



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



LUCYMEIRE SOUZA MORAIS LINO

**OBTENÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES DE BANANEIRA (*MUSA*
spp.) E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA DAS PLANTAS
REGENERADAS**

Feira de Santana, BA
2009

LUCYMEIRE SOUZA MORAIS LINO

**OBTENÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES DE BANANEIRA (*MUSA*
spp.) E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA DAS PLANTAS
REGENERADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. José Raniere Ferreira de Santana
Co-orientadores: Dr^a. Janay Almeida dos Santos Serejo
Dr. Edson Perito Amorim

Feira de Santana, BA
2009

Aos meus pais Risoleta (*in memorian*) e Antonio Moraes (*in memorian*), os grandes incentivadores da minha educação, pelo amor e lição de vida, e ao meu marido Joselito pelo amor, apoio e companheirismo nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

A DEUS o Grande Arquiteto Do Universo, pela minha existência.

A Universidade Estadual de Feira de Santana, especialmente ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia (UEFS/Fiocruz), pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical pela liberação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Biologia Molecular para desenvolvimento dos experimentos.

A Fapesb pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof^o. Dr. Raniere pela confiança e orientação.

A Dr^a. Janay Almeida dos Santos Serejo, confiança, orientação e por disponibilizar os recursos para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, em especial, pelas oportunidades, confiança, e por disponibilizar todos os recursos para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Edson Perito Amorim e Dr^a Vanusia Amorim, pelas orientações e ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao secretário do PPGBiotec, Helton pela disposição, educação, amizade e humildade.

Aos meus amigos de todas as horas Juraci, Honorato, Frederico e Tânia, pela amizade e companheirismo, sempre.

As estudantes de graduação Kelly e Carine pela ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos pesquisadores do Laboratório de cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical Antônio da Silva Souza, Adilson Kenji Kobayashi, Fernanda Vidigal Duarte de Souza e Tatiana Jungmans.

Ao pesquisador Carlos Alberto da Silva Lédo da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelas análises estatística.

A todos os funcionários e estagiários dos laboratórios de Cultura de Tecidos e de Virologia e Biologia molecular pelo apoio e companheirismo.

A todos os funcionários do setor de práticas culturais da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pela ajuda e colaboração no decorrer das avaliações, especialmente a Paulo Laesso e Bizunga.

Aos colegas da turma de 2006 do doutorado em Biotecnologia Uefs/Fiocruz, principalmente a Helna e Iraíldes, cabem aqui, a eles o muito obrigado pelo companheirismo.

A toda a equipe de campo da Embrapa que sempre esteve de pé e a ordem para ajudar no que fosse preciso.

Aos meus irmãos Lícia, Luciana, Lúcia, Antonio, Ene e sobrinhos, Vanessa, Junior, Emille, Elton, Giulia e Paula pelo companheirismo.

A Joselito pelo amor incondicional, por compartilhar-mos todos os momentos importantes nas nossas vidas.

A todos aqueles que sempre se puseram de prontidão para ajudar no que fosse necessário.

A todos vocês, os meus mais profundos agradecimentos.

O homem não possui de seu senão aquilo que pode levar deste mundo. O que encontra aqui chegando e o que deixa partindo, usufrui durante toda sua estada. Mas como é forçado a abandoná-lo, resta-lhe apenas o gozo, e não a posse Real. (Allan Kardec)

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo estabelecer uma metodologia rápida e eficiente para indução de calos e embriões somáticos, estabelecimento de células em suspensão, regeneração em plantas e estudar a estabilidade genética dos regenerantes produzidos. Foram utilizadas flores masculinas imaturas de variedades de bananeira triplóides (Grande naine, Maçã e Terra) para indução embriões somáticos. Os embriões somáticos formados foram transferidos para meio de cultura líquido para estabelecimento de suspensão celular para cada variedade. Foram instalados experimentos para ajuste de protocolo de regeneração das suspensões via embriogênese somática, utilizando várias combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIA. As plantas regeneradas foram individualizadas, enraizadas e aclimatizadas em casa de vegetação e posteriormente levadas a campo. A avaliação da estabilidade genética das plantas geradas foi realizada através de caracteres agronômicos, morfológicos e moleculares (marcadores microssatélites). O tempo para indução de embriogênese em bananeira pode levar de 45 dias ('Terra') a 180 dias ('Grande naine'). Na regeneração a partir de suspensão celular, a variedade Maçã, apresentou os melhores resultados no meio de cultura MS sem acréscimo de reguladores de crescimento. Para a variedade Grande naine este mesmo meio apresentou melhores resultados para diferenciação em embriões, mas estes não foram convertidos em plantas. Na avaliação da estabilidade genética, as plantas analisadas das três variedades, através de caracteres agronômicos, morfológicos e moleculares, não apresentaram variação somaclonal, algumas plantas da variedade Terra apresentaram variação epigenética.

Palavras-chave: Variação epigenética. Suspensão celular. SSR. *Musa* sp. Embriogênese somática.

ABSTRACT

The objective of the present work was to establish a quick and efficient methodology for callus and somatic embryo induction, establishment of cell suspension, regeneration in plants and study the genetic stability of the regenerants produced. Immature male flowers of triploid banana varieties (Grande naine, Maçã e Terra) were used for the induction of somatic embryos. The somatic embryos formed were transferred to liquid culture medium for the establishment of the cell suspension for each variety. Experiments were carried out in order to adjust the regeneration protocols for the suspensions via somatic embryogenesis using many combinations of BAP and AIA regulators. The regenerated plants were individualized, rooted and acclimatized under greenhouse conditions and further taken to the field. The evaluation of the genetic stability of the plants generated was carried out using agronomical morphological and molecular (microsatellite marker) characteristics. The time for the induction of embryogenesis in bananas can take up from 45 ('Terra') to 180 days ('Grande naine'). For the regeneration of the cell suspension, the Maçã variety presented best results in MS culture medium without addition of growth regulators. For the Grande naine variety, this same medium presented best results for differentiation into embryos, but these were not converted into plants. For the evaluation of the genetic stability, plants analyzed from the three varieties using agronomical, morphological and molecular characteristics did not show any somaclonal variation, some plants of the Terra variety showed epigenetic variation.

