahav & Turner, 1983), a níveis médios de 0,16% em folhas das cultivares ‘Prata’, ‘Pacovan’ e ‘Mysore’ e 0,18 e 0,20% nas cultivares ‘Nanicão’ e ‘Nanica’, respectivamente (EMBRAPA, 1985), até níveis elevados de 0,60% encontrados por Neves *et al.* (1991) em limbo foliar de planta adulta da cultivar ‘Pacovan’. Para a cultivar ‘Nanicão’, Hernandez *et al.* (1985) encontraram níveis de P oscilando de 0,09 a 0,32% em folhas, pecíolos e rizomas.

Hewitt (1955) encontrou teores médios de 0,215 e 0,233% de P em folhas de bananeira das cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’, respectivamente. O autor considerou como níveis críticos, quando o teor de P na matéria seca era menor que 0,087% e níveis adequados com 0,196%.

A bananeira é uma cultura exigente em nutrientes, principalmente em K para proporcionar boas produções, sendo este também o elemento extraído e exigido em maior quantidade por esta espécie. Segundo Lahav (1972), com uma deficiência aguda de K ocorre um retardamento geral no crescimento, diminuição da altura da planta, da circunferência do pseudocaule e do tamanho das folhas e menor longevidade das mesmas.

A produção de matéria seca total é o resultado do balanço entre fotossíntese e respiração. Sob condições de deficiência de K, há uma redução da respiração e redução da matéria seca total pela redução da fotossíntese. O cacho é a parte da planta afetada mais drasticamente pela insuficiência de K. O crescimento do fruto é afetado pela redução da translocação dos carboidratos das folhas para o fruto, e quando estes são translocados, há redução na conversão em amido resultando na formação de cachos frágeis com frutos finos (Lahav & Turner, 1983). Há também um retardamento na iniciação floral, redução no número de frutos por cacho, número de pencas por cacho e principalmente uma redução no tamanho dos frutos.

Em solos com deficiência, pode ser esperado um aumento de mais de 40% na produção com a aplicação de K, sendo que esse índice pode ser aumentado sob condições climáticas favoráveis (Langenegger & Smith, 1986).

De acordo com Lahav *et al.* (1981), os níveis nutricionais da bananeira são afetados pela adubação potássica. Hedge & Srinivas (1991) observaram que, utilizando doses crescentes (100, 200 e 300g/pl) de K_2O , houve um aumento no crescimento, produção, sólidos solúveis totais, absorção de nutrientes e uso eficiente de água. Na dosagem de 300g/pl houve um aumento no número de frutos e pencas por cacho, além de maior peso dos frutos. Um aumento de peso dos racimos e da produção total em resposta a aplicação de K foi observado por Gomes (1988). Para a cultivar 'Nanicão', Manica *et al.* (1978) verificaram maior número de pencas por cacho, nas plantas que receberam 300g de KCl em relação às que não receberam esse tratamento.

Dados da EMBRAPA (1985) mencionam teores de K na matéria seca da terceira folha na época de floração de 2,20% na cultivar 'Mysore', 2,21% para 'Prata' e 'Pacovan' e 2,52 e 2,70% para as cultivares 'Nanicão' e 'Nanica', respectivamente. Em limbo foliar de planta adulta da cultivar 'Pacovan', Neves *et al.* (1991) encontraram teores relativamente baixos de 2,15%, enquanto que em rebentos o nível encontrado foi de 7,52% de K.

Gomes (1988) trabalhando com as cultivares 'Valery' e 'Gran Enano' observou na matéria seca do limbo foliar da folha III, um aumento no teor de K de 2,65 para 3,23% quando foram aplicadas doses crescentes de sulfato de potássio de 0-450kg/ha/ano.

Com relação ao Ca, devido a sua baixa mobilidade na planta, os sintomas de deficiência se apresentam nas folhas novas que aparecem cloróticas (Carvalho *et al.*, 1986). Não há muita influência sobre o rendimento quantitativo, porém, os frutos são de má qualidade, com tendência a rachadura antes da maturação e com ciclo mais longo (Martin-Prével, 1980).

Gomes (1988) observou que a sequência de absorção de Ca pela planta rebento da cultivar 'Prata' foi: pseudocaule > folha > rizoma > pecíolo e que, as curvas de produção de matéria seca nesses órgãos acompanham a curva de absorção de Ca. Lahav & Turner (1983)

também constataram que a absorção de Ca durante o crescimento da planta segue o acúmulo de matéria seca pelo menos até a emergência do cacho.

O teor de Ca, na terceira folha, na época de floração, nas cultivares ‘Pacovan’, ‘Mysore’, ‘Prata’, ‘Nanica’ e ‘Nanicão’ foi de 0,41, 0,60, 0,52, 0,55 e 0,42%, respectivamente (EMBRAPA, 1985). Em limbo foliar da cultivar ‘Pacovan’, Neves *et al.* (1991) encontraram 1,04% de Ca, enquanto que nos rebentos o teor de Ca foi 0,52%. Esse aumento no teor de Ca, a medida que a planta se desenvolve, também foi verificado por Nóbrega (1983) para a cultivar ‘Prata’.

No cultivo *in vitro* de plantas de *Solanum tuberosum*, Sha *et al.* (1985) observaram que deficiência de Ca causava necrose do ápice resultando no desenvolvimento de gemas laterais. Estas, em meio com baixa concentração de Ca, passavam a desenvolver o mesmo sintoma.

Deficiência de Ca causa variações na estrutura das células das plantas. Há uma deterioração do envelope nuclear, e das membranas plasmática e vacuolar, seguindo-se de uma desorganização de outras estruturas tais como mitocondria, aparato de Golgi e plastídios, levando a uma deterioração do tecido metabolicamente ativo (Marinos, 1962).

O tipo de tampa do frasco pode influenciar na utilização do Ca pelas plantas *in vitro*. Frascos fechados com parafilme, provavelmente, mantém uma alta umidade e podem agravar o fluxo de Ca (Sha *et al.*, 1985). De acordo com Dunwell (1979) e Dunwell (1981), o uso de parafilme leva a um acúmulo de gases (CO₂, etileno e etanol) no frasco. Esse acúmulo pode causar desordens fisiológicas como, redução da taxa de transpiração, baixa ou anormal atividade metabólica e um acúmulo de metabólitos como aminoácidos e oxalatos (Ashkar & Ries, 1971; Corgan & Cotter, 1971; Thibodeau & Minotti, 1969). Estes últimos produtos, segundo vários autores citados por Sha *et al.* (1985), podem levar a uma deficiência de Ca por transformá-lo em formas não disponíveis. E que este fato pode explicar porque em culturas onde se usam parafilme, ocorre alta incidência de necrose quando comparada com outros tipos de tampas, ainda que os níveis de Ca sejam os mesmos.

Segundo Williams (1993), a absorção e distribuição de Ca através da planta são dependentes do fluxo de massa e como geralmente dentro dos frascos no cultivo *in vitro* a

umidade é alta, consequentemente a transpiração é reduzida podendo limitar o transporte de íons de baixa mobilidade e que dependem do fluxo de massa. De acordo com Palzkill *et al.* (1976) e Palzkill *et al.* (1980), quando a transpiração é inibida, o fluxo de massa é reduzido e quando a umidade relativa está próxima da saturação, pode haver deficiência de alguns elementos, principalmente de Ca.

O Mg faz parte da molécula de clorofila, é o elemento que ativa maior número de enzimas e facilita a absorção pela raiz de outros elementos, principalmente o P (Malavolta, 1980). Os sintomas de deficiência são caracterizados por uma clorose internerval começando nas folhas mais velhas e progredindo das margens para a nervura central (Martin-Prével & Charpentier, 1964). O desequilíbrio fisiológico causado pela deficiência de Mg em relação ao K na planta é conhecido com o azul da bananeira (Brun, 1952).

Normalmente o teor de Mg encontrado na maioria das plantas é em torno de 0,4 a 0,5%, na matéria seca. Essa quantidade como nos demais nutrientes varia entre cultivares e nas diferentes partes da planta. Dados da EMBRAPA (1985), indicam teores variando de 0,28 a 0,32% na matéria seca da terceira folha em época de floração para as cultivares 'Pacovan', 'Mysore', 'Prata', 'Nanica' e 'Nanicão'. Para as cultivares 'Nanica' e 'Nanicão', Gallo *et al.* (1974) citam níveis médios de 0,43 e 0,36%, respectivamente, e como adequados, níveis em torno de 0,36%.

No cultivo *in vitro*, alguns autores têm observado que nas diferentes culturas, o Mg é absorvido mais rapidamente no início do cultivo. Em *Catharanthus roseus*, MacCarthy *et al.* (1980) verificaram que o Mg era rapidamente absorvido do 6º ao 14º dia de cultivo, permanecendo estável posteriormente. Uma redução na absorção a partir da segunda semana de cultivo foi observada também por Singha *et al.* (1987) em *Malus sp* e *Pyrus communis*.

A concentração de Mg na solução ao redor das raízes tem muita influência na absorção (Turner & e Barkus, 1981), de modo que, aumentando a concentração deste elemento no meio de cultura, aumenta a sua absorção (Veliky *et al.*, 1977). Se a proporção K^+/Mg^{-2} no meio for suficientemente alta, pode diminuir a absorção de Mg ao ponto da planta apresentar deficiência desse elemento; esse antagonismo ocorre também com relação ao Ca,

de maneira que aumentando a concentração de um desses elementos, implica na diminuição da absorção do Mg e vice-versa (Malavolta, 1976).

O enxofre é um nutriente de baixa redistribuição interna na planta, apresentando, portanto, uma tendência a se elevar nas folhas mais velhas. De acordo com Fox *et al.* (1979), mesmo em caso de deficiência severa não é facilmente transportado das folhas velhas para as novas e somente um grande excesso conduz a um acúmulo apreciável nos tecidos condutores. Esse elemento tem como função principal a ativação de enzimas. Como constituinte de vários aminoácidos e proteínas, sua deficiência provoca uma série de distúrbios metabólicos como, diminuição da fotossíntese, da atividade respiratória e da síntese de proteínas (Malavolta, 1980). Como sintoma de deficiência, há o amarelecimento nas folhas novas e com uma deficiência progressiva há o aparecimento de áreas necróticas nas margens das folhas (Lahav & Turner, 1983). Em bananeiras velhas, ocorrem distúrbios de diferenciação com deformações morfológicas importantes: espessamento das folhas, diminuição na área foliar (estreitamento). Em casos graves: desaparecimento total dos limbos e abortamento da região de crescimento vegetativo (Carvalho *et al.*, 1986).

Para as cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’, Gallo *et al.* (1974) citam teores médios de S de 0,127 e 0,149%, enquanto que para a cultivar ‘Dwarf Cavendish’ foram observados teores de 0,23 e 0,35% no limbo e pecíolo, respectivamente (Lahav & Turner, 1983).

Fox *et al.* (1979), no entanto constataram que o maior teor de S ocorria exatamente no limbo e decrescia com o afastamento deste órgão, ou seja, limbo > nervura central > pecíolo. Segundo Malavolta (1980), os elementos tendem a se mover em direção às regiões mais ativas metabolicamente, como é o caso do limbo foliar.

Um resumo dos sintomas das deficiências dos macroelementos é apresentado por Murray (1960): deficiência de N resulta num aumento no conteúdo de P mas em pouca variação nos níveis de cátions, exceto para o Mg onde há uma redução. Com deficiência de P, há um acúmulo de N e um considerável aumento de K e Ca, mas tem pouco efeito quanto ao Mg. Deficiência de K tende a aumentar o conteúdo de P e Ca, mas tem pouco efeito no Mg. Com deficiência de Ca há um aumento nos níveis de K e Mg. Deficiência de Mg resulta em pouca variação nos níveis de outros nutrientes.

Na bananeira, como em todas as plantas, os micronutrientes controlam muitos processos fisiológicos, intervindo, principalmente, como catalisadores de reações. Apesar de seu papel essencial, poucos trabalhos têm sido realizados sobre as exigências de micronutrientes em bananeira (Medina, 1990). Para Twyford (1967), problemas com micronutrientes certamente tornam-se fatores limitante à produção em muitas áreas com deficiência.

Em algumas situações, sintomas de deficiência de micronutrientes são visíveis nas plantas, mas na maioria das vezes é necessário utilizar análise de folhas ou de outros tecidos para detectar baixos níveis (Twyford & Walmsley, 1968). É difícil definir níveis normais adequados e tentativas têm sido feitas, utilizando plantas saudáveis e vigorosas para desenvolver em condições de deficiência ou excesso de micronutrientes. Segundo Azeredo *et al.* (1986), considerando a grande variabilidade que se obtém, é preferível estabelecer faixas de teores de nutrientes que não são consideradas como limitantes para a planta.

O boro é um elemento cuja concentração geralmente decresce com o aumento da idade da planta, exceto na inflorescência (Twyford & Walmsley, 1968). No estágio inicial, o rizoma tem maior quantidade de B, seguido das folhas e pseudocaule. A medida que a planta cresce, a maior quantidade deste elemento está no pseudocaule, seguido das folhas e rizoma. Na fase de frutificação, o rizoma e os frutos tem igual teor de B. Lahav (1977) encontrou níveis críticos de 8mg/kg em análises de pecíolo de folhas de bananeira das cultivares 'William' e 'Nanica'. Na cultivar 'Dwarf Cavendish', Lahav & Turner (1983) citam os níveis de 11, 10 e 8mg/kg no limbo, nervura e pecíolo respectivamente.

A deficiência de B provoca dificuldade de brotação e deformações morfológicas nas folhas novas. Essas deformações são: limbos estreitos com ondulações nos bordos, as vezes permanece somente a nervura central; necrose nas margens das folhas sem clorose prévia, principalmente na ponta que se encarquilha; clorose internerval e estrias perpendiculares às nervuras secundárias na face inferior e aparecimento de muitos rebentos com os sintomas ainda mais acentuados. Em carência aguda, há paralização do crescimento (Charpentier & Martin-Prével, 1965). A formação de raízes é inibida e em condições de deficiência prolongada resulta em morte da planta (Norton, 1965).

O cobre é necessário em plantas de banana em muito pequenas (Lahav & Turner, 1983). É ativamente absorvido e pode ser translocado através da planta quando o suprimento é adequado (Mengel & Kirkby, 1979).

As folhas, pseudocaule e rizoma, nessa ordem, contém os maiores teores de Cu até o estágio de fruto imaturo. A partir daí, o teor de Cu se eleva no fruto, assemelhando-se ao nível encontrado no rizoma. Finalmente no estágio maduro, o pseudocaule tem maior quantidade de Cu, seguido dos frutos, rizomas e folhas (Twyford & Walmsley, 1968).

O uso frequente de fungicida cúprico, pode levar a toxidez de Cu, cujo sintoma principal se manifesta pela redução do crescimento, principalmente, do sistema radicular. Também, pode aparecer clorose semelhante à deficiência de ferro (Juste, 1970).

Os teores de Cu mostrados na terceira folha na época de floração, nas cultivares ‘Pacovan’, ‘Mysore’, ‘Prata’, ‘Nanica’ e ‘Nanicão’ foram 15mg/kg para as três primeiras e 24 e 17mg/kg para a ‘Nanica’ e ‘Nanicão’, respectivamente (EMBRAPA, 1985). Os níveis médios para as cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’ foram, respectivamente, 9,4 e 8,7mg/kg (Gallo *et al.*, 1974).

Em condições de deficiência de Cu, há o enfraquecimento geral da planta, refletindo-se principalmente na segunda geração. Encurtamento acentuado da nervura central e das pontas das folhas em direção ao pseudocaule, dando a planta a forma de guarda chuva. A clorose é semelhante à provocada por deficiência de N (Carvalho *et al.*, 1986).

A quantidade total de ferro absorvida por uma planta, segundo Walmsley & Twyford (1976), é somente 1g e 80% dessa quantidade é absorvida durante a primeira metade da vida da planta.

O pseudocaule tem maior quantidade de Fe, exceto no estágio inicial, seguindo-se as folhas e rizomas (Twyford & Walmsley, 1968).

Na terceira folha na época de floração, os teores de Fe foram: 139, 135, 153, 173 e 163mg/kg para as cultivares ‘Pacovan’, ‘Mysore’, ‘Prata’, ‘Nanica’ e ‘Nanicão’, respectivamente (EMBRAPA, 1985). Esses níveis são relativamente altos quando comparados à maioria das outras culturas que são em torno de 50-100mg/kg.

A deficiência de ferro resulta em clorose total nas folhas novas que ficam encarquilhadas e lanceoladas e podem cair (Carvalho *et al.*, 1986).

Segundo Dalton *et al.* (1983) no meio MS usado em cultura de tecido, normalmente ocorre a precipitação do Fe quando ineficientemente quelado. Observaram que a maioria dos precipitados se formou após dois dias e que era principalmente fosfato de ferro. Verificaram a perda de 45% do ferro original, 20% do Zn e 13% do fosfato, causando efeitos deletérios no crescimento dos tecidos de *Ocimum basilicum* cultivados em suspensão.

A elevação de uma unidade no pH, faz com que a concentração de Fe caia 1000 vezes, e ainda, altos níveis de P podem diminuir o Fe do meio, por formação de precipitados insolúveis (Bear, 1964).

Para testar o efeito da deficiência de Fe *in vitro*, Dolcet-Sanjuan *et al.* (1990) utilizaram as formas FeEDTA e FeSO₄ com ou sem bicarbonato em quatro espécies de *Pyrus* e verificaram que os sintomas de deficiência eram dependentes do genótipo e mais severos na presença de FeSO₄ (não quelado) e bicarbonato. Não determinaram entretanto, se as diferenças entre os genótipos foi devido a absorção, transporte ou requerimento diferenciado de Fe.

A maior concentração de manganês encontra-se nas folhas, em todos os estágios de desenvolvimento, seguindo-se de concentrações bem mais baixas no pseudocaule e rizoma. A concentração de Mn na folha tende a aumentar com o desenvolvimento da planta até a emissão do rebento e então decresce. No rizoma, a variação é muito pequena e nos pecíolos e pseudocaule há um decréscimo com a idade da planta. A concentração permanece a mesma na inflorescência, decresce no pecíolo do fruto e há grande redução no fruto quando este se aproxima da maturidade (Twyford & Walmsley, 1968).

Os teores de Mn encontrados são muito variáveis para as diferentes cultivares. Dados da EMBRAPA (1985) relatam os níveis de 681, 765, 508, 562 e 357mg/kg nas cultivares 'Pacovan', 'Mysore', 'Prata', 'Nanica' e 'Nanicão', respectivamente, na terceira folha em época de floração. Lahav & Turner (1983), trabalhando com rebentos da cv. 'Dwarf Cavendish', verificaram níveis variando de 25 a 80mg/kg em lâmina foliar, nervura e pecíolo.

Por outro lado, os níveis médios citados por Gallo *et al.* (1974) foram 986 e 611mg/kg para as cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’.

Sob condições de deficiência de Mn ocorre clorose inicialmente nas folhas II, III e IV, depois nas mais novas e nas mais velhas. O amarelecimento começa na margem, podendo persistir uma faixa fina e verde no bordo. A clorose progride para a nervura principal, porém mais rapidamente sobre as nervuras transversais principais, que sobre as transversais secundárias. Os espaços internervais ficam verdes. Os sintomas ganham a totalidade da planta cuja folhagem adquire uma cor amarelo-esverdeada e, quando a carência é grave a produção cai muito (Charpentier & Martin-Prével, 1965).