Key-words: SSR. Somatic embryogenesis. *Musa sp.* Epigenetic variation. Cell suspension.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	10
	REFERÊNCIAS	14
	CAPÍTULO 1: CELL SUSPENSION CULTURE AND PLANT REGENERATION OF A BRAZILIAN PLANTAIN, CULTIVAR TERRA	17
1.1	INTRODUÇÃO	20
1.2	MATERIAIS E MÉTODOS	21
1.3	RESULTADOS	23
1.4	DISCUSSÃO	23
1.5	CONCLUSÕES	24
	REFERÊNCIAS	24
	CAPÍTULO 2: ESTABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE BANANEIRA ‘TERRA’ REGENERADAS A PARTIR DE SUSPENSÃO CELULAR	26
2.1	INTRODUÇÃO	29
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.3	RESULTADOS	32
2.4	DISCUSSÃO	36
	REFERÊNCIAS	38
	CAPÍTULO 3: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS MASCULINAS EM BANANEIRAS TRIPLÓIDES	42
3.1	INTRODUÇÃO	45
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.3	RESULTADOS	49
3.4	DISCUSSÃO	57
3.5	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	CAPÍTULO 4: ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE BANANEIRA ‘GRANDE NAINE’ REGENERADAS A PARTIR DE SUSPENSÃO CELULAR	64
4.1	INTRODUÇÃO	67
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.3	RESULTADOS	69
4.4	DISCUSSÃO	69
4.5	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	77
	CONCLUSÃO GERAL	80

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da bananeira assume importância econômica e social em todo o mundo, sendo cultivada em mais de 80 países tropicais, principalmente por pequenos agricultores. O Brasil é o quarto produtor mundial de banana, tendo produzido 7,0 milhões de toneladas em 2006, em uma área aproximada de 500 mil hectares. A Índia produziu, no mesmo período, 12 milhões de toneladas em 400 mil hectares (FAO, 2009). A bananeira é cultivada de Norte a Sul do País e, praticamente, toda fruta produzida é comercializada no mercado interno, representando as exportações apenas 3,4% da produção. A cultura da banana destaca-se como a segunda fruta mais importante em área colhida, quantidade produzida, valor da produção e consumo (BORGES e SOUZA, 2004). São Paulo continua sendo o primeiro estado produtor, com 1.178.140 t (17,6% da produção nacional). A Bahia detém a segunda maior (975.620 t, ou 14,6% do total) e teve um acréscimo significativo de produção entre 2004 e 2005 (11,8%), em razão de uma maior área colhida - a Bahia apresentou a maior área em 2005 (70.896 ha) e é neste estado que está o município com maior produção de banana do país, Wenceslau Guimarães (IBGE, 2009). A maioria dos bananicultores é composta por pequenos produtores que utilizam a banana como fonte de renda em seu orçamento, cabendo-lhe um papel fundamental na fixação da mão-de-obra rural.

Consumida em sua quase totalidade na forma *in natura*, a banana constitui parte integrante da alimentação das populações de baixa renda, não só pelo valor nutritivo, mas também pelo seu baixo custo. Contém vitaminas A, B e C, muito potássio, pouco sódio, nenhum colesterol e mais açúcar que a maçã (ALVES et al., 2004).

Apesar da grande importância da banana, sua produção está seriamente comprometida por diferentes enfermidades causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. Em *Musa* spp, variedades resistentes a doenças existem particularmente entre os diplóides não cultivados e a transferência dessas características para triplóides cultivados por hibridação é dificultada, principalmente devido ao fato da maioria das cultivares serem estéreis e/ou apresentar um sistema de reprodução sexual difícil (BAKRY et al., 1997).

Associada à falta de resistência às principais doenças e pragas, a maioria das variedades comerciais é pouco produtiva e tem porte alto. As cultivares mais conhecidas (Prata, Pacovan, Maçã, Grande naine e Terra) são muito suscetíveis à Sigatoka-negra e, à exceção da Terra e Maçã, são também suscetíveis à Sigatoka-amarela. Com relação ao mal-do-Panamá, as cultivares Grande naine e Terra, são resistentes, a Maçã é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis. As doenças Sigatoka-amarela e negra,

ou ainda o mal-do-Panamá, podem causar perdas na produção de até 100%, a depender da cultivar e/ou condição de cultivo. Uma das estratégias para a solução dos problemas mencionados é a criação de novas variedades.

O método de melhoramento mais utilizado em bananeira é realizado mediante o cruzamento de diplóides pré-melhorados AA com triplóides comerciais AAB, gerando híbridos tetraplóides com boas características de fruto e resistência a pragas. Esta metodologia tem sido empregada no programa de melhoramento de bananeira na Embrapa de 1982 até os dias atuais, com a obtenção de uma série de cultivares, do tipo Prata e Maçã. No entanto, esta estratégia é dificultada devido à esterilidade de alguns genótipos triplóides, como os do subgrupo Cavendish que são as de maior interesse no mercado internacional (SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2004).

O que dificulta o melhoramento convencional (cruzamentos) é a ausência de sementes nas cultivares de banana, o que pode ser devido à inexistência de pólen viável e/ou de polinizadores naturais eficientes. As cultivares que não produzem sementes quando polinizadas ou aquelas que produzem em pequena quantidade podem ser tanto diplóides quanto triplóides, onde a ausência desta característica está relacionada à intensa seleção agrônômica, sendo um reflexo do processo de domesticação da espécie (SILVA et al., 2002).