De acordo com Lahav & Turner (1983), a quantidade de Zn requerida pela bananeira é relativamente pequena, porém é o elemento cuja deficiência é mais amplamente reportada, sendo frequentemente confundida com infecção causada por vírus.

A maior quantidade total de Zn foi encontrada em folhas, pseudocaule e rizomas em todos os estágios de crescimento. Nas folhas, a concentração aumenta com a idade da planta (Twyford & Walmsley, 1968). No pseudocaule, pecíolos e rizomas, as concentrações tendem a cair do estágio inicial até a emissão de rebentos, quando então aumentam substancialmente na maturidade.

Em diferentes partes da planta da cultivar ‘Dwarf Cavendish’, Lahav & Turner (1983) citam os teores de 18 (limbo), 12 (nervura) e 8mg/kg (pecíolo). Para as cultivares ‘Nanicão’, ‘Prata’, ‘Mysore’, ‘Pacovan’ e ‘Nanica’, dados da EMBRAPA (1985) mencionam os níveis de 23, 25, 29, 31 e 36mg/kg na terceira folha na época de floração.

Deficiência de Zn pode causar problemas na diferenciação e no rendimento (Charpentier & Martin-Prével, 1965). A carência inicial caracteriza-se por faixas cloróticas no sentido das nervuras secundárias. Na carência aguda, observa-se clorose na totalidade do limbo das folhas novas que são de menor tamanho, alongadas, pontudas e com tendência a formar rosetas.

Embora em quantidades suficientes, a absorção de alguns nutrientes pode ser impedida por alguns fatores. De acordo com Dalton *et al.* (1983), 20% do Zn é perdido por precipitação. Íons metálicos podem ligar-se na superfície como, por exemplo, a

interação do Zn com o Ca (Klein & Manos, 1960). Algumas vezes deficiência de Zn pode resultar de alta concentração de P como consequência do antagonismo P/Zn (Marchal & Martin-Prével, 1971). Para Malavolta (1980), é clássica na literatura a deficiência de Zn induzida por P e que altos níveis de P no meio causam diminuição na absorção do Zn provocando sintomas de carência, pois o nível do micronutriente na matéria seca fica abaixo do suficiente.

2.2. Micropropagação da bananeira

A utilização da técnica da micropropagação para espécies do gênero *Musa*, é relatada em trabalhos publicados no início da década de 60 por Cox *et al.* (1960) e Mohan Ram & Steward (1964). Diante da importância agrônômica da cultura, poucos trabalhos têm sido feitos, refletindo a dificuldade de utilização da micropropagação, apesar de diversas aplicações no melhoramento genético (Caldas, 1983). Para Shepherd *et al.* (1986), o melhoramento da bananeira tem se beneficiado com a aplicação de técnicas simples de cultura de tecidos, podendo vir a utilizar técnicas *in vitro* mais complexas num futuro próximo, uma vez que alguns avanços têm sido conseguidos.

Diversos autores têm relatado a importância do uso da micropropagação para a cultura da bananeira apresentando as seguintes vantagens: as populações de plantas micropropagadas são em geral mais uniformes; produção de plantas livres de certos parasitas e melhor controle destes (Kwa & Ganry, 1990); multiplicação rápida e em larga escala a partir de um único explante; a propagação pode ser feita durante o ano todo e a disponibilidade de material pode ser programada; facilidade no processo de transferência de germoplasma (Lameira *et al.*, 1990); produção de genótipos livres de enfermidades e com potencial para constituir uma fonte contínua de material juvenil; intercâmbio de germoplasma sadio; potencial de aplicação nos programas de melhoramento genético pela multiplicação rápida de novas cultivares (Lameira *et al.*, 1988); aumento da variabilidade genética, devido esta espécie apresentar esterilidade e partenocarpia (Stover & Buddenhagen, 1986); permite a produção de

grande número de mudas, quando o número de plantas disponíveis é limitado (Vessey & Rivera, 1981).

Com o objetivo de otimizar os protocolos de micropropagação, têm sido estudadas diversas fontes de explantes, meios de cultivo e reguladores do crescimento.

2.2.1. Tipos de explantes

Segundo Grattapaglia & Machado (1990), teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecidos meristemáticos ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência. Gemas apicais as vezes apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares que estão sob o efeito da dominância apical.

A capacidade de produção de brotações e raízes adventícias em segmentos nodais de fumo decresce a medida que se distancia do ápice (Murashige, 1974). Yu & Meredith (1986), por outro lado, observaram em diversas variedades de videira, que a sobrevivência e a multiplicação foram maiores em explantes de gemas laterais do que naqueles isolados de gemas apicais. Em *Rosa hybrida*, Bressan *et al.* (1982) verificaram o melhor desenvolvimento *in vitro* com gemas retiradas da porção média do caule quando comparadas a aquelas localizadas mais próximas e mais distantes do ápice.

O efeito do potencial morfogênético de explantes de bananeira tem sido constatado em diversos trabalhos. Okole & Schulz (1994) observaram que a capacidade de regeneração dos explantes era diretamente relacionada com a proximidade do meristema apical. Swamy *et al.* (1983) mostraram que o cultivo da gema apical propiciava a formação de uma única planta, devido ao efeito da dominância apical. Entretanto, a utilização de explantes contendo gemas laterais podia produzir 20 a 25 propágulos por explante.

Mateille & Foncelle (1988) compararam o crescimento de explantes oriundos de gemas laterais e apicais de bananeira e observaram que em três semanas de cultivo o tamanho das gemas laterais aumentava duas vezes, enquanto que, o das gemas apicais aumentava três vezes.

Segundo Lee *et al.* (1994), para melhorar a qualidade e eficiência da micropropagação, tentativas têm sido feitas para aumentar o número de gemas adventícias induzidas pela decapitação do ápice dos rebentos. Hwang *et al.* (1984) utilizando a mesma técnica, obteve de 5-10 gemas adventícias a partir de cada explante decapitado após 6 a 8 semanas.

Para Grattapaglia & Machado (1990), devido ao reduzido número de gemas apicais disponíveis ou a sua maior susceptibilidade à desinfestação, é freqüente a necessidade de utilizar outros tipos de explantes.

Segundo Hwang *et al.* (1984), a técnica da cultura de meristema para bananeira foi desenvolvida com o objetivo de propagação massal de plantas livres de doenças para plantios comerciais, além de rápida multiplicação de novas cultivares com características agrônômicas superiores (Lee *et al.*, 1994).

Para Cronauer & Krikorian (1985), ápices florais também podem ser utilizados como explantes para produção de plantas livres de vírus e para ajudar em programas de melhoramento. Estes são facilmente revertidos para o estado vegetativo produzindo regenerantes, sem passar pela fase de calo.

Outros tipos de explantes tais como folhas, raízes, etc., também podem ser utilizados. Porém, como já estão num nível mais avançado de diferenciação, há a necessidade de se induzir uma desdiferenciação celular ocorrendo a formação de calo para em seguida iniciar o processo de regeneração indireta e multiplicação. Esta estratégia, além de apresentar dificuldades de regeneração de plantas, demanda mais tempo, em geral, depende da ação de fitorreguladores e pode implicar numa ausência de fidelidade genética ou na ocorrência de desarranjos cromossômicos das plantas clonadas. Portanto, ápices caulinares, gemas axilares e meristemas apicais, são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro*. Eles possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas (Grattapaglia & Machado, 1990).

O tamanho do explante utilizado vai depender do objetivo da micropropagação. Caso pretenda-se eliminar algum microorganismo sistêmico, quanto menor o explante, ou quanto

mais isolado das regiões subjacentes vascularizadas, maior a chance de sucesso (Grattapaglia & Machado, 1990).

Lameira *et al.* (1988) com o objetivo de determinar o efeito do tamanho do explante no desenvolvimento *in vitro* da bananeira, utilizaram os tamanhos de 0,5; 1,0 e 1,5cm³ e verificaram que quanto maior o tamanho do explante, maior o índice de contaminação e menor o número médio de brotações por explantes das cultivares ‘Prata’ e ‘Nanicão’.

2.2.2. Meio de cultura

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no início do cultivo. Não há uma formulação padrão, mas o meio de Murashige & Skoog, 1962 (MS), suas modificações e diluições têm apresentado resultado satisfatório para diversas espécies (Grattapaglia & Machado, 1990).

Segundo Cronauer & Krikorian (1986) em estudos preliminares com cultura de gemas de bananeira deve-se utilizar um meio mais simples possível, que garanta o crescimento dos tecidos. O meio mais comumente utilizado pelos mesmos autores, é a composição básica de sais de Murashige & Skoog (1962), suplementada com meso-inositol (100mg/L), sacarose (4%), tiamina-HCl (1mg/L) e BAP (5mg/L). Afirmam ainda que outros pesquisadores têm usado meios mais complexos para a iniciação e manutenção de cultura de gemas, tais como o de Smith & Murashige (1970) ou adicionando outras substâncias quimicamente indefinidas como água de coco e extrato de malte, que julgam serem desnecessárias.

Normalmente são utilizados os mesmos meios básicos na fase inicial e de multiplicação de gemas (Grattapaglia & Machado, 1990). As variações mais frequentes dizem respeito a composição de macronutrientes. A fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio são aspectos que têm merecido maior atenção.

O crescimento dos tecidos muitas vezes pode ser inibido por alta concentração iônica, níveis elevados da concentração de nitrogênio total, deficiência de cálcio, sensibilidade ao cloreto, qualidade e quantidade utilizada do agente solidificante (MacRae & Staden, 1990).

Considerado de alta concentração iônica, o meio de cultura MS com ou sem modificações, tem sido utilizado para o cultivo *in vitro* de explantes de bananeira, seja no estado semi-sólido (Bakry *et al.*, 1985; Wong, 1986; Matteille & Foncelle, 1988; Aaquine, 1992; Marchal *et al.*, 1992; Gupta, 1986) ou líquido (Cronauer & Krikorian, 1984; Lakshminanth & Nataraja, 1989; Cote *et al.*, 1990; Alvard *et al.*, 1993).

O uso do meio líquido para a micropropagação é descrito como uma forma de reduzir os custos da produção de plantas, incluindo uma redução do período de tempo nas subculturas além de facilitar a troca do meio (Alvard *et al.*, 1993). Além disso, a ausência do agente geleificante pode aumentar a disponibilidade de água e nutriente para o explante (Debergh, 1983). Quando ápices caulinares foram cultivados em meio semi-sólido, Cronauer & Krikorian (1984) verificaram que havia a emissão de apenas uma nova gema com peso médio de 20mg, enquanto que no meio líquido cada explante emitia cerca de 6,6 brotações com peso médio de 2,5g.

No entanto, Cronauer & Krikorian (1985) observaram um lento crescimento de ápices florais de bananeira cultivados em meio líquido. A multiplicação das gemas foi estimulada pela transferência dos tecidos, alternativamente entre meio líquido e semi-sólido na mesma composição com duas semanas de intervalo. O uso do meio líquido envolve o problema da asfixia como resultado de imersão dos explantes. Os métodos preventivos mais comumente utilizados são baseados na imersão parcial, onde materiais absorventes inertes são usados para manter contato entre o meio e a parte inferior do explante (papel de filtro, celulose, etc.).

Alvard *et al.* (1993) na propagação de meristema de banana, utilizaram diferentes métodos de cultura em meios líquidos. Os tratamentos estudados foram: 1. meio semi-sólido; 2. meio líquido com imersão dos explantes; 3. líquido com celulose como suporte; 4. líquido a uma profundidade em que a metade do explante ficava imerso; 5. líquido com aeração através de humidificação por aeração através de um filtro de vidro a 20l/h; 6. líquido com temporária imersão dos explantes por 20 min a cada 2 horas. Após 20 dias de cultura, foram feitas as seguintes observações: a) com pouco ou nenhum desenvolvimento, as gemas imersas em meio líquido ou sobre substrato de celulose; b) a taxa de multiplicação foi de 2,2 a 3,1 para as gemas em meio semi-sólido, sob imersão parcial e no meio líquido com aeração; c) a maior

taxa de multiplicação (> 5), foi observada no meio líquido com imersão temporária dos explantes.

A concentração de sacarose ou outra fonte de açúcar, tem também marcante efeito sobre a multiplicação e o crescimento. Concentrações de 2 a 4% p/v são as mais comuns. Abaixo dessa faixa, pode ocorrer clorose generalizada na cultura e, acima dela, pode-se incorrer em problemas de excessivo potencial osmótico do meio que pode levar a uma deterioração das culturas (Grattapaglia & Machado, 1990).

O tipo de agente geleificante também pode ter influência no desenvolvimento *in vitro*. O ágar, além de afetar o potencial mátrico do meio alterando a disponibilidade de água, de nutrientes e de fitorreguladores, pode mudar a composição química do meio, conforme o teor de impurezas. Por isso, existe hoje a recomendação de especificar nas publicações a marca de ágar utilizado (Grattapaglia & Machado, 1990).

Debergh (1983) observou que a marca e a concentração do ágar afetou as características químicas e físicas do meio de cultura com *Cynara scolymus*. A concentração de alguns nutrientes estava correlacionada com a quantidade de ágar adicionada ao meio devido as impurezas presentes neste produto. Também quanto a solidificação, havia uma variação com relação às diferentes concentrações e marcas na mesma concentração.

Singha *et al.* (1985) observaram que os níveis de nutriente no explante foram influenciados pelo tipo e concentração de ágar. Aumentando a concentração do ágar havia um aumento nos níveis de P, Fe, Zn e Al e uma redução nos níveis de Ca, Mg, e Mn em explantes de *Malus baccata* e *Pyrus communis*. Mostraram ainda, que baixas concentrações de ágar geralmente promoviam o desenvolvimento de gemas, mas a resposta parecia variar com a espécie de planta.

O pH do meio normalmente é ajustado antes da autoclavagem para um valor entre 5,5 e 6,0 e é um aspecto que deve ser considerado por influenciar na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (Grattapaglia & Machado, 1990).

O aquecimento do meio para homogeneização do ágar, causa uma pequena redução no pH, fato observado por Singha (1982) e Skirvin *et al.* (1986).

A autoclavagem do meio provoca uma redução no pH que se traduz por uma atividade química que seria em função da temperatura, do pH inicial, da duração da esterilização e da composição dos elementos minerais (Rédei, 1974; Skirvin *et al.*, 1986).

Williams *et al.* (1990) observaram uma redução de uma unidade no pH do meio com a autoclavagem, exceto para meio com ajuste de pH inicial muito baixo igual ou menor que 4,0. Com pH igual ou abaixo de 5,5 havia um decréscimo para 4,5 a 4,7, enquanto que acima de 5,5 havia um aumento linear.

Com a inoculação dos explantes também há uma redução do pH, sendo dependente do pH inicial e da cultura ou explante utilizado. Com calos de *Cucumis*, Skirvin *et al.* (1986) verificaram uma acidez máxima no meio, no período de até 48 horas após a inoculação.

Para explantes de bananeira, Marchal *et al.* (1992) observaram uma redução mais intensa no pH durante as três primeiras semanas, constatando, após esse período, um ligeiro aumento que seria causado pela absorção de nitratos. A redução no pH nas primeiras semanas após a inoculação seguido de um aumento, foi observada também por Singha *et al.* (1987) no cultivo de *Malus* sp e *Pyrus communis*. Essa acidificação após a inoculação dos explantes, seria causada por uma liberação de íons H^+ pelas plantas devido a uma absorção seletiva de íons, particularmente, de NH_4^+ (Mengel & Kirkby, 1982). Tem sido mostrado, que quando as células das plantas absorvem amônia, um íon H^+ é liberado, contribuindo provavelmente para a redução do pH (Skirvin *et al.*, 1986). De acordo com Dougall¹, citado por Williams (1993), o balanço de NO_3^- e NH_4^+ e a absorção ou excreção diferenciada destes íons pelas plantas, participam na regulação do pH do meio.

Congard *et al.* (1986) no cultivo de *Calluna vulgaris*, encontraram que quando N era fornecido ao meio na forma de amônia, resultava num decréscimo no pH, enquanto que na forma de nitrato causava um aumento e que a absorção mineral pelas raízes tinha influência no pH do meio. Estes autores verificaram que a acidificação começava com a formação das

1 DOUGALL, D.K. Nutrition and metabolism. In: STABA, E.J. (Ed.). “Plant tissue culture as a source of biochemicals”. Boca Raton: CRC Pres, 1980. P.21-58.

raízes primárias e que com a formação das raízes secundárias havia um aumento no pH. Por outro lado, Leva *et al.* (1984) atribuem a redução inicial do pH, no meio de cultura usado na produção de gemas de maçã, a acidificação resultante do acúmulo de CO₂ pela intensa respiração do explante.

Segundo Williams *et al.* (1990) a direção e a extensão da variação do pH está em função do pH inicial e do tipo de ágar utilizado.

Substâncias antioxidantes podem ser adicionadas ao meio, mas conforme sua estabilidade na autoclavagem, devem ser esterilizadas a frio.

Gupta (1986), comparando ácido cítrico, ácido ascórbico e carvão ativo, verificaram que o ácido ascórbico, esterilizado a frio na concentração de 25mg/L, preveniu a oxidação fenólica em meristemas de bananeira. Lameira *et al.* (1988) verificaram que durante a fase de estabelecimento, a presença desse antioxidante no meio de cultura proporcionou menos oxidação fenólica dos explantes que na fase de multiplicação na ausência de antioxidante, quando ocorreu a morte de muitos explantes.

O ácido ascórbico tem sido acrescentado ao meio de cultura para explantes de bananeira em concentrações que variam de 10mg/L (Vuylsteke & DeLanghe, 1985; Banerjee & DeLanghe, 1985) até 100mg/L (Mante & Tepper, 1983).

Para o enraizamento, normalmente são utilizados meios mais diluídos. Altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1990).

Para as diferentes espécies uma alternância de meios mais concentrados na fase de indução e mais diluídos para o alongamento das raízes é uma prática comum (Gupta *et al.*, 1983; Drew, 1988), embora, conforme a espécie, os resultados possam ser exatamente opostos. Diluições excessivas dos macronutrientes podem levar a deficiências minerais na parte aérea enraizada.

2.2.3. Reguladores do crescimento

A adição de reguladores do crescimento tem por objetivo principal, suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz (Grattapaglia & Machado, 1990).

Torna-se indispensável para o sucesso do cultivo *in vitro*, a manipulação, principalmente, de citocininas e auxinas, isoladas ou em combinações, para determinar o desenvolvimento dos tecidos. Segundo Noggle & Fritz (1976), essas substâncias iniciam as reações químicas, mudam a composição química dentro da planta e quando associadas aos fatores ambientais como luz, temperatura, etc., interagem com os processos bioquímicos durante os processos de crescimento e diferenciação.

2.2.3.1. Citocininas

Segundo Letham (1967), a citocinina além de induzir a divisão celular, está relacionada com o transporte, acúmulo e retenção de metabólitos em tecidos e órgãos. Para Helgeson (1968), há evidências de sua ação na indução, promoção ou regulação do DNA, RNA e proteínas.

Weaver (1972) relata que além da divisão celular, a citocinina tem ação importante na regulação da diferenciação em tecidos e sua interação com auxinas tem tornado possível muitos trabalhos com cultura de tecidos.

De acordo com Blakesley (1991), citocininas estimulam a iniciação e o crescimento de brotações *in vitro*. Conseqüentemente, são normalmente adicionadas ao meio de cultura para estimular a produção de gemas axilares ou adventícias.

As citocininas constituem o grupo de fitorreguladores indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. O tipo e a concentração desta substância têm influencia no sucesso da multiplicação *in vitro*. A citocinina, 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz em diversas espécies e parece ser por

excelência, a ideal para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias (Grattapaglia & Machado, 1990).

Segundo Godinho *et al.* (1991), o BAP, uma citocinina sintética ativa, com uma importante função na divisão e diferenciação celular, tem sido amplamente utilizada na propagação *in vitro* da bananeira, adicionada ao meio nutritivo, para o aumento do número de brotações.

Em geral, concentrações entre 0,1 a 5,0mg/L de BAP são usadas para multiplicação rápida. Wong (1986) trabalhando com nove cultivares de bananeira com concentrações de BAP de 0 a 15mg/L, verificou que na ausência de BAP no meio não houve o desenvolvimento de gemas. A multiplicação de gemas foi reduzida na maioria das cultivares em altos níveis de citocinina, exceto para a cultivar 'Mysore' onde a maior emissão de gemas foi observada com 15mg/L de BAP.

Para a cultivar 'Prata', Lameira *et al.* (1990) utilizaram concentrações de 0,0; 2,5; 5,0 e 7,5mg/L de BAP e observaram uma redução no número e comprimento de brotações com concentrações acima de 2,5mg/L.

A concentração de 5,0mg/L de BAP tem permitido a obtenção de consideráveis taxas de multiplicação para as cultivares 'Philippine Lacatan' e 'Grand Naine' (Cronauer & Krikorian, 1984), 'Prata' e 'Nanicão' (Lameira *et al.*, 1988); 'Nanicão' e 'Maçã' (Souza Junior & Calbo, 1988) e 'Prata' (Lameira *et al.*, 1990).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Plantas Cultivadas do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, no período de dezembro de 1995 a abril de 1996.

3.1. Fonte e preparo dos explantes

No experimento, foram utilizados como fonte de explantes, plantas de bananeira (*Musa* sp.) cultivar Prata Anã desenvolvidas *in vitro*, fornecidas pela empresa Campo-Companhia de Promoção Agrícola, com sede em Brasília-DF.

No Laboratório de Fisiologia de Plantas Cultivadas do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, as plantas foram repicadas para o meio de cultura contendo sais minerais de Murashige & Skoog (1962) (MS) e novamente multiplicadas, para obtenção do número de explantes necessários para o experimento e um excedente de reserva para possíveis problemas de contaminações.

Os explantes consistiram de gemas apicais e porção subjacente do rizoma, medindo 1,5cm de comprimento e com uma matéria fresca em torno de 280mg.

3.2. Meio de cultura

Foi utilizado o meio básico MS contendo os macro, micronutrientes e vitaminas, conforme Tabela 1, suplementado com 30g/L de sacarose e 3,5mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP), para facilitar o desenvolvimento da parte aérea e evitar o enraizamento excessivo.

O pH do meio foi ajustado para 5,72, pela adição de ácido clorídrico ou hidróxido de amônio, posteriormente adicionou-se 4g/L de ágar (marca SIGMA) e autoclavou-se a uma temperatura de 120°C, pressão de 1kgf/cm² durante 15 minutos. O meio distribuído em quantidade de 50ml por frasco com capacidade para 250ml.

3.3. Tratamentos

Foram utilizados sete tratamentos representados pelos períodos de: 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias de cultivo dos explantes, no meio básico MS.

Em cada tratamento, foram utilizados diferentes números de explantes, os quais foram determinados em função da massa da matéria fresca (10 a 12g), necessária para obtenção de matéria seca em quantidade suficiente (500mg) para a realização das análises químicas e avaliação dos teores de macro e micronutrientes.

Para cada tratamento, foram utilizadas três repetições com o número de explantes conforme abaixo indicado:

Tratamento:	0 dias	= 40 expl	x	3 repet.	= 120 expl.
	10 “	= 40 “	3 “	= 120 “	
	20 “	= 44 “	3 “	= 132 “	
	30 “	= 36 “	3 “	= 108 “	
	40 “	= 36 “	3 “	= 108 “	
	50 “	= 32 “	3 “	= 96 “	
	60 “	= 32 “	3 “	= 96 “	
Total.....	260...”	780	“		

3.4. Condução do experimento

Os explantes foram isolados assepticamente e inoculados em número de quatro por frasco com 50ml de meio de cultivo. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em câmara de crescimento, a uma temperatura de 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa em torno de 2.000lux.

Tabela 1 - Composição do meio básico de Murashige & Skoog (1962), utilizado no cultivo *in vitro* de explantes de bananeira (*Musa* sp.) cv. Prata anã.

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
	(mg/L)
NH_4NO_3	1.650
KNO_3	1.900
KH_2PO_4	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,3
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9
H_3BO_3	6,2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
KI	0,83
Meso-inositol	100
Tiamina HCl	0,1
Piridoxina HCl	0,5
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	2,0

Para facilitar a condução, cada uma das três repetições foi realizada em período de tempo diferente. Para cada repetição, foram preparados 20% a mais de propágulos e a cada 2 dias foram descartados os frascos contaminados. De acordo com os tratamentos, a cada 10 dias foram observadas as características visuais e retirados ao acaso, os frascos com os propágulos necessários para avaliar os parâmetros indicados no item a seguir.

3.5. Parâmetros avaliados

Em todos os tratamentos foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a. altura das plantas:* foi medida da base inferior ao ápice da folha mais alta de cada propágulo e obtida a média para cada tratamento;
- b. número de folhas:* foi determinado o número médio de folhas emitidas por propágulo;
- c. número de gemas:* foram enumerados o número de propágulos que emitiram novas gemas e o número de gemas emitidas por propágulo;
- d. número de raízes:* foram contados o número de propágulos que emitiram raízes e o número de raízes emitidas por propágulo;
- e. massa da matéria fresca:* em todos os tratamentos, imediatamente após a coleta do propágulo, foi retirado o meio aderido as raízes, separados o rizoma (incluindo raízes), pseudocaule e folhas, pesando-se cada um separadamente, com exceção do tratamento aos 10 dias de cultivo que foi separado em duas partes: rizoma e parte aérea, por ter pouca diferenciação de folhas; a massa da matéria fresca total do propágulo foi obtido pela soma das massas das três partes das plantas;
- f. massa da matéria seca:* após a tomada da massa matéria fresca, o material foi colocado para secagem a 60°C até peso constante, ocasião em que foi anotada a massa da matéria seca;
- g. pH do meio de cultivo:* o pH foi medido em várias ocasiões durante o preparo do meio básico MS: a) após o preparo da solução nutritiva, após a adição do ágar, após o aquecimento com o ágar e após a esterilização em autoclave; b) diariamente até os

10 dias com e sem propágulos e c) em períodos de 10 dias até os 60 dias com e sem propágulos;

- h. teores de nutrientes:** foram determinados na matéria seca das diferentes partes dos propágulos, os teores totais dos macronutrientes: N, P, K, Ca, Mg e S e dos micronutrientes: B, Cu, Fe, Mn e Zn. As concentrações dos nutrientes nos propágulos inteiros foram obtidas pela média ponderada das concentrações e da produção de matéria seca das diferentes partes dos propágulos. Os mesmos nutrientes, também, foram determinados no meio de cultivo antes da inoculação dos explantes;
- i. nutrientes extraídos:** foram calculados a partir da concentração de nutrientes e da produção de matéria seca, para cada uma das partes avaliadas nas plantas. Os nutrientes remanescentes no meio de cultivo, para cada tratamento, foram estimados pela diferença entre os nutrientes no meio antes da inoculação, menos os nutrientes extraídos pelas plantas;
- j. crescimento relativo:** foram calculados os incrementos de crescimento relativo para períodos de 10 dias, para a massa de matéria fresca (Δm_{mf}) e para a massa de matéria seca (Δm_{ms}), através da fórmula:

$$\Delta m_{mf} \text{ ou } \Delta m_{ms} = (P_t2 - P_t1 / P_t1) \times 100,$$

onde, P é a massa da matéria fresca ou seca produzida no tempo de cultivo t_i , sendo que $t_2 - t_1$ é igual a 10 dias.

3.6. Análise química dos explantes e propágulos

Na matéria seca dos explantes e propágulos, foram determinados os teores de nutrientes usando-se os seguintes métodos: em extrato de digestão sulfúrica, o teor de N total através do método semimicro-Kjeldahl. Em extrato nítrico-perclórico, foi determinado o fósforo pelo método colorimétrico do metavanadato; o potássio e o sódio por fotometria de chama; o enxofre por turbidimetria; o cálcio, magnésio, zinco, ferro, manganês e cobre, por espectrofotometria de absorção atômica (Malavolta *et al.*, 1989) e o boro pelo método colorimétrico do Azomethine-H (Wolf, 1974).

3.7. Delineamento estatístico

Todos os parâmetros avaliados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado para sete tratamentos com três repetições e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando um “Programa para microcomputadores para delineamento, manejo e análises de experimentos em pesquisas agronômicas - MSTAT-C” desenvolvido na “Michigan State University”.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Massa dos explantes e propágulos

Os dados de massa da matéria fresca (mmf), massa da matéria seca (mms) e a relação mmf/mms dos propágulos de bananeira, coletados a cada 10 dias até os 60 dias, encontram-se na tabela 2.

A massa da matéria fresca e seca dos propágulos inteiros aumentaram com o tempo de cultivo. Em ambas, as médias apresentaram diferença estatística significativa até os 40 dias, a partir dos quais, embora continuassem aumentando, não foram observadas diferenças (Tabela 2). Quando foram calculados os incrementos relativos da massa da matéria fresca e seca dos propágulos inteiros em períodos de 10 dias (Figuras 1 e 2), os maiores incrementos ocorreram nos primeiros 10 dias, os quais se reduziram em períodos subsequentes.

As massas da matéria fresca e seca das diferentes partes dos propágulos seguiram uma tendência de crescimento similar ao propágulo inteiro. No entanto, foram observadas diferenças nos períodos em que atingiram o máximo incremento relativo de massa, a partir do qual houve uma redução na percentagem de massa acumulada em função do tempo. O rizoma apresentou o máximo incremento relativo nos primeiros 10 dias, o pseudocaule entre 20 e 30 dias e as folhas entre 30 e 40 dias (Figuras 1 e 2). O rizoma foi a parte do propágulo que apresentou maiores médias da mmf e mms, que diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, das médias de mms do pseudocaule e folhas que não diferiram entre si durante os 60 dias de cultivo.

A maior quantidade de mmf e mms no pseudocaule verificada aos 10 dias em relação aos 20 dias, deve-se a que nesse período, as folhas e o pseudocaule, foram

Tabela 2. Massa da matéria fresca, massa da matéria seca e relação massa da matéria seca/massa da matéria fresca no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, durante o cultivo *in vitro* (média de 3 repetições).

	TEMPO (dias)						
	0	10	20	30	40	50	60
Massa da matéria fresca (mg/propágulo)							
Propágulo inteiro	279,7d	816,4c	1.071,6b	1.193,5b	1.432,6a	1.530,5a	1.622,4a
rizoma	279,7d	361,7cdA	396,5cdA	418,7bcdAB	484,0bcAB	575,9abA	646,4aA
pseudocaule	0,0	454,7bA	386,7cA	461,5bA	542,2aA	537,2aAB	510,4aB
folhas	0,0	0,0	288,4cA	313,3bcB	406,4abB	417,4aB	465,6aB
Massa da matéria seca (mg/propágulo)							
Propágulo inteiro	15,8e	44,1d	63,4c	79,9c	98,3b	119,6a	132,9a
rizoma	15,8e	26,1deA	30,9cdA	36,5cdA	43,6bcA	57,1abA	64,3aA
pseudocaule	0,0	18,0bcB	16,3cB	22,9bB	28,3aB	30,7aB	31,1aB
folhas	0,0	0,0	16,2dB	20,5cdB	26,4bcB	31,8abB	37,5aB
Massa da matéria seca/massa da matéria fresca (x100)							
Propágulo inteiro	5,72e	5,93de	6,33cde	7,09bcd	7,23bc	8,23ab	8,53a
rizoma	5,72c	7,30bA	7,80bA	8,73abA	9,01abA	9,91aA	9,99aA
pseudocaule	0,0	3,96cB	4,21cB	4,97bcB	5,22bcB	5,72abB	6,10aB
folhas	0,0	0,0	5,61cB	6,53bB	6,52bB	7,62aB	8,03aB

* Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e de mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Figura 1 Incrementos relativos da massa da matéria fresca (Δmmf) no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, em períodos de 10 dias, durante 60 dias de cultivo *in vitro*.

Figura 2 Incrementos relativos da massa da matéria seca (Δmms) no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, em períodos de 10 dias, durante 60 dias de cultivo *in vitro*.

avaliados juntos devido ao pouco crescimento (Tabela 2). O maior crescimento do pseudocaule ocorreu até 30 dias (Figuras 1 e 2), havendo um menor aumento do mmf e mms a partir dessa data, indicando uma redução na absorção causada provavelmente, por uma deficiência de água e nutrientes, no meio de cultura a partir dos 40 dias de cultivo

A relação mms/mmf, tanto do propágulo inteiro quanto das diferentes partes destes (Tabela 2), continuou aumentando até os 60 dias. No rizoma, a relação mms/mmf teve aumentos significativos até os 30 dias, com menores aumentos a partir daí e mostrando diferença das outras partes dos propágulos durante os 60 dias. No pseudocaule, a relação mms/mmf teve aumentos mais ou menos constantes até os 40 dias e maiores a partir dessa data. Nas folhas, a relação foi maior a partir dos 50 dias, indicando um maior acúmulo de solutos provavelmente, pela maior área foliar nesse período. Esse aumento de mms em relação ao mmf foi verificado também por Mezzetti *et al.*, (1991) em folhas de *Actinidia deliciosa*, dos 45 aos 60 dias.

As diferenças observadas nos períodos máximos de crescimento das diferentes partes dos propágulos, são devido a que o rizoma se encontra diretamente em contato com o meio de cultivo, rico em água e nutrientes, sendo o local que, inicialmente acumula consideráveis quantidades de nutrientes, para posterior transferência para o pseudocaule e deste para as folhas. O decréscimo de crescimento relativo, verificado no mms do pseudocaule (Figura 2), é explicado pela transferência de nutrientes para as folhas e por um declínio na absorção mineral total, pelo esgotamento do meio de cultura. Assim, apesar de ter menor mmf que o pseudocaule durante todo o período de cultivo, as folhas apresentaram proporcionalmente maior aumento de mms em decorrência do acúmulo de solutos como consequência do aumento do tempo de cultivo e provavelmente da área foliar (Tabela 2). Resultados similares foram observados por Williamms (1993), que encontrou uma redução no crescimento, em propágulos de *Ptilotus exaltatus*, após seis semanas de cultivo, atribuindo o fim da fase rápida de crescimento, à redução na absorção de P indicando-o como um fator limitante do crescimento.

4.2 . Altura, número de folhas, gemas e raízes por propágulo.

A altura média e o número de folhas por propágulo em função do tempo, são mostrados na figura 3 e as percentagens de propágulos que emitiram gemas e raízes na figura 4, onde também são indicadas as equações que relacionam esses parâmetros com o tempo de cultivo.

No crescimento em altura, foram observadas duas fases representadas na figura 3, por duas linhas de diferentes declividades. A linha de maior declividade, representa a fase de crescimento rápido verificada nos primeiros 10 dias de cultivo, onde a altura foi aproximadamente quatro vezes o tamanho inicial do propágulo (de 1,5 para 5,8cm). A linha de menor declividade, mostra a fase de crescimento lento observada após os primeiros 10 dias de cultivo, onde os aumentos médios em altura foram constantes e em torno de 0,3cm para cada período de 10 dias até os 60 dias de cultivo.

O número médio de folhas emitidas por propágulo, foi maior nos primeiros 30 dias, chegando a aproximadamente 4 folhas por propágulo, diminuindo sensivelmente entre 30 e 60 dias, período em que foi emitida em média uma folha/propágulo. Quando se relacionou o número de folhas com o tempo de cultivo, verificou-se que estes parâmetros apresentaram alta correlação, seguindo a equação quadrática $Y = -0,0015x^2 + 0,1716x + 0,1447$, cujo alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9924$), indica que o número de folhas pode ser estimado pela mesma, com bastante precisão (Figura 3).

A emissão de gemas foi observada somente a partir dos 20 dias e seu número aumentou até os 30 dias, quando a percentagem de propágulos com gemas foi em torno de 17%, permanecendo constante até os 60 dias (Figura 4). O número de gemas emitidas pelos propágulos variou entre 1 e 4, e o número médio de gemas emitidas por propágulo foi de 1,33.

Figura 3 Altura e número médio de folhas em função do tempo de cultivo, em propágulos de bananeira, cv Prata anã.

Figura 4. Percentagem de propágulos de bananeira, cv. Prata anã, com gemas e raízes em função do tempo de cultivo.

Quanto às raízes emitidas (Figura 4), verificou-se que nos primeiros 30 dias, menos de 10% dos propágulos emitiram raízes, enquanto que dos 30 aos 60 dias, essa porcentagem aumentou para mais de 60%. O número de raízes emitidas por propágulos variou entre 1 e 5 e o número médio foi de 1,46 por propágulo.

Do observado acima, pode-se sugerir que o melhor período para a repicagem fica em torno dos 30 dias, quando as plantas apresentaram um bom crescimento em altura, no número de folhas e gemas (parâmetros importantes na multiplicação), e pequeno número de raízes, que não são desejáveis na fase de multiplicação, e sim no período de aclimação.

4.3. pH

As variações da reação do meio de cultivo, medidas através do pH, nas diferentes etapas de seu preparo, são apresentadas na figura 5, e o efeito dos propágulos de bananeira no pH do meio de cultivo, na figura 6.

O pH do meio de cultura sofre algumas alterações durante sua manipulação, pelo efeito da adição do ágar, do aquecimento para homogeneização e da esterilização em autoclave. Assim, o pH da solução nutritiva inicialmente ajustado para 5.72, sofreu um aumento para 5.95 pela adição do ágar, reduzindo ligeiramente a acidez do meio. Com o aquecimento do meio contendo o ágar, houve uma pequena redução do pH de 5.95 para 5.86 (Figura 5). Este resultado, também foi observado por Singha (1982) e Skirvin *et al.* (1986). Segundo Williamms *et al.* (1990), esses aumentos são mais significativos quando o pH inicial é ajustado para 5.5 ou menos, porém tem pouco efeito para pH acima dessa faixa.

Quando o meio foi autoclavado, o pH caiu de 5.86 para 5.61. De acordo com Skirvin *et al.* (1986), o grau de variação pelo efeito da esterilização em autoclave, depende do pH inicial e essa variação ocorre, principalmente, dentro da faixa mais usada no cultivo *in vitro* (5.60 a 5.80). Williamms *et al.* (1990) verificaram que com a esterilização em autoclave de vários meios com pH inicial diferentes, havia um decréscimo de uma unidade, exceto para pH muito baixos (< 4.0). Quando o pH inicial

Figura 5 Variação do pH do meio básico de cultivo de Murashige & Skoog (1962), durante o preparo.

Figura 6 Variação do pH do meio de cultivo em função do tempo, sem propágulos e com propágulos de bananeira cv. Prata anã, de 0 - 10 dias (a) e de 0 - 60 dias (b).

era menor ou igual a 5.0, o pH final ficava em torno de 4.5 a 4.7 e aumentava linearmente para pH inicial > 5.5.