Um dos maiores desafios dos programas de melhoramento de plantas alógamas, autógamas e de propagação vegetativa é a redução do tempo de lançamento de novas e melhores cultivares. A duração do programa, naturalmente depende dos métodos de melhoramento empregados, e vários anos são despendidos nas etapas de recombinação e seleção de materiais superiores e outros tantos na multiplicação destes materiais para fins de comercialização. A cultura de tecidos oferece opções que podem acelerar algumas fases do melhoramento, como a germinação precoce de sementes *in vitro* para aumentar o rendimento dos cruzamentos de algumas culturas, a produção de plantas dihaplóides por meio da cultura de anteras ou micrósporos para encurtar o processo de desenvolvimento de linhagens puras (FERREIRA et al., 1998).

A cultura de tecidos envolve um conjunto de técnicas, mediante as quais um explante é cultivado de forma asséptica em um meio nutritivo e sob condições controladas de temperatura e luminosidade. Estas técnicas tem se constituído em um instrumento valioso para o desenvolvimento da agricultura, especialmente quando associadas às áreas de melhoramento genético, fitossanidade e fitotecnia (SOUZA et al., 2006). As mesmas são empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas, em

uma ou outra etapa do melhoramento, oferecendo novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e muitas vezes oferecem soluções únicas (BINSFELD et al., 2000), como o emprego da cultura de embriões, visando introgressão gênica por meio de cruzamentos entre indivíduos distantes. Da mesma forma, a incorporação de genes via transformação genética, depende da cultura de células, tecidos ou órgãos para regenerar plantas *in vitro*. A quebra de barreiras de incompatibilidade genética pré e pós-zigóticas onde não ocorre a formação do zigoto e, conseqüentemente, da semente, podem ser contornadas pelo uso da polinização *in vitro* ou fusão de protoplastos (TORRES et al., 1998; FERREIRA et al., 1998).

A micropropagação é o uso de mudas provenientes do cultivo *in vitro*, que oferece possibilidades para aumentar de maneira considerável o número de plantas dentro de um curto espaço de tempo (SOUZA et al., 1997), além de possibilitar a oferta de mudas sadias, livres de bactérias, fungos e nematóides. Em bananeira, a depender do genótipo, a propagação é mais ou menos problemática com relação às taxas de multiplicação. O número de mudas produzidas em campo é sempre proporcional à taxa obtida no laboratório. Algumas variedades de bananeira como a Caipira apresentam uma alta taxa de propagação, outras, como a tipo 'Terra' multiplicam-se muito pouco. Para cada cultivar de bananeira deve-se aplicar um procedimento diferenciado no processo de micropropagação, considerando os diferentes genótipos, a fim de se evitar alterações na qualidade genética da muda (SANTOS e RODRIGUES, 2004).

Embriogênese somática é a produção de embriões, e posteriormente plantas inteiras, a partir de uma única ou um conjunto de células vegetativas ou somática. A fonte de explante ou célula, pode vir de qualquer parte da planta como folha, talo, raiz, hipocótilo, flores, podendo incluir células altamente especializadas como mesófilo foliar, epiderme e grãos de pólen, de uma espécie. O programa de desenvolvimento dos embriões somáticos é bem parecido ao de embriões zigóticos, embora haja algumas diferenças, como falta do suspensor e as divisões das células podem não ser ordenadamente ou padronizado como em embriões zigóticos, mas seguem as mesmas fases, pré-globular, globular, coração, torpedo, e assim por diante (SRIVASTAVA, 2002).

Embriões somáticos são utilizados para obtenção de suspensões celulares em meio líquido, onde estas são mantidas sob condição de agitação, subcultivadas semanalmente e nestas condições as células se dividem e multiplicam ativamente. Estas células podem ser utilizadas para trabalhos de transformação genética, hibridação somática, propagação massal,

criopreservação, sementes sintéticas, mutação e duplicação cromossômica. No entanto, para a eficiência destes métodos e para que a embriogênese somática venha a ser o sistema de micropropagação do futuro, torna-se necessário que ocorram melhorias nos protocolos regenerativos (GUERRA et al., 1999).

A cultura de células em suspensão e a regeneração via embriogênese somática podem ser, técnicas promissora para a obtenção de grandes quantidades de mudas qualificadas com baixo custo de produção (MATSUMOTO e SILVA NETO, 2003). A variação somaclonal apresenta aplicação importante no melhoramento genético, mas é problema muito grave na micropropagação a partir de gemas ou através de embriogênese somática. Segundo Côte et al. (2000), a taxa de variação somaclonal em trabalhos utilizando embriogênese somática é bastante baixa em algumas variedades de banana. A fidelidade clonal é um dos mais importantes pré-requisitos na micropropagação de qualquer espécie em cultivo. Um dos grandes problemas freqüentemente encontrados com as culturas *in vitro* é a presença de variação somaclonal, entre subclones de uma linha parental, decorrentes diretamente da cultura *in vitro* de células vegetais, tecidos ou órgãos (VENKATACHALAM et al., 2007). Os microssatélites podem servir como marcadores altamente sensíveis para monitorar a variação genética, sinalizando o potencial deletério de mutações durante o cultivo *in vitro*, porque eles refletem uma taxa relativamente elevada de mutação, correspondendo ao grau de variabilidade genética (LOPES et al., 2006; BURG et al., 2007; WILHELM et al., 2005). A variação, ou instabilidade, observada em microssatélites muitas vezes corresponde a uma alteração no tamanho das seqüências simples repetidas (LEROY et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de suspensão celular e avaliar a estabilidade genética das plantas regeneradas das variedades de bananeira Terra, Maçã e Grande naine.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. J. **Propagação**. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Eds.), O cultivo da bananeira. p. 59-86. 2004.
- BAKRY, F. et al. **Les bananiers**. In: CHARRIER, A., JACQUOT, M., HAMON, S.; NICOLAS, D. (Eds.), L'amélioration des Plantes Tropicales, p. 109-139. 1997. Cirad, Montpellier/ORSTOM, Bondy.
- BINSFELD, P. C.; PETERS, J. A.; SCHNABL, E. H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e indução de micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Pelotas, v. 12, p. 263-272. 2000.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **Condições edafoclimáticas**. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Eds), O cultivo da bananeira. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 279 p. 2004.
- BURG, K. et al. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. **Journal Experimental Botany**, Inglaterra, v. 58, p. 687-698. 2007.
- CÔTE, F. X. et al. Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grande naine). **Euphytica**, Lavras, v. 112, p. 245-251. 2000.
- FAO**. Food and Agricultural Organization. Disponível em: <[http:// apps.fao.org/page/collections](http://apps.fao.org/page/collections)>. 2009. Acesso em 5 junho 2009.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. **Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de Tecidos e Transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 21-43.
- GUERRA, M. P; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somáticas e sementes sintéticas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa- SPI/Embrapa-CNPQ, 1999. p. 533-568.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em : <HTTP://www.ibge.gov.br>. 2009. Acesso em 05 de agosto de 2009.
- LEROY, X. J.; LEON, K.; BRANCHARD, M. Plant genomic instability detected by microsatellite-primers. **Electronic Journal Biotechnology**, Chile, v. 3, p. 5–10. 2000.

- LOPES, T. et al. Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. **Tree Physiology**, Victoria- Canadá, v. 26, p. 1145–1152. 2006.
- MATSUMOTO, K. ; SILVA NETO, S. P. **Micropropagation of bananas**. In: S. Mohan Jain; Katsuaki Ishii. (Org.). Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003, v. p. 353-380.
- SANTOS, C. C. C.; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar PACOVAN. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205. 2004.
- SILVA, S. O. et al. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, p. 399-436. 2001.
- SILVA, S. O.; FLORES, J. C. O.; LIMA NETO, F. P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1567-1574. 2002.
- SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. M. **Variedades**. In: BORGES, A. L; SOUZA, L. S. (Eds.). O cultivo da bananeira. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas. 2004. p. 45-58.
- SOUZA, A. S. et al. **Introdução à Cultura de Tecidos de Plantas**. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Eds). Introdução à Micropropagação de Plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.
- SOUZA, A. S. et al. **Propagação**. In: ALVES, E. J. (Org.) A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: EMBRAPA-SPI/Cruz das Almas, EMBRAPA-CNPMP, 1997. p.151-195.
- SRIVASTAVA, L. M. **Embryogenesis**. In: SRIVASTAVA, L. M. (Ed.) Plant Growth And Development - Hormones and Environment. Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada, 772 p., 2002.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. **Perspectivas da cultura de tecidos de plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de Tecidos e Transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPMP, 1998. v. 1, p. 11-20.
- VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, v. 43, n. 267-274. 2007.

WILHELM, E. et al. Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 790- 795. 2005.

CAPÍTULO I

CELL SUSPENSION CULTURE AND PLANT REGENERATION OF A BRAZILIAN PLANTAIN, CULTIVAR TERRA¹

¹ Artigo publicado no periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 43, n.10, p.1325-1330, out.2008.

RESUMO

A micropropagação de bananeira ‘Terra’ utilizando meristema apical e gemas laterais apresentam problemas de oxidação e baixa taxa de multiplicação. A regeneração de plantas a partir de suspensão celular, via embriogênese somática, além de gerar plantas geneticamente iguais à planta mãe, destaca-se por apresentar alta taxa de multiplicação e permitir o escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido, com menor custo de produção. Este trabalho teve como objetivo estabelecer células em suspensão e regeneração em plantas de bananeira ‘Terra’, via embriogênese somática. Flores imaturas da posição 4 a 14 foram retiradas de inflorescência masculina, em condições assépticas e inoculadas em meio de cultura para indução de embriogênese. Massas embriogênicas contendo embriões somáticos esbranquiçados foram transferidos para meio de cultura líquido para estabelecimento de suspensão celular. As culturas foram mantidas sob agitação de 120 rpm em condições de escuro a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo o meio de cultura renovado a cada 10 dias. Um mês após a cultura fez-se a primeira passagem das células pela peneira para retirada do material inicial. Com dois meses de subcultivos a suspensão apresentava aglomerados com tamanho variado, constituído de células densas. Com conseqüentes subcultivos observou-se que o volume das células foi dobrado a cada repicagem. Após cinco meses de subcultivo a densidade das células em suspensão foram ajustadas para 5%, diluindo-se 1 ml de células compactadas em 19 ml de meio líquido, e um ml desta suspensão foi plaqueada em quatro diferentes composições de meio de cultura contendo como compostos básicos sais e vitaminas do MS acrescido de 0,7% de Agar (Tratamento 1 - na fase de diferenciação utilizou 1.1 μM de ANA, 0.2 μM de zeatina, 0.7 μM de 2ip, 0.5 μM de kinetina, 680 μM de glutamina, 2 mM de prolina e 130 mM de sacarose; na fase maturação utilizou-se 2.2 μM de BAP e 11.4 μM de IAA; na germinação dos embriões formados utilizou-se 2 μM de BAP e 2 μM de IAA e na regeneração de plantas utilizou-se 1 μM de BAP e 1 μM de IAA: Tratamento 2 - 2.2 μM de BAP e 2.2 μM de IAA: Tratamento 3 - 2.2 μM de BAP e 11.4 μM de IAA: Tratamento 4 - 2 μM de BAP e 2 μM de IAA), nos tratamentos 2, 3 e 4 os mesmos meios foram utilizados em todas as etapas da regeneração. Quinze dias após plaqueadas, as células em meio de regeneração, observou-se o surgimento dos primeiros embriões somáticos. Após trinta dias os embriões apresentavam-se formados e foram transferidos para meio de cultura de maturação. Os embriões germinados foram transferidos para meio de regeneração para completarem seu desenvolvimento. O maior número de plantas regeneradas foi obtido quando se utilizou o meio de cultura T3 (0,500