Após o preparo do meio de cultivo, o pH foi modificado ao longo do tempo com e sem inoculação de propágulos. Na ausência do propágulo, houve uma pequena redução no pH durante os 60 dias, fato também verificado por Williamms *et al.* (1990) e Mezzetti *et al.* (1991). Quando os propágulos foram inoculados houve uma rápida mudança no pH durante os primeiros 4 dias, quando caiu de 5.61 para 4.18 (Figura 6a). A partir dos 4 dias até os 60 dias, o pH permaneceu estável em torno de 4.0 com pequenas oscilações (Figura 6b). ~~Estes resultados confirmam o encontrado~~ por Skirvin *et al.* (1986) e Williamms *et al.* (1990), que indicam que após a inoculação dos propágulos, há uma rápida alteração no pH do meio até alcançar um equilíbrio, que depende do tipo de propágulo e do tipo de ágar usado e que, independentemente do pH inicial, no equilíbrio, fica em torno de 4.0.

A redução do pH até a obtenção do equilíbrio é atribuída a diferentes causas que envolvem a atividade metabólica, no início do desenvolvimento dos propágulos em contato com o meio. Entre as quais, são consideradas reações de troca de íons entre o propágulo e o meio de cultivo (Williamms, 1993). De acordo com Dougall¹ citado por Williamms (1993), o balanço de NO_3^- e NH_4^+ e a absorção ou excreção diferenciada destes íons pelas plantas, participam na regulação do pH do meio. Quando as plantas absorvem íons NH_4^+ , um íon H^+ é liberado, contribuindo para a redução do pH (Skirvin *et al.*, 1986). Desta forma, a rápida redução do pH observado nos primeiros dias de cultivo, pode ser causada pela intensa e preferencial absorção de NH_4^+ que ocorre no início do cultivo, até sua completa utilização, quando o propágulo passa, então a absorver maiores quantidades de NO_3^- , que podem provocar elevação do pH em períodos prolongados de cultivo (Singha *et al.*, 1987; Mezzetti *et al.*, 1991). Williamms *et al.* (1990) consideram como possível mecanismo de regulação do pH do meio, a absorção diferencial de K^+ com

1 DOUGALL, D.K. Nutrition and metabolism. In: STABA, E.J. (Ed.) **“Plant tissue culture as a source of biochemicals”**. Boca Raton: CRC Pres, p.21-58.

a correspondente liberação de H^+ . Por outro lado, Leva *et al.* (1984) atribuem a redução inicial do pH, no meio de cultura usado na produção de gemas de maçã, a acidificação resultante do acúmulo de CO_2 pela intensa respiração do propágulo.

4.4. Macronutrientes

As concentrações dos macronutrientes nos propágulos, inteiros e nas diferentes partes destes, as quantidades de nutrientes contidas no meio de cultura e extraída pelos propágulos de bananeira e a percentagem de nutrientes remanescente no meio de cultura durante o período de cultivo, encontram-se nas tabelas 3, 4 e 5 respectivamente.

4.4.1 . Nitrogênio

O teor de nitrogênio nos propágulos inteiros durante os 60 dias de cultivo, variou entre 3,81 e 5,23%, verificando-se a maior concentração nos primeiros 10 dias, a partir do qual houve uma redução em função do tempo (Tabela 3).

A alta concentração de N verificada nos explantes por ocasião da inoculação, é explicada pela “limpeza” a que estes foram submetidos, retirando-se a parte seca ou morta do rizoma e da parte aérea, ficando somente a parte mais tenra e pela utilização de propágulos de aproximadamente 30 dias de idade, com altos teores de nutrientes.

Comparando-se as diferentes partes dos propágulos, verifica-se que o rizoma e o pseudocaule apresentaram concentrações de N similares com valores entre 3,92 e 5,39% durante os 60 dias de cultivo, não havendo diferença entre ambos, nos mesmos períodos de tempo. Nas folhas, a concentração de N foi inferior a do rizoma e do pseudocaule, com teores que variaram de 4,24% (aos 20 dias) a 3,45% (aos 60 dias), apresentando diferença somente nos primeiros 30 dias.

As folhas apresentaram uma concentração maior que a encontrada em plantas adultas de várias cultivares de bananeira, entre 3,01 a 3,68% na terceira folha em época

Tabela 3. Concentração de macronutrientes no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, durante o cultivo *in vitro* (média de 3 repetições).

		TEMPO (dias)						
		0	10	20	30	40	50	60
		Nitrogênio (%)						
Propágulo inteiro		5,23a	5,15ab	4,86abc	4,52bcd	4,22cde	4,02de	3,81e
	rizoma	5,23a	5,39aA	5,10abA	4,70abcA	4,44abcA	4,18bcA	3,92cA
	pseudocaule	0,0	4,78abA	5,04aA	4,86aA	4,38abcAB	4,11bcA	4,01cA
	folhas	0,0	0,0	4,24aB	3,82bB	3,64bcB	3,64bcA	3,45cA
		Fósforo (%)						
Propágulo inteiro		0,51bcd	0,63a	0,61ab	0,55abc	0,47cde	0,43de	0,38e
	rizoma	0,51a	0,47aB	0,46aB	0,40abB	0,31bcB	0,30bcB	0,27cB
	pseudocaule	0,0	0,87aA	0,70bA	0,64bcA	0,56bcA	0,54bcA	0,49cA
	folhas	0,0	0,0	0,81aA	0,70abA	0,62bcA	0,56bcA	0,49cA
		Potássio (%)						
Propágulo inteiro		5,15cde	5,95ab	6,18a	5,69abc	5,41bcd	4,94de	4,69e
	rizoma	5,15a	4,46aB	5,15aB	4,81aB	4,41aB	4,22aB	4,04aB
	pseudocaule	0,0	8,12aA	7,72abA	7,11bcA	6,83cA	6,28cdA	5,84dA
	folhas	0,0	0,0	6,65aA	5,68bB	5,50bcB	4,93bcB	4,85cAB
		Cálcio (%)						
Propágulo inteiro		0,54a	0,61a	0,60a	0,55a	0,54a	0,54a	0,56a
	rizoma	0,54b	0,71aA	0,79aA	0,76aA	0,74aA	0,73aA	0,75aA
	pseudocaule	0,0	0,45bB	0,64aA	0,54abB	0,53abB	0,50abB	0,53abB
	folhas	0,0	0,0	0,17aB	0,19aC	0,23aC	0,22aC	0,28aC
		Magnésio (%)						
Propágulo inteiro		0,33a	0,34a	0,35a	0,33a	0,32a	0,28a	0,26a
	rizoma	0,33abc	0,34abcA	0,43aA	0,41abA	0,37abcA	0,31bcA	0,30cA
	pseudocaule	0,0	0,33aA	0,30aB	0,28aB	0,27aAB	0,25aA	0,25aA
	folhas	0,0	0,0	0,28aB	0,26aB	0,26aB	0,23aA	0,22aA
		Enxofre (%)						
Propágulo inteiro		0,48a	0,41ab	0,39abc	0,32bcd	0,30bcd	0,29cd	0,25d
	rizoma	0,48a	0,43abA	0,47aA	0,44abA	0,39abA	0,37abA	0,31bA
	pseudocaule	0,0	0,37aA	0,29abB	0,22bB	0,22bB	0,22bB	0,20bA
	folhas	0,0	0,0	0,31aB	0,23aB	0,23aB	0,20aB	0,20aA

* Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e de mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 4 Extração de macronutrientes do meio de cultura pelo rizoma, pseudocaule, folhas e pelos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã e nutrientes remanescentes no meio durante o cultivo *in vitro* (média de 3 repetições).

	TEMPO (dias)						
	0	10	20	30	40	50	60
Nitrogênio ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	5.460,0	4.039,0	3.226,8	2.701,0	2.166,9	1.507,1	1.250,4
Propágulo inteiro	824,2f	2.271,2e	3.083,4d	3.609,2cd	4.143,3bc	4.803,1ab	5.059,8a
rizoma	824,2d	1.407,9cdA	1.578,7cdA	1.712,9bcA	1.943,0abcA	2.382,6abA	2.519,2aA
pseudocaule	0,0	863,4bcB	819,2cB	1.113,6abB	1.241,8aB	1.261,8aB	1.248,6aB
folhas	0,0	0,0	685,4dB	782,7cdB	958,6bcB	1.158,7abB	1.292,0aB
Fósforo ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	477,4	279,3	172,0	121,2	101,8	43,1	46,1
Propágulo inteiro	80,4d	278,5c	385,8b	436,6b	456,0ab	514,7a	511,7a
rizoma	80,4b	122,1abA	142,6abA	147,1abA	136,8abA	171,5aA	173,8aA
pseudocaule	0,0	156,5aA	113,3aA	146,6aA	159,2aA	166,4aA	154,3aA
folhas	0,0	0,0	129,9bA	142,9abA	159,9abA	176,9abA	183,6aA
Potássio ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	9.220,9	7.401,3	6.110,1	5.481,8	4.734,0	4.129,8	3.806,0
Propágulo inteiro	806,8f	2.626,4e	3.917,6d	4.545,9cd	5.293,7bc	5.897,9ab	6.221,7a
rizoma	806,8d	1.173,1cdA	1.593,2bcdA	1.755,5abcdA	1.930,1abcA	2.404,7abA	2.598,6aA
pseudocaule	0,0	1.453,3bcA	1.251,3cA	1.631,3abA	1.931,3aA	1.926,5aAB	1.812,4aB
folhas	0,0	0,0	1.073,4cA	1.159,0bcA	1.432,4abcA	1.566,8abB	1.810,7aB
Cálcio ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	1.299,8	1.117,0	1.008,0	945,1	851,4	745,5	636,2
Propágulo inteiro	85,2f	268,0e	377,0de	439,9cd	533,6bc	639,5ab	748,8a
rizoma	85,2e	186,7deA	245,5cdA	277,7cdA	324,2bcA	418,1abA	482,2aA
pseudocaule	0,0	81,3dB	105,0cdB	123,4bcB	149,3abB	153,4abB	165,1aB
folhas	0,0	0,0	26,6dB	39,2cdB	60,1bcB	68,0bB	101,5aB
Magnésio ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	621,2	523,5	447,7	407,8	365,8	344,1	323,0
Propágulo inteiro	52,3e	150,0d	225,8c	265,7bc	307,7ab	329,4a	350,5a
rizoma	52,3c	89,9bcA	131,8abA	149,9abA	162,9aA	178,6aA	190,7aA
pseudocaule	0,0	60,1abA	48,3bB	63,4abB	76,7aB	76,7aB	78,0aB
folhas	0,0	0,0	45,7cB	52,5bcB	68,0abB	74,1aB	81,8aB
Enxofre ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	769,8	665,7	603,1	589,1	549,9	500,0	510,4
Propágulo inteiro	75,0e	179,1d	243,5cd	255,7bcd	294,9abc	344,8a	334,4ab
rizoma	75,0c	112,1bcA	146,5abcA	158,5abcA	171,6abA	214,3aA	197,3abA
pseudocaule	0,0	67,0aB	48,0aB	50,2aB	63,2aB	67,2aB	63,0aB
folhas	0,0	0,0	49,0bB	47,0bB	60,1abB	63,3abB	74,1aB

- Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e de mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Percentagem de macronutrientes remanescentes no meio básico MS em função do tempo de cultivo de propágulos de bananeira, cv. Prata anã, e a contribuição em relação ao meio, dos propágulos iniciais.

TEMPO		NUTRIENTES					
		N	P	K	Ca	Mg	S
(dias)		%					
Propágulo inoculado	0	15,02	16,84	8,75	6,55	8,41	9,74
Meio de cultivo	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
“ “ “	10	73,62	58,49	80,27	85,94	84,27	86,47
“ “ “	20	58,82	36,03	66,26	77,54	72,06	78,11
“ “ “	30	49,23	25,39	59,45	72,71	65,65	76,53
“ “ “	40	39,50	21,34	51,34	65,50	58,88	71,43
“ “ “	50	27,47	9,03	44,79	57,35	55,40	64,95
“ “ “	60	22,79	9,66	41,28	48,94	52,00	66,30

Figura 7. Distribuição percentual de nitrogênio (a), fósforo (b) e potássio (c) no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos de bananeira, cv. Prata anã.

de floração (Embrapa, 1985) e o nível de 2,60% considerado adequado para as cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’ (Gallo *et al.*, 1974).

Quando estimada a taxa de absorção de nitrogênio pela diferença entre o N inicial no meio e o remanescente em cada período, verificou-se que essa taxa se reduziu com o tempo de cultivo. Isto resultou em aumentos decrescentes nas quantidades de N extraídas pelos propágulos, principalmente, nos períodos iniciais de cultivo (Tabela 4).

Os altos teores encontrados nos propágulos, são explicados porque os tecidos jovens possuem maior concentração de nitrogênio, e os propágulos têm a sua disposição, no meio de cultura, grande quantidade deste nutriente. De acordo com a tabela 5, aos 60 dias de cultivo ainda permanecia 22,79% de N remanescente no meio de cultivo, indicando que o nitrogênio não foi limitante do crescimento dos propágulos durante o período do experimento.

Deve-se salientar, que a análise do meio de cultivo utilizado, antes da inoculação dos propágulos, apresentou 52% (436,8mg/L ou 5.460µg/expl) do nitrogênio do meio básico MS (840,5mg/L ou 10.506µg/expl), calculado a partir de reagentes 100% puros. Essa menor quantidade de N verificada, pode ter sido causada por perdas durante as diferentes etapas do preparo, principalmente, no aquecimento ou na autoclavagem, assim como a erros de pesagem devido a hidratação dos sais utilizados, os quais precisam ser pesquisados. Para os outros nutrientes, as concentrações analisadas apresentaram valores próximos aos calculados, com exceção do Cu, cuja concentração foi bem maior que a calculada, provavelmente por impurezas presentes nos reagentes.

A maior taxa de absorção de nitrogênio nos primeiros períodos de cultivo, que coincide também com o maior crescimento dos tecidos, provavelmente foi causada pela absorção intensa de cátions, principalmente de NH_4^+ pelos propágulos, nesses períodos, que após seu esgotamento passam a absorver NO_3^- (Desamero *et al.*, 1993; Mezzetti *et al.*, 1991). Segundo Gautheret (1955), o ion NH_4^+ é menos tóxico, mas seu valor nutritivo é bem mais baixo que do NO_3^- .

Quanto às diferentes partes dos propágulos, o rizoma foi a que extraiu maior quantidade de N, apresentando diferença estatística significativa do pseudocaule e folhas durante todo o período de cultivo (Tabela 4). As folhas foi a parte do propágulo que

extraiu a menor quantidade de N, porém não apresentou diferença significativa das quantidades extraídas pelo pseudocaule. Estes resultados são ilustrados na figura 7a, que mostra a distribuição percentual do nitrogênio no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos em função do tempo.

4.4.2. Fósforo

Durante o cultivo *in vitro*, as concentrações de P na mms variaram entre 0,38 e 0,63% nos propágulos inteiros, entre 0,27 e 0,51% no rizoma, entre 0,49 e 0,87% no pseudocaule e entre 0,49 e 0,81% nas folhas. As diferenças estatísticas entre os teores médios de P nos propágulos e nas diferentes partes destes, nos diferentes tempos de cultivo, podem ser observadas na tabela 3.

De modo geral, a concentração de P nos propágulos inteiros e nas diferentes partes da planta foram mais altas nos primeiros dias de cultivo, observando-se uma redução de seus teores com o tempo. Essas reduções são explicadas pela diminuição da absorção líquida de P e ao consequente efeito de diluição pelo crescimento dos propágulos (Williamms, 1993).

Diferentemente do N, o P apresentou uma ordem inversa, com maior concentração nas folhas > pseudocaule > rizoma. No entanto, as concentrações de P no pseudocaule e folhas foram estatisticamente similares, e ambas se diferenciaram das concentrações encontradas no rizoma, que foram bem mais baixas durante todo o período de cultivo.

Os teores de P dos propágulos apresentaram valores superiores as concentrações médias e níveis críticos encontrados em tecidos de plantas adultas, de diversas cultivares de bananeira. Nas plantas adultas os teores de P variam amplamente, havendo sido reportados níveis críticos como 0,07% no pecíolo de folhas em estágio de filhote da cultivar ‘Dwarf Cavendish’ (Lahav & Turner, 1983), até teores elevados como 0,56% encontrados em limbo foliar de planta adulta da cultivar ‘Pacovan’, adubadas com

Figura 8. Variação da relação N/P no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo *in vitro* de bananeira, cv. Prata anã.

Figura 9. Variação da relação N/K no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo *in vitro* de bananeira, cv. Prata anã.

altas doses de NPK (Neves *et al.*, 1991). Gallo *et al.*, (1974), citam teores médios de 0,215 e 0,233% de P nas folhas de bananeira das cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’ respectivamente, considerando críticos quando eram menores que 0,087% e níveis adequados com 0,196%. Para a cultivar ‘Nanicão’, Hernandez *et al.* (1985), encontraram níveis de P oscilando de 0,09 a 0,32% em folhas, pecíolos e rizomas. Dados da Embrapa (1985), mostram que na terceira folha em época de floração, os níveis de P encontrados foram de 0,16% nas cultivares ‘Prata’, ‘Pacovan’ e ‘Mysore’, e, 0,18 e 0,20% nas cultivares ‘Nanicão’ e ‘Nanica’, respectivamente.

Apesar dos altos teores de P verificados nos propágulos, quando comparados com os de plantas adultas, a análise da relação N/P (Figura 8) sugere que a deficiência de P pode ter contribuído, pelos menos em parte, para a limitação do crescimento dos propágulos após 30 dias de cultivo. A figura 8 mostra que a relação N/P no rizoma se eleva sensivelmente a partir dos 30 dias, pela menor taxa de absorção de P do meio de cultivo e pela sua redistribuição para o pseudocaule e folhas, por se tratar de um elemento móvel dentro da planta. No mesmo período, foi observada clorose marginal nas folhas mais velhas, enrolamento e cor verde intensa com reflexos azulados em folhas novas, sintomas visuais atribuídos a deficiência de P (Lahav & Turner, 1983).

Por outro lado, também foi verificada a maior taxa de absorção de P nos períodos iniciais de crescimento, chegando a extrair 75% do P presente no meio de cultivo, aos 30 dias, e a cessar a absorção aos 50 dias, quando ainda permanecia 9% do P no meio (Tabelas 4 e 5). A distribuição percentual do P envolvido no sistema meio de cultivo-propágulo, é ilustrado na figura 7b. A pequena quantidade de P presente no meio ao fim do cultivo, provavelmente não estava disponível para o propágulo devido a interação com outros sais, macro e microelementos remanescentes, em excesso no meio (Mezzetti *et al.*, 1991), além do que, o baixo pH de equilíbrio (4.0), poderia reduzir a solubilidade do P e afetar a taxa de difusão de íons H_2PO_4^- , do meio para a planta, ainda que o teor no meio fosse suficiente (Williamms, 1993).

A rapidez de absorção de P nos primeiros dias de cultivo e as limitações no desenvolvimento de propágulos *in vitro* pela deficiência de P, também tem sido reportadas por diversos pesquisadores em outras culturas. MacCarthy *et al.* (1980), no

cultivo de *Catharanthus roseus*, indicam que cerca de 50% do suprimento de P era consumido aos 6 dias, apresentando deficiência completa aos 10 dias. No cultivo da maçã, Barroso *et al.* (1985) encontraram o limite de deficiência de P aos 45 dias de cultivo e, Singha *et al.* (1987) verificaram que após 6 semanas, aproximadamente, 50% do P inicial havia sido removido do meio com *Malus* sp. E *Pyrus communis*. Trabalhando com *Actinidia deliciosa*, Mezzetti *et al.* (1991) observaram que aos 30 dias apenas 5,5% do P inicial permanecia no meio de cultura.

4.4.3. Potássio

Os teores de potássio na matéria seca estiveram compreendidos entre 4,69 e 6,18% no propágulo inteiro, 4,04 e 5,15% no rizoma, 5,84 e 8,12% no pseudocaule e 4,85 e 6,68% nas folhas.

De forma similar ao nitrogênio, as maiores concentrações foram encontradas nos períodos iniciais de cultivo, independentemente da parte do propágulo considerada. Quando se comparam as diferentes partes dos propágulos, verifica-se que o pseudocaule apresenta maior concentração de K, diferenciando-se das observadas no rizoma e nas folhas, onde as concentrações de K foram próximas. As menores concentrações de K no rizoma indicam que este não se acumula e sim que é translocado para as outras partes do propágulo, fato também observado por Mezzetti *et al.* (1991) em *Actinidia deliciosa*.

A análise da figura 9 mostra que no propágulo inteiro, a relação N/K se manteve praticamente constante, com valores em torno de 0,75, durante todo o período de cultivo. O valor constante da relação N/K foi mantida nas diferentes partes dos propágulos, contudo, houve diferenças nos valores observados no rizoma ($N/K \cong 1,0$) com os do pseudocaule e folhas, que foram similares ($N/K \cong 0,68$). A relação constante sugere que, tanto o N, como o K, foram absorvidos proporcionalmente durante todo o período de cultivo e que ambos os nutrientes se encontram em quantidades suficientes para o desenvolvimento dos propágulos. Além disto, a maior relação N/K no rizoma indica que o mesmo acumula mais N do que K em relação ao pseudocaule e folhas. A relação K/P (Figura 10), apresentou tendência similar a da N/P, com valores ligeiramente

superiores devido a que a concentração de K nos propágulos foi também ligeiramente superior a de N.

O fato do rizoma acumular mais N do que K, possivelmente está relacionado com as funções próprias desses nutrientes no metabolismo das plantas, embora ambos sejam móveis e de fácil redistribuição. Assim, cerca de 90% do N-total da planta se encontra fazendo parte de compostos orgânicos (aminoácidos livres, proteínas, amins, ácidos nucleicos, vitaminas, coenzimas, etc.), enquanto que não se conhece um só composto orgânico do qual o K faça parte. Do K-total na planta, cerca de 70% se encontra em forma iônica na célula e pode ser retirado pela água, e os 30% restante são adsorvidos a proteínas que podem ser facilmente liberadas (Malavolta, 1976). Em face disto, pode-se inferir que, o maior teor de N em relação ao de K no rizoma, resulta do acúmulo de compostos orgânicos nitrogenados.

Os teores de K encontrados são relativamente altos, quando comparados aos encontrados para a maioria das plantas cultivadas que estão na faixa de 2 a 5%. Para a bananeira, dados da Embrapa (1985) mostram teores de 2,20% de K em folhas da cultivar 'Mysore', 2,21% para 'Prata' e 'Pacovan'; e 2,52 e 2,70% para as cultivares 'Nanicão' e 'Nanica' respectivamente. Em limbo foliar da cultivar 'Pacovan', Neves *et al.* (1991) encontraram teores relativamente baixos de 2,15% enquanto que em rebentos foram encontrados teores de 7,52% de K, em plantas adubadas com altas doses de K.

Quando foi calculada a quantidade de K extraída pelas diferentes partes do propágulo (Tabela 4), verificou-se que, embora com teores mais baixos, o rizoma acumulou maiores quantidades de K que o pseudocaule e folhas, devido a maior produção de matéria seca. No entanto, somente foram verificadas diferenças estatísticas significativas a partir dos 50 dias de cultivo entre o K extraído pelo rizoma e o extraído pelo pseudocaule e folhas.

Aos 60 dias de cultivo, 41,3% do K inicial adicionado ainda permanecia no meio (Tabela 5 e Figura 7c), sugerindo que a quantidade fornecida foi suficiente para suprir as exigências dos propágulos. Esses resultados diferem do encontrado por Mezzetti *et al.* (1991), no cultivo *in vitro* de *Actinidia deliciosa*, quando apenas 15% do K permanecia no meio de cultivo no mesmo período.

Figura 10. Variação da relação K/P no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo *in vitro* de bananeira, cv. Prata anã.

Figura 11. Variação da relação K/Ca no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo *in vitro* de bananeira, cv. Prata anã.

4.4.4. Cálcio

A concentração de Ca nos propágulos inteiros e nas diferentes partes destes, foi igualmente distribuída, não havendo diferença estatística significativa em função do tempo, observando-se somente nas folhas, uma ligeira tendência de aumento com o tempo (Tabela 3). Para tempos de cultivo iguais, a concentração de Ca nas diferentes parte dos propágulos, seguiu a ordem: rizoma > pseudocaule > folhas e todas diferiram estatisticamente entre si.

A maior concentração de Ca foi observada no rizoma aos 20 dias (0,79%), apresentando diferença apenas da concentração inicial, explicada pela “limpeza” do propágulo antes da inoculação. Foi também o rizoma a parte do propágulo com maior concentração de Ca, apresentando diferença das concentrações encontradas no pseudocaule, que por sua vez, também apresentou diferença das folhas, que tinham a menor concentração.

Na figura 11, que apresenta as relações K/Ca, pode-se observar que as mesmas permanecem praticamente constantes no rizoma e pseudocaule, durante todo o tempo de cultivo, enquanto que nas folhas essa relação diminuiu de 40 para 17 nos 60 dias, verificando-se as maiores reduções entre os 20 e 40 dias de cultivo. Essas reduções foram causadas principalmente pelo aumento dos teores do Ca, mais do que as reduções do conteúdo de K; e são um indicativo de que os propágulos continuaram absorvendo Ca durante todo o período de cultivo.

As concentrações observadas nas folhas foram relativamente baixas, quando comparadas as encontradas em folhas adultas das outras cultivares de bananeira. Os teores de Ca encontrados em folhas adultas das cultivares ‘Pacovan’ ‘Mysore’, ‘Prata’, ‘Nanica’ e ‘Nanicão’ foram de 0,41; 0,60; 0,52; 0,55 e 0,42% respectivamente (Embrapa, 1985). Em rebentos, Neves *et al.* (1991) verificaram que o teor de Ca era de 0,52% enquanto que em folhas adultas era de 1,04%. Esse aumento no teor de Ca a medida que a planta se desenvolve quanto a idade, também foi verificado por Nóbrega (1983), para a cultivar ‘Prata’.

A ordem de concentração de $\text{Ca} > \text{rizoma} > \text{pseudocaule} > \text{folha}$, pode ser atribuída a baixa mobilidade do Ca na planta, razão pela qual, normalmente as menores concentrações são encontradas em tecidos mais jovens. Isto explica também, os aumentos de concentração de Ca observadas nas folhas com o tempo de cultivo *in vitro*, e as diferenças de concentração de Ca quando comparadas com folhas de plantas adultas.

Segundo Williamms (1993), a absorção e distribuição do Ca através da planta é dependente do fluxo de massa, e como geralmente dentro dos frascos no cultivo *in vitro* a umidade é alta, conseqüentemente a transpiração é reduzida, podendo limitar o transporte de íons de baixa mobilidade e que dependem do fluxo de massa. De acordo com Sha *et al.* (1985), quanto maior a taxa de transpiração maior o fluxo de nutrientes. Quando a transpiração é inibida, o fluxo é reduzido, e quando a umidade relativa está próxima da saturação, pode haver deficiência de alguns elementos especialmente, de Ca (Palzkill *et al.*, 1976; Palzkill *et al.*, 1980). A deficiência de Ca causa desenvolvimento anormal na estrutura das células, havendo uma quebra das membranas vacuolares seguido de uma desorganização de outras estruturas como mitocôndria, aparelho de Golgi e eventualmente, desintegração de plastídios. Estas evidências sugerem que o Ca é essencial para a manutenção e, provavelmente, para a formação do sistema de membranas de células, de quem a integridade funcional e metabolismo celular é dependente (Marinos, 1962).

O tipo de tampa dos frascos que permite a troca gasosa, é importante na utilização do Ca pelos propágulos. Dependendo da tampa, pode haver o acúmulo de gases como CO_2 , etileno e etanol (Dunwell, 1979; Dunwell, 1981), que podem levar a desordens fisiológicas não só na redução na taxa de transpiração, como numa baixa ou anormal atividade metabólica e no acúmulo de alguns metabólitos, como aminoácidos e oxalatos (Ashkar & Ries, 1971; Corgan & Cotter, 1971; Thibodeau & Minotti, 1969). Estes compostos podem contribuir para a deficiência de Ca pela ligação e transformação do elemento em uma forma não disponível. Isto pode explicar porque a utilização de parafilme mostra maior incidência de necrose do que tampas de plástico, ainda que os níveis de Ca nas gemas sejam os mesmos (Sha *et al.*, 1985),

A quantidade de Ca extraída pelo propágulo aumentou com o tempo de cultivo (Tabela 4), principalmente devido ao aumento de matéria seca no rizoma, pseudocaule e folhas, uma vez que, as concentrações praticamente permaneceram constantes. Segundo Lahav & Turner, (1983), a absorção de Ca durante o crescimento da bananeira, segue o acúmulo de matéria seca, pelo menos até a emergência do cacho.

No meio de cultivo, a remoção do Ca pelo propágulo foi relativamente menor que a do N e do K, permanecendo remanescente no meio, ao final dos 60 dias de cultivo, 48,9% do Ca adicionado inicialmente (Tabela 5). A distribuição percentual do Ca no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos são ilustradas na figura 12a. Nela se observa que, dentre as partes da planta, o rizoma extraiu maior quantidade de Ca que o pseudocaule e folhas, durante os 60 dias de cultivo.

As folhas extraíram menores quantidades de Ca do que o pseudocaule, contrariamente ao encontrado por Mezzetti *et al.* (1991), em *Actinidia deliciosa*, que verificaram uma maior quantidade de Ca nas folhas e menor no caule; demonstrando que a absorção, transporte e distribuição em ambas as espécies são diferentes.

Embora tenham apresentado menor quantidade que as outras partes dos propágulos, as folhas continuaram a acumular Ca até os 60 dias quando extraíram maior quantidade do que aquelas extraídas anteriormente. Segundo Mezzetti *et al.* (1991), estes aumentos constantes observados em folhas de *Actinidia deliciosa*, demonstram a capacidade que a espécie possui de absorver e translocar Ca.

4.4.5. Magnésio

De modo geral a concentração de Mg nos propágulos inteiros e nas diferentes partes destes, foram similares durante os 60 dias de cultivo, com valores entre 0,26 e 0,35% no propágulo inteiro, entre 0,30 e 0,43% no rizoma, entre 0,25 e 0,33% no pseudocaule e entre 0,22 e 0,28% nas folhas (Tabela 3). Embora sem apresentar diferença estatística, verificou-se uma tendência de redução na concentração com o tempo.

Figura 12. Distribuição percentual de cálcio (a), magnésio (b) e enxofre (c) no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos de bananeira, cv. Prata anã.

Figura 13. Variação da relação Ca/Mg no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo *in vitro* de bananeira, cv. Prata anã.

Figura 14. Variação da relação N/S no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros em função do tempo de cultivo *in vitro* de bananeira, cv. Prata anã.

Contrariamente, Williams (1993), trabalhando com *Ptilotus exaltatus*, observou uma tendência de aumento na concentração de Mg em função do tempo.

Entre as partes dos propágulos, no mesmo tempo de cultivo, o rizoma apresentou a maior concentração de Mg, diferenciando-se significativamente dos 20 aos 40 dias, das concentrações verificadas no pseudocaule e folhas, que foram semelhantes durante todo o período de cultivo. A relação Ca/Mg apresentada na figura 13, aumentou com o tempo de cultivo, principalmente no rizoma e nas folhas, comportamento esse que pode ser atribuído ao acúmulo de Ca que ocorre nos tecidos com a idade, elevando essa relação.

As concentrações de Mg nas folhas dos propágulos foram mais baixas que as normalmente encontradas em folhas de plantas adultas de bananeira, reportadas na literatura. Dados da Embrapa (1985) mostraram teores na faixa de 0,28 a 0,32% na matéria seca de folhas das cultivares ‘Pacovan’, ‘Mysore’, ‘Prata’, ‘Nanica’ e ‘Nanicão’. Gallo *et al.* (1974) citaram níveis médios de 0,43 e 0,36% para as cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’, respectivamente, considerando adequados níveis em torno de 0,36%.

A tabela 4 mostra que para o mesmo tempo de cultivo, o rizoma foi a parte do propágulo que apresentou maior extração de Mg, apresentando diferença estatística significativa durante o cultivo, do pseudocaule e das folhas, que foram estatisticamente similares. Com o aumento do tempo de cultivo, as quantidades de Mg extraídas por todas as partes dos propágulos também aumentaram (Tabela 4). Na figura 12b, está ilustrada a distribuição percentual do Mg no meio e nas diferentes partes dos propágulos através do tempo de cultivo.

Do Mg total no propágulo inteiro, cerca de 60% foi absorvido nos primeiros 20 dias de cultivo, indicando que houve uma acentuada redução na taxa de absorção do Mg nos dias posteriores. Estes resultados estão de acordo com MacCarthy *et al.* (1980), que verificaram que o Mg era rapidamente absorvido do 6º ao 14º dia de cultivo em *Catharanthus roseus*, permanecendo estável posteriormente. Singha *et al.* (1987) também verificaram uma redução na absorção a partir da segunda semana de cultivo, em *Malus* sp. e *Pyrus communis*.

Analisando as reduções de Mg no meio de cultivo (Tabela 5), verifica-se que no primeiro mês, 34,4% do Mg foi removido do meio de cultura, enquanto que no segundo, apenas 13,7% foi retirado pelos propágulos, de maneira que ao final do cultivo ainda permanecia 52% de Mg remanescente no meio. Isto indica, que o meio ainda continha quantidades suficientes deste nutriente para satisfazer a necessidade dos propágulos.

São muitos os fatores que influenciam a absorção de nutrientes pelas plantas, os quais podem estar relacionados com o meio, com processos metabólicos da planta e a interação de ambas. Assim, a absorção de Mg pela planta é muito influenciada pela concentração de Mg na solução ao redor das raízes (Turner & Barkus, 1981), de maneira que aumentando a concentração de Mg no meio, aumenta a absorção (Veliky *et al.*, 1977). Se a proporção K^+/Mg^{+2} no meio for suficientemente alta, diminui a absorção de Mg ao ponto da planta apresentar deficiência desse elemento; esse antagonismo ocorre também com relação ao Ca, de modo que o aumento na concentração de um desses elementos implica na diminuição da absorção do Mg e vice-versa (Malavolta, 1976). A redução de absorção com o tempo de cultivo, também pode estar associada com a redução do pH do meio de cultura, pois algumas pesquisas indicam que quando o pH é mais alto aumenta a absorção de Mg (Veliky *et al.*, 1977).

A maior taxa de absorção de Mg, assim como dos outros nutrientes citados, foi extraída nos primeiros dias de cultivo correspondendo, também, a maior taxa de acúmulo de massa fresca e seca. Mezzetti *et al.* (1991) verificaram que o período de maior absorção de K e Mg correspondeu ao período de maior absorção de N e P em *Actinidia deliciosa*.

4.4.6. Enxofre

As concentrações de S variaram com o tempo de cultivo entre 0,25 e 0,48% no propágulo inteiro, entre 0,31 e 0,48% no rizoma, entre 0,20 e 0,37% no pseudocaule e entre 0,20 e 0,31% nas folhas. Dentro de um mesmo tempo de cultivo, a concentração de S foi sempre maior no rizoma, diferenciando-se do pseudocaule e das folhas onde foram semelhantes (Tabela 3).

A maior concentração de enxofre verificada nos propágulos (0,48%), por ocasião da inoculação, provavelmente foi devida, como citado anteriormente, a “limpeza” feita nos propágulos, pela retirada do rizoma da parte aérea e dos restos de folhas secas ou mortas, ficando somente a gema apical, com partes mais tenras de rizoma e pseudocaule.

No pseudocaule e nas folhas nos primeiros 20 dias, as concentrações de S foram sensivelmente maiores que as dos dias posteriores de cultivo, onde permaneceram constantes; no rizoma, as variações na concentração foram menores e graduais durante todo o período de cultivo. Isto se refletiu nas concentrações mostradas pelo propágulo inteiro, que apresentou com o tempo, comportamento intermediário, não sendo evidenciada a redução na concentração de S observada nas folhas aos 60 dias.

As maiores concentrações de S observadas no rizoma, em relação ao pseudocaule e folhas, provavelmente foram devidas a sua baixa mobilidade dentro da planta e acúmulo de compostos orgânicos com S, pois forma parte de aminoácidos e proteínas. Isto explica, pelo menos em parte, as maiores concentrações encontradas nos períodos iniciais de cultivo e também porque, quando o meio está mais concentrado em nutrientes, a absorção é maior. Segundo Fox *et al.*, 1979, mesmo em casos de deficiências severas, o S não é facilmente transportado das folhas velhas para as novas e somente um grande excesso conduz a um acúmulo apreciável nos tecidos condutores.

As concentrações de S nas folhas dos propágulos apresentaram teores superiores aos teores médios na matéria seca de folhas de plantas adultas, das cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’ (0,127 e 0,149%, respectivamente), indicados por Gallo *et al.* (1974), com base em dados de vários autores. Por outro lado, as concentrações são baixas quando comparadas com os níveis críticos de 0,23 e 0,35% de S no limbo e pecíolo, respectivamente, na terceira folha de plantas adultas, de várias cultivares de bananeira (Lahav & Turner, 1983),

As concentrações similares de S encontradas no pseudocaule e nas folhas indicam que o meio continha S disponível às plantas em quantidades suficientes durante todo o período de cultivo. Fox *et al.* (1979), cultivando bananeira em vasos com soluções nutritivas, constataram que, com níveis adequados de S no meio, o teor nas folhas era

maior que no pseudocaule. Por ser o limbo uma parte muito ativa na planta, os elementos tendem a se mover em direção às regiões mais ativas metabolicamente (Malavolta, 1980).

A figura 14 mostra as relações N/S dos propágulos inteiros e nas suas diferentes partes. Nela se observa que as folhas apresentaram uma tendência de aumento da relação N/S durante todo o período de cultivo, enquanto que no pseudocaule a mesma relação N/S aumentou até os 30 dias, diminuindo em dias posteriores. Esse comportamento pode ser associado ao acúmulo inicial e posterior redistribuição do N na planta, assim como a mobilidade relativa do N que é bem maior que a do S.

Dos macroelementos estudados, o S foi o nutriente extraído em menor quantidade com 66,3% do inicial permanecendo no meio após os 60 dias de cultivo (Tabela 5). Do total de S extraído do meio (33,7%), a maior quantidade (21,9%) foi removida nos primeiros 20 dias representando 65% do S-total extraído pelos propágulos inteiros durante todo o período de cultivo. A distribuição do S-total no sistema meio-propágulo, na figura 12c, ilustra claramente a grande proporção de S que ficou no meio de cultivo aos 60 dias.