mg.L⁻¹ de BAP e 2 mg.L⁻¹ de AIA), obtendo-se 558 plantas, seguido pelas combinações T4 (375 plantas) e T2 (323 plantas). Não foi observada nenhuma diferença em termos de regeneração da suspensão nos meios utilizados, podendo ser observado uma oxidação em massa de algumas repetições e necrose das células, diminuindo, assim, o número de plantas regeneradas. Todos os tratamentos deram origem a plantas normais com bom desenvolvimento do sistema radicular e quando aclimatizadas em casa de vegetação tiveram desenvolvimento normal. Os protocolos testados foram considerados viáveis para regeneração de plantas a partir de suspensão celular de bananeira ‘Terra’, dando origem a plantas normais.

Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra

Lucymeire Souza Morais-Lino⁽¹⁾, Janay Almeida dos Santos-Serejo⁽²⁾, Sebastião de Oliveira e Silva⁽²⁾, José Raniere Ferreira de Santana⁽¹⁾ and Adilson Kenji Kobayashi⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual de Feira de Santana, Avenida Universitária, BR116, Km 03, Campus Universitário, CEP 44031-460 Feira de Santana, BA, Brazil. E-mail: lsmorais@yahoo.com.br, raniere@uefs.br ⁽²⁾Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA, Brazil. E-mail: janay@cnpmf.embrapa.br, ssliva@cnpmf.embrapa.br ⁽³⁾Embrapa Meio-Norte, Avenida Duque de Caxias, nº 5.650, CEP 64006-220 Teresina, PI, Brazil. E-mail: adilson@cpamn.embrapa.br

Abstract – The objective of this study was to establish cell suspension culture and plant regeneration via somatic embryogenesis of a Brazilian plantain, cultivar Terra Maranhão, AAB. Immature male flowers were used as explant source for generating highly embryogenic cultures 45 days after inoculation, which were used for establishment of cell suspension culture and multiplication of secondary somatic embryos. Five semisolid culture media were tested for differentiation, maturation, somatic embryos germination and for plant regeneration. An average of 558 plants per one milliliter of 5% SCV (settled cell volume) were regenerated in the MS medium, with 11.4 μM indolacetic acid and 2.2 μM 6-benzylaminopurine. Regenerated plants showed a normal development, and no visible somaclonal variation was observed in vitro. It is possible to regenerate plants from cell suspensions of plantain banana cultivar Terra using MS medium supplemented with 11.4 μM of IAA and 2.2 μM of BAP.

Index terms: *Musa*, culture media, propagation, somatic embryogenesis.

Cultura de células em suspensão e regeneração de plantas de bananeira cultivar Terra

Resumo – O objetivo deste trabalho foi estabelecer a cultura de células em suspensão e a regeneração de plantas via embriogênese somática de bananeira cultivar Terra Maranhão, AAB. Flores imaturas masculinas foram utilizadas como fonte de explante para obtenção de culturas altamente embriogênicas 45 dias após a inoculação, as quais foram utilizadas para o estabelecimento de suspensões celulares e multiplicação de embriões somáticos secundários. Cinco meios de cultura semi-sólidos foram testados para a diferenciação, maturação, germinação dos embriões somáticos e para a regeneração de plantas. A média de 558 plantas por mililitro de 5% SCV (volume de células sedimentadas) foi regenerada, em meio MS com 11,4 μM de ácido indolacético e 2,2 μM de 6-benzilaminopurina. As plantas regeneradas apresentaram desenvolvimento normal, e não foi observada a ocorrência de variação somaclonal in vitro. É possível a regeneração de plantas a partir de células em suspensão de bananeira 'Terra' utilizando meio MS suplementado com 11,4 μM de AIA e 2,2 μM de BAP.

Termos para indexação: *Musa*, meio de cultura, micropropagação, embriogênese somática.

Introduction

Bananas and plantains (*Musa* spp.) are very important fruits for both social and economical reasons. They are worldwide cultivated in the tropical countries and constitute a staple food for nearly half a billion people. The Brazilian cultivar Terra is a French plantain consumed in stews or fried, mainly in the North and Northeast of the country. This cultivar is resistant to yellow sigatoka (*Mycosphaerella musicola* Leach)

and fusarium wilt [*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (E.F. Smith)], but it is susceptible to black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), nematodes and weevil borers [*Cosmopolites sordidus* (Germar)] (Silva et al., 2001).

The materials used for conventional propagation of banana and plantain include corms, large and small suckers, and sword suckers (Cronauer & Krikorian, 1984). However, conventional planting materials are

not the ideal propagule, because of the low number of suckers (Vuylsteke, 1989) and the fact that it could be a potential source of dissemination of weevils, fungal pathogens, nematodes, and viruses (Sagi et al., 1998). The rapid production of healthy planting material of desired clones, within a short time period, is facilitated by large-scale micropropagation. Different *in vitro* micropropagation protocols have been used in several *Musa* spp. of divergent genomic constitution and ploidy (Cronauer & Krikorian, 1984; Vuylsteke, 1989; Scott et al., 1999; Arinaitwe et al., 2000; Roels et al., 2005). However, *in vitro* propagation through shoot-tip culture has shown low level of success in some varieties, mainly due to oxidation caused by phenolic compounds that form a barrier around the tissue, preventing nutrient uptake and hindering growth (Strosse et al., 2004). Micropropagation of plantain using meristem tip culture has shown low level of success, mainly due to oxidation and low proliferation caused by a high degree of apical dominance. The presence of a B genome can also affect multiplication (Ariwnaitwe et al., 2000; Roels et al., 2005).