4.5 . Micronutrientes

As concentrações dos micronutrientes e as quantidades extraídas pelos propágulos inteiros e pelas diferentes partes destes, são apresentadas nas tabelas 6 e 7. Na tabela 8, são indicadas as quantidades de micronutrientes remanescentes no meio nos diferentes períodos de cultivo.

4.5.1. Ferro

Os teores de Fe na matéria seca dos explantes e propágulos de bananeira, em função do tempo de cultivo, estiveram entre 180,1 e 462,4mg/kg no propágulo inteiro, entre 180,1 e 804,3mg/kg no rizoma, entre 130,1 e 191,4mg/kg no pseudocaule e entre 103,6 e 133,2mg/kg nas folhas (Tabela 6). Para tempos iguais de cultivo, a parte do

propágulo que apresentou maior concentração foi o rizoma, com médias que se diferenciaram do pseudocaule e das folhas, que não apresentaram diferenças entre si.

Nos propágulos inteiros, a concentração de Fe aumentou de 180,1 para 462,4mg/kg nos primeiros 20 dias de cultivo, depois diminuindo para 338,6mg/kg aos 60 dias. A baixa concentração inicial (180,1mg/kg) é explicada pela “limpeza” nos propágulos por ocasião da inoculação.

O rizoma foi a parte que apresentou maior concentração de Fe chegando ao valor máximo de 804,3mg/kg aos 30 dias, diminuindo nos dias subsequentes e apresentando diferença do pseudocaule e folhas, cujas concentrações foram mais baixas. No pseudocaule, a concentração de Fe apresentou uma tendência a aumentar com o tempo, enquanto que nas folhas houve uma ligeira tendência a diminuir. Porém não houve diferença entre os tempos de cultivo tanto para o pseudocaule como para as folhas assim como, entre pseudocaule e folhas, embora as folhas tenham apresentado uma menor concentração de Fe. Esses resultados estão de acordo com Twyford & Walmsley (1968), que trabalhando com plantas de bananeira em condições de campo, encontraram que o pseudocaule e o rizoma têm maior quantidade de Fe que as folhas em estádios iniciais de crescimento.

Os teores de Fe nas folhas são relativamente baixos quando se comparam com as concentrações de folhas adultas de bananeira, embora sejam ligeiramente superiores as apresentadas pela maioria das outras culturas (entre 50 e 100mg/kg). Para a cultura da bananeira, dados da Embrapa (1985) mostraram os teores de 135, 139, 153, 163 e 173 mg/gk para as cultivares ‘Mysore’, ‘Pacovan’, ‘Prata’, ‘Nanicão’ e ‘Nanica’, respectivamente, na terceira folha na época de floração.

As quantidades de Fe extraídas pelos propágulos inteiros aumentaram com o tempo, independentemente dos aumentos ou diminuições das concentrações das diferentes partes, chegando a 44,9ug/propágulo (70,1% do meio) no tempo final de cultivo (Tabela 7). O rizoma foi a parte do propágulo que extraiu maior quantidade de Fe (35,1ug/propágulo, aos 60 dias), apresentando diferença das quantidades extraídas pelo pseudocaule e folhas (5,73 e 4,09ug/propágulo aos 60 dias, respectivamente), que não se diferenciaram entre si, durante todo o período de cultivo. As quantidades relativas de Fe

no meio, propágulos inteiros e nas suas diferentes partes, são ilustradas na figura 15a, onde mostra a maior distribuição percentual no rizoma.

As maiores taxas de absorção de Fe pelos propágulos ocorreu aos 10 e 20 dias com 23,51 e 20,58% respectivamente, enquanto que dos 20 aos 30 dias a extração foi de apenas 9,37% (Tabela 8).

Dos micronutrientes estudados, o Fe foi o extraído do meio em maior quantidade, porém aos 60 dias, 29,9% ainda permanecia no meio de cultivo (Tabela 8). As concentrações de Fe remanescentes no meio, no presente trabalho, são inferiores às encontradas por Mezzetti *et al.* (1991), indicando que no cultivo *in vitro* de *Actinidia deliciosa*, 42% do Fe permanecia no meio aos 60 dias de cultivo, e que no meio MMS a quantidade do mesmo era excessiva. Por outro lado Singha *et al.* (1987), trabalhando com *Malus sp* e *Pyrus communis*, também encontraram cerca de 40% de Fe remanescente no meio após 9 semanas de cultivo, e que mais ou menos a metade dos outros micronutrientes permanecia no meio. Estes resultados sugerem que a bananeira absorve mais Fe que outras espécies ou que algumas características do meio influenciaram na sua disponibilidade e maior absorção pelas plantas.

Diferenças entre espécies na absorção de Fe *in vitro*, também, têm sido verificadas por Dolcet-Sanjuan *et al.* (1990), trabalhando com quatro espécies de *Pyrus*, entretanto não souberam precisar, se as diferenças entre os genótipos era devido a uma diferenciada absorção, transporte ou requerimento de Fe.

As maiores absorções de Fe verificadas no cultivo da bananeira, também, podem ter sido causadas pelo pH do meio, que permaneceu baixo (em torno de 4.0) do quinto dia até o final do cultivo, enquanto que, em outras culturas, vários pesquisadores verificaram aumentos sensíveis do pH entre 15 e 30 dias de cultivo (Singha *et al.*, 1987; Mezzetti *et al.*, 1991). A elevação de uma unidade no pH faz com que a concentração do Fe caia 1000 vezes, e ainda, altos níveis de P podem diminuir o teor de Fe do meio, por formação de precipitados insolúveis (Bear, 1964).

Segundo Dalton *et al.* (1983), no meio de Murashige & Skoog (1962) usado em cultura de tecido, normalmente ocorre a precipitação do Fe, quando ineficientemente quelado, e observaram que a maioria dos precipitados se formou após dois dias, sendo

Tabela 6. Concentração de micronutrientes no rizoma, pseudocaule, folhas e nos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã, durante o cultivo, *in vitro* (média de 3 repetições).

	TEMPO (dias)						
	0	10	20	30	40	50	60
Ferro (mg/kg)							
Propágulo inteiro	180,1c	383,9ab	462,4a	438,0ab	378,9ab	366,2ab	338,6b
rizoma	180,1c	556,1bA	794,5aA	804,3aA	654,5abA	612,2abA	545,7bA
pseudocaule	0,0	130,1aB	156,6aB	152,1aB	191,4aB	180,8aB	183,9aB
folhas	0,0	0,0	133,2aB	112,0aB	127,9aB	103,6aB	109,0aB
Zinco (mg/kg)							
Propágulo inteiro	109,2ab	129,6a	133,4a	126,6ab	120,2ab	112,0ab	95,3b
rizoma	109,2c	160,0abA	188,3aA	185,2aA	162,7abA	156,2abcA	122,1bcA
pseudocaule	0,0	84,8aB	92,7aB	89,9aB	101,6aB	89,6aB	84,7aB
folhas	0,0	0,0	69,4aB	64,4aB	69,8aB	54,3aC	57,4aB
Manganês (mg/kg)							
Propágulo inteiro	123,8a	103,8a	115,3a	112,2a	114,2a	111,3a	121,5a
rizoma	123,8a	100,5aB	114,0aB	105,2aB	93,8aB	88,7aB	94,6aB
pseudocaule	0,0	107,7bB	160,9aA	152,5aA	160,5aA	155,9aA	161,4aA
folhas	0,0	0,0	71,4dC	80,7cdB	98,4bcB	109,0bB	135,1aA
Cobre (mg/kg)							
Propágulo inteiro	8,3c	11,6a	10,8ab	10,4abc	9,9abc	9,1bc	9,2bc
rizoma	8,3a	10,8aA	11,2aA	11,2aA	9,8aA	8,3aA	8,7aA
pseudocaule	0,0	12,6aA	9,8bA	9,4bA	9,8bA	9,8bA	9,0bA
folhas	0,0	0,0	11,2aA	10,1aA	10,1aA	9,8aA	10,1aA
Boro (mg/kg)							
Propágulo inteiro	82,3ab	93,1a	95,8 a	75,0abc	68,4bc	64,6bc	56,3c
rizoma	82,3a	78,5aB	77,7aB	69,0aA	55,8aA	54,3aA	55,2aA
pseudocaule	0,0	114,8aA	114,5aA	79,0bA	78,2bA	78,0bA	55,4bA
folhas	0,0	0,0	114,3aA	81,1bA	78,9bA	70,0bA	58,9bA

* Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e de mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 7. Extração de micronutrientes do meio de cultura pelo rizoma, pseudocaule, folhas e pelos propágulos inteiros de bananeira, cv. Prata anã e quantidades remanescentes no meio, durante o cultivo *in vitro* (média de 3 repetições).

	TEMPO (dias)						
	0	10	20	30	40	50	60
Ferro ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	69,00	54,89	42,53	36,90	34,59	27,78	26,90
Propágulo inteiro	2,84d	16,95c	29,31bc	34,94ab	37,25ab	44,06a	44,94a
rizoma	2,84c	14,58bcA	24,59abA	29,17abA	28,46abA	35,19aA	35,12aA
pseudocaule	0,0	2,37bB	2,56abB	3,47abB	5,47abB	5,56abB	5,73aB
folhas	0,0	0,0	2,17bB	2,29bB	3,33abB	3,31abB	4,09aB
Zinco ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	28,20	24,20	21,47	19,82	18,14	16,49	17,29
Propágulo inteiro	1,73d	5,73c	8,46bc	10,11ab	11,79ab	13,44a	12,64a
rizoma	1,73c	4,19bcA	5,83abA	6,73abA	7,08abA	8,96aA	7,87abA
pseudocaule	0,0	1,53bB	1,51bB	2,06abB	2,89aB	2,75aB	2,64aB
folhas	0,0	0,0	1,12cB	1,32bcB	1,82abB	1,73abB	2,13aB
Manganês ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	62,80	60,14	57,42	55,75	53,47	51,37	48,54
Propágulo inteiro	1,93f	4,59ef	7,31de	8,98cd	11,26bc	13,36ab	16,19a
rizoma	1,93c	2,64bcA	3,53abcA	3,84abcA	4,10abcA	5,10abA	6,09aA
pseudocaule	0,0	1,95cA	2,63cAB	3,49bAB	4,55aA	4,79aA	5,02aA
folhas	0,0	0,0	1,15cB	1,65cB	2,60bcA	3,47bA	5,07aA
Cobre ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	5,03	4,62	4,44	4,30	4,17	4,05	3,91
Propágulo inteiro	0,13f	0,51e	0,69d	0,83cd	0,96bc	1,08ab	1,22a
rizoma	0,13c	0,28bcA	0,35bA	0,41abA	0,42abA	0,48abA	0,56aA
pseudocaule	0,0	0,23abA	0,16bB	0,22abB	0,28aB	0,30aB	0,28aB
folhas	0,0	0,0	0,18cB	0,21bcB	0,26bcB	0,31abB	0,38aB
Boro ($\mu\text{g}/\text{propágulo}$)							
Meio de cultura	12,80	9,98	7,98	8,08	7,36	6,37	6,63
Propágulo inteiro	1,29c	4,11b	6,11a	6,01ab	6,73a	7,72a	7,46a
rizoma	1,29c	2,04bcA	2,40abcA	2,52abcA	2,44abcA	3,09abA	3,55aA
pseudocaule	0,0	2,07aA	1,86aA	1,82aA	2,22aA	2,39aA	1,72aB
folhas	0,0	0,0	1,85aA	1,66aA	2,06aA	2,23aA	2,19aB

* Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e de mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 8. Percentagem de micronutrientes remanescentes no meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) em função do tempo de cultivo de propágulos de bananeira, cv. Prata anã, e a contribuição, em relação ao meio, dos propágulos iniciais.

TEMPO		NUTRIENTES				
		Fe	Zn	Mn	Cu	B
(dias)		%				
Propágulo inoculado	0	4,73	6,15	3,08	2,59	10,11
Meio de cultivo	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
“ “ “	10	76,49	85,83	95,77	92,44	77,95
“ “ “	20	55,91	76,16	91,43	88,93	62,28
“ “ “	30	46,54	70,31	88,77	86,05	63,10
“ “ “	40	42,69	64,34	85,14	83,39	57,49
“ “ “	50	31,35	58,49	81,80	81,05	49,73
“ “ “	60	29,89	61,33	77,29	78,35	51,73

Figura 15. Distribuição percentual de ferro (a), zinco (b) e manganês (c) no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos de bananeira, cv. Prata anã.

principalmente, fosfato de ferro. Verificaram ainda, a perda de 45% do ferro original, 20% do Zn e 13% do fosfato, que causaram efeitos deletérios no crescimento dos tecidos de *Ocimum basilicum* cultivados em suspensão.

O tipo e a concentração do ágar também podem interferir no nível de nutrientes nos propágulos, pois quando Singha *et al.* (1985) aumentaram a concentração do ágar no meio aumentou o Fe e outros elementos como o P, Zn e Al e reduziu os níveis de Ca, Mg e Mn no propágulo.

O crescimento da planta e a absorção de nutrientes minerais decrescem com o tempo de cultivo, enquanto, aparentemente, quantidades adequadas de minerais ainda permanecem no meio de cultura. Provavelmente, a disponibilidade dos nutrientes seja diminuída devido a precipitação como íons insolúveis, por ligação ao agente geleificante, ou por redução da difusão de íons através do gel para a planta (Williamms, 1993), uma vez que com o tempo de cultivo, há redução de água e aumento da concentração de ágar do meio.

4.5.2 . Zinco

Nos propágulos inteiros a concentração de Zn na matéria seca variou entre 95,3 e 133,4mg/kg (Tabela 6). A maior concentração de Zn foi observada aos 20 dias (133,4mg/kg), a partir da qual diminuiu gradualmente com o tempo até os 60 dias de cultivo, apresentando diferenças estatísticas somente entre os 20 e 60 dias. Em *Ptilotus*, Williamms (1993) verificou uma redução a partir de 4 semanas de cultivo.

No rizoma, a maior concentração também foi verificada aos 20 dias (188,3mg/kg), diferenciando-se da concentração inicial (109,2mg/kg) e da concentração final (122,1mg/kg). Foi o rizoma a parte do propágulo a apresentar maior concentração de Zn, diferenciando-se do pseudocaule e folhas, que não apresentaram diferença entre si (exceto aos 50 dias), embora o pseudocaule tenha apresentado uma concentração um

pouco mais alta. Esta característica de maior concentração do rizoma para as folhas pode ser atribuída a baixa mobilidade do Zn na planta.

As concentrações de Zn verificadas no presente trabalho, são consideradas médias a altas quando comparadas com a maioria das plantas que são de 20 a 70mg/kg. Para as diferentes cultivares de bananeira foram observados por diversos autores, níveis de Zn variando de 8 a 36mg/kg. Para as cultivares ‘Pacovan’, ‘Mysore’, ‘Prata’, ‘Nanica’ e ‘Nanicão’, dados da Embrapa (1985) mostram os níveis de 31, 29, 25, 36 e 23mg/kg na terceira folha na época de floração.

De maneira similar a outros nutrientes, a quantidade de Zn absorvida pelos propágulos aumentou em função do tempo de cultivo, apresentando as maiores taxas de absorção nos primeiros 20 dias, quando 66,8% do Zn-total foi extraído pelos propágulos.

Dentre as diferentes partes das plantas, o rizoma extraiu maior quantidade de Zn apresentando diferença estatística de forma significativa do pseudocaule e folhas que não se diferenciaram entre si durante o período de cultivo, embora o pseudocaule tenha acumulado um pouco mais que as folhas. Na figura 15b é ilustrada a distribuição percentual do Zn no sistema meio-planta.

Tomando-se como base o meio de cultura, durante os 60 dias de cultivo 38,7% do Zn inicial foi removido pelos propágulos, ficando ainda 61,3% remanescente no meio (Tabela 8). Isto indica que o Zn não foi limitante para o crescimento, o que também é indicado pelas altas concentrações verificadas na matéria seca dos propágulos, sugerindo que o meio possuía Zn em excesso. Segundo Mezzetti *et al.* (1991), no cultivo de *Actinidia deliciosa*, com 12% do Zn remanescente no meio aos 60 dias a quantidade fornecida ainda permanecia suficiente.

Embora em quantidades suficientes, a absorção de alguns nutrientes pode ser impedida por alguns fatores. De acordo com Dalton *et al.* (1983) 20% do Zn é perdido por precipitação. Íons metálicos podem ligar-se na superfície como por exemplo a interação do Zn com o Ca (Klein & Manos, 1960). Algumas vezes deficiência de Zn pode resultar de alta concentração de P como consequência do antagonismo P/Zn (Marchal & Martin-Prével, 1971). Para Malavolta (1980), é clássica na literatura a deficiência de Zn

induzida por P e que altos níveis de P no meio causam diminuição na absorção do Zn provocando sintomas de carência, pois o nível do micronutriente na matéria seca fica abaixo do suficiente.

4.5.3 . Manganês

A concentração de Mn nos propágulos inteiros variou entre 103,8 e 123,8mg/kg (Tabela 6) não se observando diferenças entre as concentrações na matéria seca nos diferentes tempos estudados. A menor concentração foi verificada aos 10 dias (103,8mg/kg) permanecendo praticamente constante nos tempos sucessivos com teores que oscilaram em torno de 114mg/kg

Dentre as diferentes partes dos propágulos, o pseudocaule foi a parte do propágulo que apresentou maior concentração de Mn permanecendo constante entre os 20 e 60 dias, com teores médios oscilando em torno de 157mg/kg.

Nas folhas, a concentração de Mn aumentou em função do tempo, com concentrações que ficaram entre 71,4 e 135,1mg/kg, apresentando diferenças entre as médias das concentrações nos tempos utilizados no experimento. Mezzetti *et al.* (1991) também verificaram aumento no teor de Mn dos 45 aos 60 dias nas folhas de *Actinidia*, e atribuem esse fato, a que no primeiro mês de cultura, há uma demanda preferencial por altas quantidades de Mg para manter a formação de plastídios, seguindo-se de maior translocação de Mn.

No rizoma, ao contrário do que ocorreu nas folhas, as concentrações de Mn diminuíram com o tempo, apresentando 123,8mg/kg no início e 94,6mg/kg no final do cultivo, embora não tenham sido observadas diferenças entre suas médias. Isto sugere, que houve translocação de Mn do rizoma para o pseudocaule e folhas ou provavelmente, efeito de diluição por maior aumento de matéria seca.

Quando comparadas as concentrações de Mn nas folhas dos propágulos de bananeira, as mesmas são baixas em relação as indicadas por diversos pesquisadores para plantas adultas, embora sejam muito variáveis. Dados da Embrapa (1985) mostram níveis

de 357, 508, 562, 681 e 765mg/kg de Mn em folhas das cultivares ‘Nanicão’, ‘Prata’, ‘Nanica’, ‘Pacovan’ e ‘Mysore’, respectivamente. No estágio de filhote da cv. ‘Dwarf Cavendish’, Lahav & Turner (1983) verificaram níveis variando de 25 a 80mg/kg em diferentes partes da folha. Os níveis médios citados por Gallo *et al.* (1974) foram 986 e 611mg/kg para as cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’. De acordo com Twyford & Walmsley (1968), a concentração de Mn na folha tende a aumentar com o desenvolvimento da planta até a emissão do filhote, então decresce; no rizoma, a variação é pequena e no pseudocaule há um decréscimo com a idade da planta.