Somatic embryogenesis and cell suspension have been obtained for different genotypes of banana (Navarro et al., 1997; Strosse et al., 2003, 2006). Cell suspensions with high regeneration capacity have application for mass clonal propagation, germplasm handling and cryopreservation (Panis et al., 1990; Navarro et al., 1997; Kosky et al., 2002) and for improving *Musa* spp. through nonconventional strategies, i.e. protoplast culture and fusion, mutagenesis, somaclonal variation and genetic transformation (Ganapathi et al., 2001; Matsumoto et al., 2002; Assani et al., 2005; Houllou-Kido et al., 2005; Kumar et al., 2005; Pei et al., 2005). In addition, the incorporation of biotechnological procedures in breeding programs depends upon efficient and reliable plant regeneration protocols.

The objective of this work was to establish a protocol of cell suspension culture and plant regeneration via somatic embryogenesis of the Brazilian plantain cultivar Terra Maranhão, AAB, applicable for large-scale propagation, genetic transformation and somatic hybridization studies.

Materials and Methods

Explant donor plants of plantain cultivar Terra (cooking banana, AAB) are maintained at Embrapa's

Banana Germplasm Bank, in Cruz das Almas, BA, Brazil. The experiment was carried out during 2006. Male buds were harvested and peeled off in the laboratory to approximately 10 cm size. The size-reduced male buds were washed in tap water and transferred to a clean bench for further steps of surface sterilization. They were sprayed twice with 70% ethanol, and flamed. Immature flowers from the position 4 to 14, counting down from the top, were removed under stereomicroscope and placed on Petri dishes containing 30 mL of culture medium constituted of MS salts and vitamins (Murashige & Skoog, 1962), supplemented with 4.1 μM biotin, 18 μM 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid), 5.7 μM IAA (indoleacetic acid), 5.4 μM NAA (naphthaleneacetic acid), 87 mM sucrose, and solidified with 0.7% type III agarose. The pH was adjusted to 5.7 before autoclaving at 121°C for 20 min. Eight male buds, containing five explants per Petri dish, were used. The cultures were kept in the dark, at 27±1°C, for up to six months. Cultures were observed weekly for the presence of embryo formation.

Immature male flowers of the Brazilian plantain cultivar Terra, AAB, was used to induce embryogenic callus (Figure 1 A). Friable embryogenic calli with many embryos were transferred to 125 mL Erlenmeyer flasks containing 15 mL of liquid medium constituted of MS salts and vitamins supplemented with 4.5 μM 2,4-D, 680 μM glutamine, 4.1 μM biotin, 10 mg L⁻¹ ascorbic acid and 130 mM sucrose. The pH of the medium was adjusted to 5.3, before autoclaving. The cultures were maintained in the dark, at 27±2°C, in orbital shaker at 120 rpm. After one month, the cell suspension was homogenized by passing through a 0.6-mm-mesh sieve selecting the single cells and small cell aggregates. Subcultures were done at every ten days period. Cell samples were observed through an inverted microscope (Zeiss, Germany).

The density of cell suspensions was adjusted to 5% of settled cell volume (SCV) by dilution of 1 mL of settled cells into 19 mL of fresh medium. One milliliter of the diluted culture was placed on a filter paper in a Petri dish containing 35 mL of culture medium. Five different culture media were used (Table 1). Four treatments were tested, with different use sequences of culture medium for each phase of the regeneration process (differentiation, embryo maturation, germination and

whole plant regeneration) (Table 2). The culture media A, B, C and D (Assani et al., 2001; Matsumoto et al., 2002; Strosse et al., 2003) were used for cellular differentiation. The cultures were maintained in these media until plant regeneration, except for the cultures in medium A that, after embryo formation, were transferred to media C, D and E, for embryo maturation, germination and plant regeneration, respectively (Table 2). Five replications were used for each stage of regeneration, and the number of regenerated plants with roots and leaves was evaluated, at the end of the last stage of regeneration.

For plant regeneration, the cultures were kept in the dark for one month, and then transferred to a

growth chamber at $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, under white fluorescent light with 16-hour-photoperiod at $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. The cultures were kept for 30 days in the culture medium, for differentiation and maturation, 15 days in the medium for germination, and 45 days in the regeneration medium. Regenerated plants were rescued and transferred to Magenta box containing 50 mL of solid growth regulator-free MS medium, at ratio of 16 plants per box. One hundred plants were selected at random, from each treatment, for acclimatization under greenhouse conditions.

Analysis of variance was carried out using the Generalized Linear Model procedure. Means

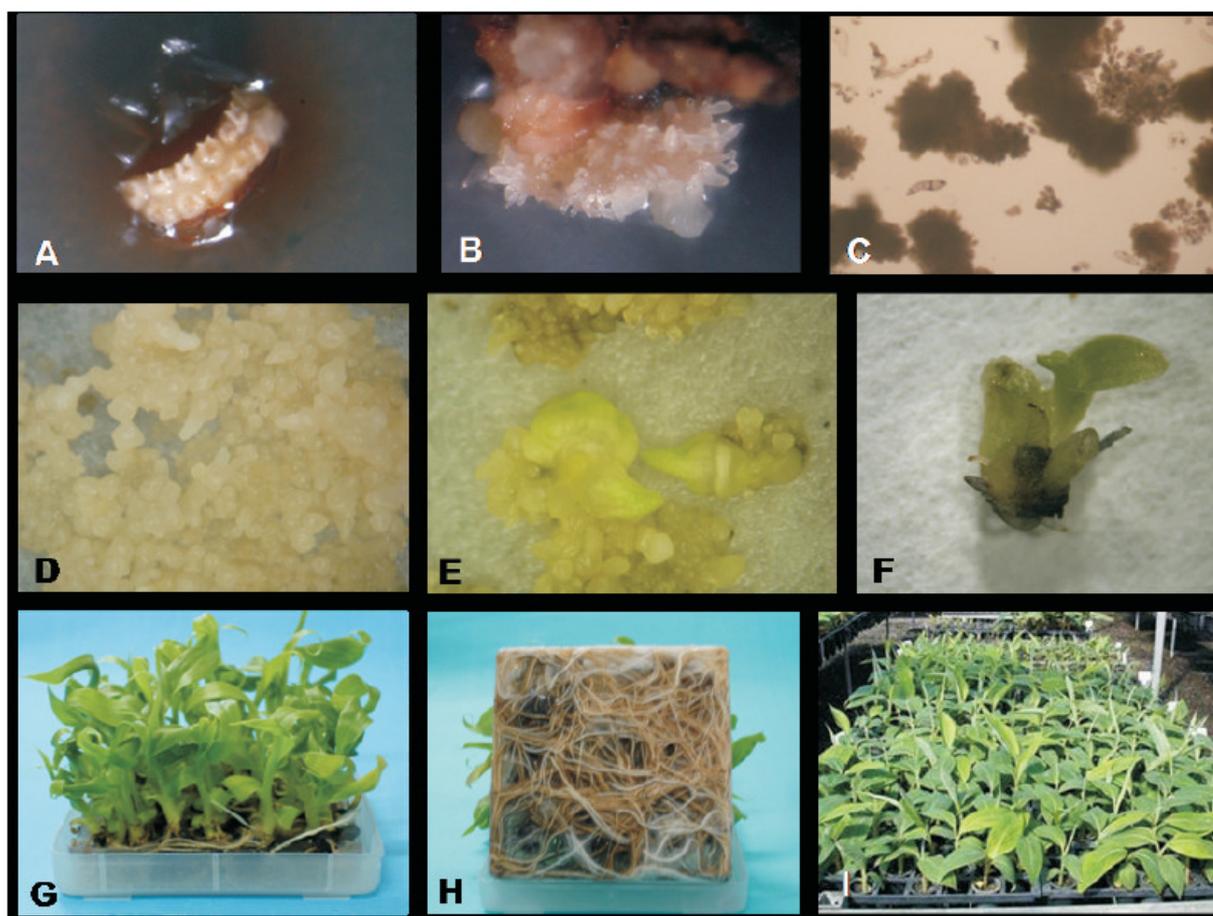


Figure 1. Plant regeneration from somatic embryos of a Brazilian plantain cv. Terra (AAB). A, initial explant, cluster of immature male flower; B, embryogenic mass bearing a group of somatic embryos; C, morphological aspects of the embryogenic suspension type II aggregates; D, somatic embryo formed after 30 days in semisolid medium; E, fully developed somatic embryos after 15 days, in medium of germination; F, germination of embryos; G and H, normal rooted plants germinated from somatic embryos, side view and bottom view, respectively; I, acclimatization of plants regenerated in greenhouse.

separation was done by the Tukey test using SAS (SAS Institute, 2000).

Results and Discussion

Forty-five days after explant inoculation, embryogenic calli appeared with numerous whitish translucent somatic embryos (Figure 1 B). Somatic embryos with similar features have been previously reported (Côte et al., 1996; Navarro et al., 1997; Khalil et al., 2002; Jalil et al., 2003). At 5–6 months of culture, 20% of the explants produced embryogenic calli (Figure 1 B). Different authors have reported that somatic embryogenesis is genotype dependent (Assani et al., 2002; Gahan & George, 2008). However, the embryogenic frequency in banana was not only dependent on the genome group, but it also varied with the variety within genome groups and even from one experiment to another (Strosse et al., 2006).

Suspension cells could be observed after two weeks of culture. Several cell types were observed: large and highly vacuolated cells, dense cytoplasm cells, single cells and cell aggregates (Figure 1 C). After homogenization, single cells and small cell aggregates were selected. After two months of cultivation,

the suspension was set up by dense cytoplasm cell aggregates. Domergue et al. (2000) have described such cells as type II ones, highly embryogenic with the producing capacity of 130,000 to 150,000 embryos m^{-1} of PCV. When the cell suspensions were 4–5 months old, fine embryogenic cells were observed as yellowish white in color. The yellow pigmentation of cytoplasm indicated the embryogenic character of the cell suspensions (Ganapathi et al., 2001; Jalil et al., 2003). The number of cells had doubled at every subcultivation period.

Early stages of embryo development could be observed two weeks after transferring to differentiation medium (Table 2). After 30 days, the embryos were completely formed (Figure 1 D). The embryos were transferred to maturation medium and maintained there for another 30 days (Figure 1 E). Mature embryos were transferred to germination medium. After 15 days, the embryos started germinating, displaying roots and leaves, and after 45 days, they were transferred to whole plant regeneration medium (Figure 1 F). All treatments generated normal and vigorous plants with good root system development (Figure 1 G and H), with few losses during the greenhouse acclimatization step (Figure 1 I), and without occurrence of morphological variation in plants. The treatment using C medium achieved the best results in all stages of the regeneration process, with an average number of 558 plants mL^{-1} of 5% SCV (Table 3). Domergue et al. (2000) got an estimated number of 154,000 embryos from 1 mL PCV for 'Grand Naine'; Strosse et al. (2006) reported estimates of 48,000 and 20,000 regenerated plants per 1 mL PCV, using cultivars from the subgroup Cavendish and plantains, respectively.