A quantidade de Mn-total extraída pelos propágulos aumentou com o tempo de cultivo, devido exclusivamente ao aumento de produção de matéria seca (Tabela 7), pois, diferentemente dos outros micronutrientes, as taxas de absorção de Mn do meio permaneceram praticamente constantes durante todo o período de cultivo. Assim os propágulos extraíram 49,5% do Mn-total durante os primeiros 30 dias e 50,5% durante os últimos 30 dias de cultivo.

Entre as diferentes partes dos propágulos, o rizoma foi a que continha mais Mn-total, seguida do pseudocaule e depois das folhas, no entanto, praticamente, não houve diferença estatística das quantidades extraídas pelas três partes dos propágulos. Na Figura 15c, é mostrada a distribuição percentual de Mn no sistema meio-propágulo. A maior quantidade de Mn-total observada no rizoma em relação ao pseudocaule, que apresentou maiores concentrações, são explicadas pela maior produção de matéria seca pelo rizoma.

Dos micronutrientes estudados, o Mn foi o segundo nutriente com maiores quantidades remanescentes no meio (perdendo apenas para o Cu), permanecendo 77,3% do inicial ao final do cultivo (Tabela 8). A quantidade removida foi igualmente distribuída, com 11,23% do Mn sendo extraído no primeiro mês e 11,48% durante o segundo mês. A alta proporção de Mn remanescente no meio ao final do cultivo, é um indicativo de que no meio de cultivo MMS, o mesmo está em quantidade excessiva, e que é possível reduzi-la para o cultivo *in vitro* da bananeira

No entanto, não existem disponíveis na literatura, níveis críticos de nutrientes para o cultivo *in vitro*, de maneira que para qualquer modificação no meio, seriam necessários

ajustes feitos através de pesquisas. Há também que se considerar, que a disponibilidade do Mn no meio pode ser dificultada por: a) coprecipitação com sais de fosfato (Klein & Manos, 1960); b) alta concentração de ágar no meio com redução de Mn no propágulo (Singha *et al.*, 1985) e c) altas concentrações de K, Ca, Mg, Cu, Zn e Na (Malavolta, 1980).

4.5.4. Cobre

Nos propágulos inteiros, a concentração de Cu na matéria seca variou entre 8,3 e 11,6mg/kg, durante os 60 dias de cultivo. A maior concentração foi encontrada aos 10 dias (11,6mg/kg), apresentando diferença estatística significativa da concentração inicial no propágulo inoculado (8,3mg/kg) e das concentrações verificadas a partir dos 50 dias quando foram mais baixas (Tabela 6).

Em todos os tempos de cultivo, as concentrações de Cu no rizoma, pseudocaule e folhas foram estatisticamente similares. Ao se comparar as concentrações nos diferentes tempos de cultivo, observou-se que no rizoma, a concentração do propágulo inoculado (8,3 mg/kg) aumentou até os 20 dias, a partir daí, a medida que os propágulos se desenvolviam a concentração diminuía, variando de 11,2mg/kg, aos 20 dias, para 8,7mg/kg, aos 60 dias. No pseudocaule a maior concentração foi observada aos 10 dias, diferenciando-se das concentrações verificadas dos 20 aos 60 dias quando permaneceram constantes, indicando que a absorção de Cu acompanhou o crescimento dos tecidos. De forma similar, Williamms (1993), também, verificou uma redução na concentração de Cu em *Ptilotus exaltatus* a partir de seis semanas.

Os propágulos inteiros e as diferentes partes destes, apresentaram teores de Cu similares aos níveis médios de 9,4 e 8,7mg/kg de plantas adultas das cultivares ‘Nanica’ e ‘Nanicão’, respectivamente, citados por Gallo *et al.* (1974); e são baixas quando comparadas com os indicados por Embrapa (1985) para as cultivares ‘Pacovan’, ‘Mysore’, ‘Prata’, ‘Nanica’ e ‘Nanicão’ que foram: 15mg/kg para as três primeiras e 24 e 17mg/kg para as duas últimas respectivamente.

Dos macro e microelementos estudados, o Cu foi absorvido em menor proporção pelos propágulos, permanecendo 78,4% no meio de cultura aos 60 dias (Tabela 8). Isto sugere que o meio utilizado apresentava quantidades excessivas de Cu; Mezzetti *et al.* (1991), já consideravam excessivo, o teor de 19% de Cu remanescente no meio de cultivo aos 60 dias. Deve-se salientar, que quando o meio de cultivo foi analisado, apresentou 67 vezes mais Cu (402µg/L ou 5,03µg/propágulo) do que o meio MMS (6µg/L ou 0,075µg/propágulo), calculado para reagentes 100% puros. O alto conteúdo de Cu observado no meio empregado, pode ser atribuído a presença de impurezas com Cu nos reagentes, embora, tenham sido utilizados reagentes P.A. ou do ágar que foi do tipo comercial.

Do de Cu-total extraído pelos propágulos, 51,4% foi acumulado nos primeiros 20 dias de cultivo. As maiores taxas de absorção ocorreram nos períodos entre 0-10 e 10-20 dias com 34,9 e 16,5% do Cu-total extraído respectivamente, e nos períodos seguintes essas taxas se estabilizaram com valores em torno de 12,5% do Cu-total extraído. Estes resultados discordam dos encontrados por Mezzetti *et al.* (1991), na cultura de *Actinidia deliciosa*, onde o Cu foi absorvido principalmente, durante o segundo mês.

O rizoma foi a parte do propágulo que extraiu maior quantidade de Cu durante todo o cultivo, apresentando diferença estatística das observadas no pseudocaule e folhas, a partir dos 20 dias de cultivo (Tabela 7). No pseudocaule, as quantidades de Cu extraídas, excetuando a dos 10 dias que foi avaliada junto com as folhas, aumentaram até os 40 dias e a partir daí, permaneceram estáveis até os 60 dias de cultivo. Já nas folhas, houve aumento durante todo o período de cultivo, causada pelo aumento de produção de matéria seca.

A figura 16a, ilustra a distribuição percentual do conteúdo de Cu-total no meio de cultura e nas diferentes partes do propágulo: rizoma, pseudocaule e folhas nos diferentes tempos de cultivo. Nela, pode-se verificar, a alta proporção de Cu remanescente no meio e a maior distribuição percentual do Cu no rizoma em relação ao pseudocaule e folhas.

Figura 16. Distribuição percentual de cobre (a) e boro (b) no meio de cultivo e nas diferentes partes dos propágulos de bananeira, cv. Prata anã.

No presente trabalho, o Cu absorvido foi aproximadamente 10% do Mn (Tabela 7), enquanto que, para Walmsley & Twyford (1976), o Cu-total absorvido foi em torno de 1% do Mn absorvido. Isto, possivelmente, tenha sido devido ao excessivo conteúdo de Cu no meio de cultivo, no entanto, não foram observados sintomas aparentes de toxicidade deste nutriente. O Cu é necessário em quantidades muito pequenas em plantas de bananeira (Lahav & Turner, 1983), sendo ativamente absorvido e translocado dentro da planta quando o suprimento é adequado (Mengel & Kirkby, 1979).

4.5.5. Boro

A concentração de B na matéria seca variou entre 56,3 e 95,8mg/kg no propágulo inteiro, entre 54,3 e 82,3mg/kg no rizoma, entre 55,4 e 114,8mg/kg no pseudocaule e entre 58,9 e 114,3mg/kg nas folhas. Em geral, excetuando o explante inoculado, no propágulo inteiro e nas diferentes partes destes, as concentrações foram maiores nos primeiros períodos de cultivo e diminuíram com o tempo, apresentando diferenças entre as médias das concentrações dos últimos períodos (Tabela 6). Estes resultados concordam com o encontrado por Twyford & Walmsley (1968), em plantas de bananeira em condições de campo, de que a concentração de B diminui com o aumento da idade da planta.

Quando foram comparadas as diferentes partes dos propágulos, verificou-se que durante os primeiros 50 dias de cultivo a concentração de B no pseudocaule e nas folhas foram similares e superiores as do rizoma, sendo que aos 60 dias as três partes apresentaram iguais concentrações de B. Diferenças somente foram encontradas nos primeiros 20 dias. Williamms (1993), no entanto verificou uma concentração constante com pequenas oscilações no cultivo *in vitro* de *Ptilotus* durante 12 semanas.

As concentrações de B apresentadas pelos propágulos foram relativamente altas quando comparadas com as encontradas em folhas de plantas adultas de várias cultivares de bananeira cultivadas em condições de campo. Nas cultivares ‘William’ e ‘Nanica’, Lahav (1977), indica como níveis críticos de 8mg/kg em pecíolo de folhas. Na cultivar

‘Dwarf Cavendish’, Lahav & Turner (1983), citam os níveis de 11, 10 e 8mg/kg de B no limbo, nervura e pecíolo, respectivamente.

A maior taxa de absorção de B do meio de cultivo pelos propágulos inteiros ocorreu nos períodos entre 0-10 e 10-20 dias, quando extraíram 22,05 e 15,67% do B inicial do meio, respectivamente. Em tempos posteriores, essas taxas além de reduzidas, apresentaram bastante oscilação. Ao final do cultivo, ainda ficou no meio, cerca de 50% do B inicial (Tabela 8), indicando que o mesmo continha quantidades suficientes deste nutriente, para manter o crescimento dos propágulos por mais tempo.

No rizoma, as quantidades acumuladas de B aumentaram durante o tempo de cultivo, porém a partir dos 20 dias não houve diferença estatística entre as médias das quantidades de B extraídas (Tabela 7). Quanto ao pseudocaule e folhas, as quantidades de B foram similares com pequenas oscilações durante o cultivo. Não se verificou diferença entre as concentrações observadas nas diferentes partes dos propágulos, exceto para o rizoma aos 60 dias, que apresentou a maior a quantidade de B. Estes resultados são ilustrados na figura 16b, que mostra a distribuição percentual do B-total no sistema meio-propágulo.

4.6. Considerações finais

A análise conjunta dos macronutrientes permite observar que o K foi o nutriente extraído em maior quantidade pelos propágulos de bananeira e que em geral seguiram a ordem de absorção: $K > N > Ca > P > Mg \cong S$ (Tabela 4). Quando se estabeleceram as relações entre eles, tomando como base o K, por ter sido absorvido em maior quantidade, a matéria seca dos propágulos apresentou as proporções: 100:79:10:10:6:6 aos 30 dias de cultivo e 100:81:8:12:6:6 aos 60 dias para os nutrientes K, N, P, Ca, Mg e S, respectivamente. Nelas, pode-se observar que as maiores variações ocorreram com o P e com o Ca, enquanto que as proporções dos outros nutrientes permaneceram praticamente constantes. As mesmas relações para os nutrientes K, N, P, Ca, Mg, e S no meio de cultivo MMS foram 100:59:5,2:14:6,7:8,3 no início; 100:49,3:2,2:17,2:7,4:10,8 aos 30

dias; e 100:33:1,2:16,7:8,5:13,4 aos 60 dias de cultivo, respectivamente. Estas relações mostram que o meio MMS utilizado, apresenta proporções diferentes, principalmente de N e P, das dos nutrientes extraídos pelos propágulos, antes do início do cultivo e que as mesmas se acentuam com o tempo de cultivo.

As baixas proporções de N no meio utilizado, podem ser atribuídas a possíveis perdas durante as diferentes etapas do preparo do meio, ou a erros de pesagem, por hidratação dos reagentes contendo N, ocasionando as diferenças verificadas entre o N analisado e o N calculado, fato este, que precisa ser pesquisado. Embora, a quantidade de N no meio tenha sido inferior a recomendada no meio MMS, e tenha-se verificado redução na proporção de N no meio com o tempo, sua proporção com o K nas plantas foi mantida durante o cultivo, indicando que este nutriente esteve em quantidades suficientes durante todo o período de cultivo.

No caso do P, a quantidade fornecida pela análise do meio correspondeu a calculada. A redução da proporção do P na matéria seca dos propágulos ao final do cultivo, é explicada pela rápida absorção de P do meio durante os períodos iniciais de cultivo, que absorveram 75% do P do meio nos primeiros 30 dias, cessando a absorção aos 50 dias, quando o meio ainda continha 9% do P inicial. O esgotamento do P disponível no meio e a redução de sua proporção nas plantas, são indicativos de que pelo menos em parte a redução das taxas de crescimento dos propágulos nos últimos períodos de cultivo foi causada pela deficiência de P.

De forma similar ao P, a absorção do S, Zn e B pelos propágulos, cessou aos 50 dias, quando o meio continha quantidades suficientes desses nutrientes. Isto demonstra que a absorção dos mesmos está associada a do P, de modo que quando cessa a absorção desses nutrientes, cessa também a absorção de P. Provavelmente devido a que entre outras funções, o P participa no armazenamento e fornecimento de energia, a qual é indispensável para o transporte iônico ativo nas plantas; além do mais, o P é necessário na divisão celular (síntese de RNA) onde o S, Zn e B também possuem funções importantes (Mengel & Kirkby, 1982). Por outro lado é conhecida a imobilidade do S, Zn e B na planta, pela manifestação de sintomas de deficiência nos tecidos jovens.

Dentre os micronutrientes, o Fe foi absorvido em maior quantidade (Tabela 7) e apresentou uma relação K/Fe em torno de 130 aos 30 e 60 dias de cultivo, fato que sugere que o mesmo foi absorvido em quantidades suficientes pelos propágulos durante todo o cultivo. A ordem seguida segundo as quantidades absorvidas foi: $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{B} > \text{Cu}$. As relações entre os micronutrientes tomando como base a quantidade de Fe extraída pelos propágulos foram: 100:26:28,9:17,2:2,4 aos 30 dias e de 100:36:28:16,6:2,7 aos 60 dias, para o Fe, Mn, Zn, B e Cu, respectivamente. A regularidade observada nessas relações aos 30 e 60 dias exceto para o Mn que decresceu, são indicativos de que os mesmos foram fornecidos pelo meio em quantidades suficientes às requeridas pelos propágulos. A diminuição dessa proporção de 36 para 26% no Mn, se explica porque esse micronutriente foi o único que apresentou uma taxa de absorção constante durante todo o cultivo, enquanto que, os outros no início, absorveram maior quantidade.

A análise química do meio, no início do cultivo, mostrou que o mesmo apresentava: 100:91:40,9:18,6:7,3 de Fe:Mn:Zn:B:Cu, respectivamente. Quando se compararam essas relações com as das plantas, verifica-se que tanto o Mn como o Cu estão em uma proporção bem maior no meio que nos propágulos. Por outro lado, ao final dos sessenta dias de cultivo, o meio ainda continha 29,9% de Fe, 58,5% de Zn, 77,3% de Mn, 78,4% de Cu e 49,7% de B, remanescentes da quantidade inicial, indicando que o Zn, Mn, Cu e B estão em quantidades excessivas no meio básico MS. No caso específico do Cu, a análise da quantidade presente no meio utilizado revelou ser 67 vezes superior ao Cu recomendado para o meio básico MS, o qual pode ser devido a impurezas dos reagentes e do ágar utilizado.

Do exposto, em resposta às hipóteses 1 e 2 formuladas no início do presente trabalho, pode-se inferir que o meio MS possui baixo nível de P para o cultivo de propágulos de bananeira; que a concentração de P pode ser duplicada no meio e as dos micronutrientes Zn, Mn, Cu e B podem ser reduzidas, para aproximar as proporções extraídas pelos propágulos e favorecer o crescimento por um período mais longo.

Em relação ao melhor período de tempo para a repicagem (hipótese 3), aos trinta dias os propágulos apresentavam um bom crescimento em altura, no número de folhas e gemas (parâmetros importantes na multiplicação), e com pequeno número de raízes, que não são desejáveis na fase de multiplicação, e sim no período de aclimação, além de boas condições nutricionais, tornando o período em torno dos trinta dias aconselhável para a repicagem.

5. CONCLUSÕES

Pela análise dos resultados do presente trabalho foi possível tirar as seguintes conclusões:

- 1- Propágulos de bananeira desenvolvidos no meio básico MS, apresentaram condições apropriadas para repicagem aos 30 dias, pelo bom desenvolvimento em altura, número de folhas e gemas, com poucas raízes, e boas condições nutricionais.
- 2- No cultivo de explantes de bananeira *in vitro* no meio básico MS semi-sólido, o pH inicial se reduz rapidamente atingindo o equilíbrio aos 5 dias de cultivo, ficando em torno de 4,0, e permanecendo constante até os 60 dias de cultivo.
- 3- Os propágulos de bananeira cultivados em meio básico MS, apresentaram as maiores taxas de absorção de todos os nutrientes, exceto para o Mn, durante os primeiros 20 dias de cultivo; no Mn a taxa de absorção permaneceu constante durante todo o período de cultivo.
- 4- O rizoma, pseudocaule e folhas dos propágulos de bananeira se diferenciam quanto a concentração e extração ou acúmulo de nutrientes.
- 5- As quantidades de macronutrientes totais absorvidas pelos propágulos seguiram a ordem: $K > N > Ca \geq P > Mg \cong S$, apresentando as proporções 100:79:10:10:6:6, aos 30 dias, e 100:81:12:8:6:6 aos 60 dias de cultivo, respectivamente.

- 6- As quantidades de micronutrientes totais absorvidas pelos propágulos seguiram a ordem: $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{B} > \text{Cu}$ apresentando as proporções: 100:26:28,9:17,2:2,4 aos 30 dias e 100:36:28:16,6:2,7, aos 60 dias.
- 7- O Fe foi o micronutriente absorvido em maior quantidade apresentando uma relação $\text{K/Fe} \cong 130$ que permaneceu constante a partir dos 20 dias até o final do cultivo.
- 8- A absorção de S, Zn e B pelos propágulos de bananeira está intimamente relacionada a absorção de P, de maneira que, quando cessa a absorção de P também cessa a absorção desses nutrientes.
- 9- Dentre os nutrientes estudados, o P foi o mais rapidamente absorvido pelos propágulos, extraindo 75% do P inicial do meio, nos primeiros 30 dias de cultivo; cessando sua absorção aos 50 dias, quando ainda 9% de P permanecia no meio de cultivo.
- 10- O meio básico MS possui baixo teor de P para o cultivo de propágulos de bananeira e sua concentração pode ser duplicada no meio, enquanto que as concentrações dos micronutrientes Zn, Mn, Cu e B podem ser reduzidas, para aproximar as proporções extraídas pelos propágulos e favorecer o crescimento por um período mais longo.
- 11- No preparo do meio de cultivo é necessária a verificação do teor de Cu nos reagentes, principalmente no ágar para evitar problemas de excesso e toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAQUINE, M. In vitro propagation of bananas. **Actes de l'Institut Agronomique et Vétérinaire**, v.9, n.2, p.5-9, 1989. /Resumo 2581 em **Horticultural Abstracts**, v.62, n.3, p.311, mar. 1992/.
- ASHKAR, S.A; RIES, S.K. Lettuce tipburn as related to nutrient imbalance and nitrogen composition. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.96, n.4, p.448-452, 1971.
- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.55-60, 1993.
- ALVES, E.J. Principais cultivares de banana no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.12, n.3, p.45-61, 1990.
- ANJORIN, H.O.; OBIGBESAN, G.O. Influence de la fertilisation azotée sur la croissance et le développement précoces du plantain (*Musa paradisiaca*). **Fruits**, v.38, n.4, p.300-302, 1983.
- AZEREDO, J.A. de; GENÚ, P.J.C.; AQUINO, A.R.L.de.; CAMPELO JUNIOR, J.H.; RODRIGUEZ, A.P.M. Nutrição mineral e adubação da bananeira. In: HAAG, H.P., (Coord.) **Nutrição mineral e adubação de frutíferas tropicais**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.59-102.

- BAKRY, F.; LAVARDE-GUIGNARD, F.; ROSSIGNOL, L.; DEMARLY, Y.
Développement de pousses végétatives à partir de la culture *in vitro* d'explants
inflorescentiels de bananiers (*Musa* sp., Musacées). **Fruits**, v.40, n.7/8 p.459-465, 1985.
- BANERJEE, N.; DeLANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation
and storage under minimal growth conditions of *Musa* (Banana and plantain). **Plant Cell
Reports**, v.4, p.351-354, 1985.
- BARROSO, M. LEVA, A.R. MURILLO, J.M. La moltiplicazione del melo con la tecnica
della micropropagazione. Influenza del mezzo nutritivo sul contenuto di alcuni elementi
minerali nel callo e negli espianti di mela cv. Golden Delicious. **Rivista Della
Ortofrutticoltura**, v.69, p.123-131, 1985.
- BEAR, F.E. **Chemistry of the soil**. 2. ed. New York: Reinhold Publi. 1964. 515p.
- BLAKESLEY, D. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of *Musa* and
Rhododendron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.25, p.69-74, 1991.
- BRESSAN, P.H.; KIM, I.J.; HYNDMAN, S.E; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.
Factors affecting *in vitro* propagation of rose. **Journal of the American Society for
Horticultural Science**, v.107, n.6, p.979-990, 1982.
- BRUN, J. Le "bleu" du bananier en Guinée Française. **Fruits**, v.7, n.7, p.324-329, 1952.
- CALDAS, L.S. Cultura de tecidos em bananeira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE
BANANEIRA PRATA 1., Cariacica, 1983. **Anais**. Cariacica: EMCAPA, 1983. p.106-
112.

- CARVALHO, J.G. de; PAULA, M.B. de; NOGUEIRA, F.D. Nutrição e adubação da bananeira. **Informe Agropecuário**, v.12, n.133, p.20-32, 1986.
- CHARPENTIER, J.M.; MARTIN-PRÉVEL, P. Culture sur milieu artificiel. Carences atténuées ou temporaires en éléments majeurs. Carences en oligo-éléments chez le bananier. **Fruits**, v.20, n.10, p.521-557, 1965.
- CONGARD, B.; BEAUJARD, F.; VIEMONT, J.D. Les bruyères *in vitro*. VI. Croissance de *Calluna vulgaris* sur milieu strictement nitrique ou ammoniacal et cinétique du pH en fonction du développement des plantes. **Canadian Journal of Botany**, v.64, p.959-964, 1986.
- CORGAN, J.N.; COTTER, D.J. The effects of several chemical treatments on tipburn of head lettuce. **HortScience**, v.6, n.1, p.19-20, 1971.
- COTE, F.; ALVARD, D.; DOMERGUE, R.; NAVARRO-MASTACHE, L.; TEISSON, C. Micropropagation *in vitro* du bananier. **Fruits**, n. special, p.112-118, 1990.
- COX, E.A.; STOTZKY, G.; GOOS, R.D. In vitro culture of *Musa balbisiana* Colla embryos. **Nature**, v.185, n.4710, p.403-404, 1960.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. **Annals of Botany**, v.53, p.321-328, 1984.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. Aseptic multiplication of banana from excised floral apices. **HortScience**, v.20, n.4, p.770-771, 1985.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. Banana (*Musa* spp.). /In: BAJAJ, Y.P.S./ **Trees I**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 515p. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1).

- DALTON, C.C.; IQBAL, K.; TURNER, D.A. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.472-476, 1983.
- DANTAS, A.P.; FERRAZ, L.; SILVA, A.Q. da; SOUZA, M.M. de REIS, O.V. dos. Estudo de adubação fosfatada em bananeira cv. prata (*Musa* sp). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4, Salvador. 1977. **Anais**. Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1978. p.59-63.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.270-276, 1983.
- DESAMERO, N.V.; ADELBERG, J.W.; HALE, A., YOUNG, R.E.; RHODES, B.B. Nutrient utilization in liquid/membrane system for watermelon micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.265-271, 1993.
- DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Micropropagation of *pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p.191-199, 1990.
- DREW, R.A. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grown trees. **HortScience**, v.23, n.3, p.609-611, 1988.
- DUNWELL, J.M. Anther culture in *Nicotiana tabacum*: The role of the culture vessel atmosphere in pollen embryo induction and growth. **Journal of Experimental Botany**, v.30, n.116, p.419-428, 1979.
- DUNWELL, J.M. *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three *Brassica* species. **Journal of Experimental Botany**, v.32, n.129, p.789-799, 1981.

- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. **Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura-1984**. Programa Nacional de Pesquisa da Banana: p.59-107. Cruz das Almas, 1985.
- FAO. PRODUCTION YEARBOOK-1993, v.47, p.166-167, 1994.
- FOX, R.L. KANG, B.T.; WILSON, G.F. A comparative study of the sulfur nutrition of banana and plantain. **Fruits**, v.34, n.9, p.525-534, 1979.
- GALLO, J.R.; BATAGLIA, O.C.; FURLANI, P.R.; HIROCE, R.; FURLANI, A.M.C.; RAMOS, M.T.B. Composição química inorgânica da bananeira (*Musa acuminata* Simmonds, cultivar nanicão). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.24, n.1, p.70-79, 1972.
- GALLO, J.R.; HIROCE, R.; BATAGLIA, O.C.; FURLANI, P.R.; FURLANI, A.M.C. e RAMOS, M.T.B. Situação nutricional de bananeiras do Estado de São Paulo. **Ciência e Cultura**, v.26, n.4, p.355-359, 1974.
- GARCIA, R.; GUIJARRO, R.; DIAZ, B. Modificaciones del estado nutricional del banano por efecto del potasio en suelos rojos de Cuba. Relación con el rendimiento y control de la fertilidad. **Revista de la Potasa**, v.10, p.1-7, 1980.
- GAUTHERET, R.J. The nutrition of plant tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v.6, p.433-484, 1955.
- GODINHO, F. P.; SILVA, C.R.R.; PASQUAL, M.; MARCIANI-BENDEZU, J. Comparação entre concentração de 6 benzilaminopurina na produção de mudas de bananeira (*Musa* sp.), pelo método de propagação rápida "in vivo". **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, n.3, p. 173-177, 1991.

- GOMES, J.A. Absorção de nutrientes pela bananeira cultivar prata (*Musa* AAB, subgrupo prata) em diferentes estádios de desenvolvimento. Piracicaba, 1988. 98p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA; CNPH, 1990. p.99-169.
- GUPTA, P.P. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, p.33-39, 1986.
- GUPTA, P.K.; MEHTA, U.J.; MASCARENHAS, A.F. A tissue culture method for rapid clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus torrelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v.2, p.296-299, 1983.
- HEDGE, D.M.; SRINIVAS, K. Growth, yield, nutrient uptake and water use of banana crops under drip and basin irrigation with N and K fertilization. **Tropical Agriculture**, v. 68, n.4, p.331-334, 1991.
- HELGESON, J.P. The cytokinins. **Science**, v.161, p.974-981, 1968.
- HERNANDEZ, M.; LÓPEZ, C.; SOTO, M. Variación estacional de los contenidos foliares en el clon "gran e nano" en relacion com el potasio aplicado al suelo en la zona de Cariari, Pococi. In: REUNION ACORBAT, 7, San José, 1985. p.1-14.
- HEWITT, C.W. Leaf analyses as guide to the nutrition of banana. **Empire Journal of Experimental Agriculture**, v.23, n.89, p.11-16, 1955.

HWANG, S.C.; CHEN, C.L.; LIN, J.C.; LIN, H.L. Cultivation of banana using plantlets from meristem culture. **HortScience**, v.19, n.2, p.231-233, 1984.

JUSTE, C. Actions toxiques des oligo-éléments. **Annales Agronomiques**, v.21, n.5, p.549-571, 1970.

KLEIN, R.M.; MANOS, G.E. Use of metal chelates for plant tissue cultures. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.88:p.416-425, 1960.

KWA, M.; GANRY, J. Utilisation agronomique des vitroplants de bananier. **Fruits**, n. special, p.107-111, 1990.

LACOEUILHE, J.J.; GODEFROY, J. Un cas de carence en phosphore en bananeraie. **Fruits**, v.26, n.10, p.659-662, 1971.

LAHAV, E. Effect of different amounts of potassium on growth of the banana. **Tropical Agriculture**, v.49, n.4, p.321-335, 1972

LAHAV, E. L'aptitude de l'échantillonnage du pétiole à la détermination des teneurs en minéraux du bananier. **Fruits**, v.32, n.5, p.297-307, 1977.

LAHAV, E.; BAREKET, M.; ZAMET, D. The effects of organic manure, KNO₃ and poly-feed on the nutritional balance of a banana plantation under drip irrigation. **Fruits**, v.36, n.4, p.209-216, 1981.

LAHAV, E.; TURNER, D.W. **Banana nutrition**. Berne: IPI, 1983, 62p. (IPI. Bulletin, 7).

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* da bananeira 'Prata' através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.11, p.1613-1617, 1990.

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Efeito do tamanho do explante no desenvolvimento *in vitro* da bananeira (*Musa acuminata* Colla) cultivares 'Prata' e 'Nanicão'. **Ciência e Prática**, v.12, n.2, p.207-211, 1988.

LANGENEGGER, W.; SMITH, B.L. The effect of potassium application on tissue and soil K, and their relationship to yield of bananas (cv. 'Dwarf cavendish'). **Fruits**, v.41, n.12, p.709-712, 1986.

LAXMIKANTH, D.M.; NATARAJA, K. Micropropagation of banana through shoot tip culture. **Current Science**, v.58, n.3, p.140-141, 1989.

LEE, S.W.; HWANG, S.C.; TANG, C.Y. Application and improvement of micropropagation technique of banana in Taiwan. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 8., Firenze, 1994. **Abstracts**. Firenze: F.& F. Parretti Grafiche Firenze, 1994. p.55.

LETHAM, D.S. Chemistry and physiology of kinetin-like compounds. **Annual Review of Plant Physiology**, v.18, p.349-364, 1967.

LEVA, A.R.; BARROSO, M.; MURILLO, J.M. La moltiplicazione del melo con la tecnica della micropropagazione. Variazione del pH in substrati diversi durante la fase di moltiplicazione. **Rivista della Ortoflorofrutticoltura**, v.68, p.483-492, 1984.

LORETI, F.; MORINI, S.; CONCETTI, S. Effect of potassium and nitrogen concentration on growth of peach shoots cultured *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v.227, p.311-317, 1988.

MacCARTHY, J.J.; RATCLIFFE, D.; STREET, H.E. The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don Cells growth in batch culture. **Journal of Experimental Botany**, v.31, n.124, p.1315-1325, 1980.

MacRAE, S.; STADEN, J. van. *In vitro* culture of *Eucalyptus grandis*: effect of gelling agents on propagation. **Journal Planta Physiológica**, v.137, p.249-251, 1990.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 528p.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A de **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: NAGY, 1989. 201p.

MANICA, I.; DEFELIPO, B.V.; CONDÉ, A.R.; LINO, J.; PASSOS, L.C.C. Resposta da bananeira (*Musa acuminata* Simmonds e Sheperd) cv. nanicão à adubação com três níveis de nitrogênio, fósforo e potássio. **Revista Ceres**, v.25, n.142, p.549-553, 1978.

MANTE, S.; TEPPER, H.B. Propagation of *Musa textilis* Neé plants from apical meristem slices *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.2, p.151-159, 1983.

MARCHAL, J.; MARTIN-PRÉVEL, P. Les oligo-éléments Cu, Fe, Mn, Zn dans le bananier. Niveaux foliaires et bilans. **Fruits**, v.26, n.7/8, p.483-500, 1971.

- MARCHAL, J.; SENS, I.; TEISSON, C. Influence des sucres et de facteurs bioclimatiques sur la culture *in vitro* du bananier. **Fruits**, v.47, n.1, p.17-24, 1992.
- MARCIANI-BENDEZÚ, J.; SILVA, C.R.R. e; GODINHO, F.P. Cultivares de bananeiras. **Informe Agropecuário**, v.12, n.133, p.8-11, 1986.
- MARINOS, N.G. Studies on submicroscopic aspects of mineral deficiencies. I. Calcium deficiency in the shoot apex of barley. **American Journal of Botany**. v.49, p.834-841, 1962.
- MARTIN-PRÉVEL, P. Os elementos minerais da bananeira e dos seus frutos. **Fertilité**, v.22, p.3-14, 1964.
- MARTIN-PRÉVEL, P. La nutrition minérale du bananier dans le monde. **Fruits**, v.35, n.9, p.503-518, 1980.
- MARTIN-PRÉVEL, P.; CHARPENTIER, J.M. Cultivada em meio artificial. Sintomas de carência em seis elementos minerais na bananeira. **Fertilité**, v.22, p.15-50, 1964.
- MATEILLE, T.; FONCELLE, B. Micropropagation of *Musa* AAA cv. Poyo in the Ivory Coast. **Tropical Agriculture**, v.65, n.4. p.325-328, 1988.
- MEDINA, J.C. Banana: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 3. ed. Campinas: ITAL, 1990. 302p. (ITAL. Frutas Tropicais, 3).
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Berne: International Potash Institute, 1979.

- MENGEL, K; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 3 ed. Berne: International Potash Institute, 1982. 665p.
- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.25, p.91-98, 1991.
- MOHAN RAM, H.Y.; STEWARD, F.C. The induction of growth in explanted tissue of the banana fruit. **Canadian Journal of Botany**, v.42, p.1559-1579, 1964.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.
- MURRAY, D.B. The effect of deficiencies of the major nutrients on growth and leaf analysis of the banana. **Tropical Agriculture**, v.37, n.2, p.97-106, 1960.
- NEVES, R.L.L.; FERREYRA, F.F.H.; MACIEL, R.F.P.; FROTA, J.N.E. Extração de nutrientes em banana (*Musa* sp) cv. Pacovan. **Ciência Agronômica**, v.22, n.1/2, p.115-120, 1991.
- NÓBREGA, A.C. Adubação mineral, orgânica e calagem da bananeira cultivar Prata. In: SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE BANANEIRA PRATA. 1. Cariacica, 1983. **Anais Cariacica**: EMCAPA, 1983. p.46-69.
- NOGGLE, G.R.; FRITZ, G.J. **Introductory plant physiology**. New Jersey: Prentice-Hall, 1976. 688p.

- NORTON, K.R. Boron deficiency in bananas. **Tropical Agriculture**, v.42, n.4, p.361-365, 1965.
- OKOLE, B.N.; SCHULZ, F.A. Morphogenesis and plant regeneration from microexplants of banana and plantain leaf segments. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 8., Firenze, 1994. **Abstracts**. Firenze: F. & F. Parreti grafiche, 1994. p.13.
- PALZKILL, D.A.; TIBBITTS, T.W.; STRUCKMEYER, B.E. High relative humidity promotes tipburn on young cabbage plants. **HortScience**, v.15, n.5, p.659-660, 1980.
- PALZKILL, D.A.; TIBBITTS, T.W.; WILLIAMS, P.H. Enhancement of calcium transport to inner leaves of cabbage for prevention of tipburn. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.101, n.6, p.645-648, 1976.
- RÉDEI, G.P. 'Fructose effect' in higher plants. **Annals of Botany**, v.38, p.287-297, 1974.
- SAMUELS, G.; BEALE, A.; TORRES, S. Nutrient content of the plantain (Musa, AAB Group) during growth and fruit production. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**, v.62, n.2, p.178-185, 1978.
- SHA, L.; McCOWN, B.H.; LLOYD, A.P. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, n.5, p.631-634, 1985.
- SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. **Informe Agropecuário**, v.12, n.133, p.11-19, 1986.

SINGHA, S. Influence of agar concentration on in vitro shoot proliferation of *Malus* sp. 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.107, n.4, p.657-660, 1982.

SINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.11, p.209-220, 1987.

SINGHA, S.; TOWNSEND, E.C.; OBERLY, G.H. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured in vitro on varying concentrations of three commercial agars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, n.3, p.407-411, 1985.

SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v.5, p.292-294, 1986.

SMITH, R.H.; MURASHIGE, T. In vitro development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, v.57, n.5, p.562-568, 1970.

SOUZA JÚNIOR, M.T.; CALBO, M.E.R. Avaliação da propagação in vitro das bananeiras maçã e nanicão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., Campinas. 1987. **Anais**. Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v.1. p.135-139.

STOVER, R.H.; BUDDENHAGEN, I.W. Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. **Fruits**, v.41, n.3, p.175-191, 1986.

SWAMY, R.D.; RAO, N.K.S.; CHACKO, E.K. Tissue culture propagation of banana. **Scientia Horticulturae**, v.18, n.3, p.247-252, 1983.

THIBODEAU, P.O.; MINOTTI, P.L. The influence of calcium on the development of lettuce tipburn. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.94, n.4, p.372-376, 1969.

TURNER, D.W.; BARKUS, B. Some factors affecting the apparent root transfer coefficient of banana plants (cv. 'Williams'). **Fruits**, v.36, p.607-613, 1981.

TURNER, D.W.; BARKUS, B. The effect of season, stage of plant growth and leaf position on nutrient concentration in banana leaves on a Krasnozem in New South Wales. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, v.14, n.66, p.112-117, 1974.

TWYFORD, I.T. Banana nutrition: a review of principles and practice. **Journal Science Food Agriculture**, v.18, p.177-183, 1967.

TWYFORD, I.T.; WALMSLEY, D. The status of some micronutrients in healthy robusta banana plants. **Tropical Agriculture**, v.45, n.4, p.307-315, 1968.

VELIKY, I.A.; ROSE, D.; ZINK, M.W. Uptake of magnesium by suspension cultures of plant cells (*Ipomoea* sp). **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.1143-1147, 1977.

VESSEY, J.C.; RIVERA, J.A. Meristem culture of bananas. **Turrialba**, v.31, n.2, p.162-163, 1981.

VUYLSTEKE, D.; DeLANGHE, E. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, v.62, n.4, p.323-328, 1985.

- WALMSLEY, D.; TWYFORD, I.T. The mineral composition of the robusta banana plant V. Sulphur, iron, manganese, boron, zinc, copper, sodium and aluminium. **Plant and Soil**, v.45, p.595-611, 1976.
- WEAVER, R.J. **Plant growth substances in agriculture**. San Francisco: W.H. Freeman, 1972. 594p.
- WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition *in vitro* - a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, v.41, p.237-251, 1993.
- WILLIAMS, R.R.; TAJI, A.M.; WINNEY, K.A. The effect of *Ptilotus* plant tissue on pH of in vitro media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.22, p.153-158, 1990.
- WONG, W.C. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, p.159-166, 1986.
- WOLF, B. Improvements in the Azomethine-H method for determination of boron. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.5, p.39-44, 1974.
- YU, D.; MEREDITH, C.P. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.111, n.6, p.972-975, 1986.
- ZINK, M.W.; VELIKY, I.A. Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductases in cultured *Ipomoea* cells. **Canadian Journal of Botany**, v.55, n.12, p.1557-1568, 1977.