Lemos et al. (2001) used micropropagation of banana 'Terra' with traditional cultivation in semisolid media compared with a temporary immersion bioreactor, and reported that the temporary immersion system presented 2.20 times more viable shoots than the

Table 1. Composition of culture media used to obtain somatic embryogenesis of Brazilian plantain cv. Terra (ABB).

Component	Culture media ⁽¹⁾				
	A	B	C	D	E
IAA (μM)		2.2	11.4	2	1
BAP (μM)		2.2	2.2	2	1
NAA (μM)	1.1				
Zeatin (μM)	0.2				
2-ip (μM)	0.7				
Kinetin (μM)	0.5				
Glutamine (μM)	680				
Proline (mM)	2				
Sucrose (mM)	130	87	87	87	87

⁽¹⁾All media used in this study contained MS salts (Murashige & Skoog, 1962) and vitamins, solidified with Phytigel (2.0 g L^{-1}) and adjusted to pH 5.8, before autoclaving at 121°C for 20 min.

Table 2. Culture media sequence used for differentiation, maturation, germination and plant regeneration from embryogenic cell suspension.

Step	Sequence of culture media ⁽¹⁾			
	T1	T2	T3	T4
Differentiation	A	B	C	D
Maturation	C	B	C	D
Germination	D	B	C	D
Plant regeneration	E	B	C	D

⁽¹⁾Treatments.

Table 3. Number of plants regenerated from cell suspension of Brazilian plantain cv. Terra in different culture media⁽¹⁾

Treatment	Average number of regenerated plants from 1 mL of 5% PCV suspensions
T1	168.20 \pm 33.95c
T2	323.00 \pm 135.80bc
T3	558.60 \pm 108.31a
T4	375.40 \pm 65.44b

⁽¹⁾Means followed by the same letters do not differ significantly, according to Tukey's test, at 5% of probability.

traditional semisolid system, in 60 days of subculture. However, the number of regenerated plants in the present work, for each milliliter of 5% SCV (around 558 plants), was similar to that obtained for another plantain (AAB) via temporary immersion bioreactor using shoot tips (Roels et al., 2005). This number was also proportionally higher than the obtained by Kosky et al. (2002), for the hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB), in a temporary immersion system (RITA) using 2 g of somatic embryos in 200 mL of the same medium used in the present study (medium C): 748 plants.

The protocol developed in this work is suitable for large-scale propagation of type French plantains, as well as for the use in nonconventional genetic improvement strategies, after studying the genetic stability, including the somatic hybridization and the genetic transformation.

Conclusions

1. It is possible to regenerate plants from cell suspensions of plantain banana cultivar Terra.

2. The protocol using MS medium supplemented with 11.4 µM of IAA and 2.2 µM of BAP is efficient in plant regeneration from 'Terra' plantain cell suspension.

Acknowledgements

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, for supporting this research project.

References

- ARINAITWE, G.; RUBAIHAYO, P.R.; MAGAMBO, M.J.S. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, v.86, p.13-21, 2000.
- ASSANI, A.; CHABANE, D.; HAÏCOUR, R.; BAKRY, F.; WENZEL, G.; FOROUGH-WEHR, B. Protoplast fusion in banana (*Musa* spp.): comparison of chemical (PEG: polyethylene glycol) and electrical procedure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.83, p.145-151, 2005.
- ASSANI, A.; HAÏCOUR, R.; WENZEL, G.; CÔTE, F.; BAKRY, F.; FOROUGH-WEHR, B.; DUCREUX, G.; AGUILLAR, M.E.; GRAPIN, A. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, v.20, p.482-488, 2001.
- ASSANI, A.; HAÏCOUR, R.; WENZEL, G.; FOROUGH-WEHR, B.; BAKRY, F.; CÔTE, F.X.; DUCREUX, G.; AMBROISE, A.; GRAPIN, A. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Science*, v.162, p. 355-362, 2002.
- CÔTE, F.X.; DOMERGUE, R.; MONMARSON, S.; SCHWENDIMAN, J.; TEISSON, C.; ESCALANT, J.V. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiologia Plantarum*, v.97, p.285-290, 1996.
- CRONAUER, S.S.; KRİKORIAN, A.D. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. *Annals of Botany*, v.53, p.321-328, 1984.
- DOMERGUE, F.G.R.; FERRIÈRE, N.; CÔTE, F.X. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports*, v.19, p.748-754, 2000.
- GAHAN, P.B.; GEORGE, E.F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J.D. (Ed.). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. p.355-401.
- GANAPATHI, T.R.; HIGGS, N.S.; BALINT-KURTI, P.J.; ARNTZEN, C.J.; MAY, G.D.; VAN ECK, J.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Reports*, v.20, p.157-162, 2001.
- HOULLOU-KIDO, L.; KIDO, E.A.; FALCO, M.C.; SILVA FILHO, M. de C.S.; FIGUEIRA, A.V. de O.; NOGUEIRA, N. de L.; ROSSI, M.L.; TULMANN NETO, A. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana 'Maçã' regeneration. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, p.1081-1086, 2005.
- JALIL, M.; KHALID, N.; OTHMAN, R.Y. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.75, p.209-214, 2003.
- KHALIL, S.M.; CHEAH, K.T.; PEREZ, E.A.; GASKILL, D.A.; HU, J.S. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, v.20, p.1128-1134, 2002.
- KOSKY, R.G.; SILVA, M. de F.; PÉREZ, L.P.; GILLIARD, T.; MARTINEZ, F.B.; VEGA, M.R.; MILIAN, M.C.; MENDOZA, E.Q. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.68, p.21-26, 2002.
- KUMAR, G.B.S.; GANAPATHI, T.R.; REVATHI, C.J.; SRINIVAS, L.; BAPAT, V.A. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta*, v.222, p.484-493, 2005.
- LEMO, E.E.P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L.M.C. de; OLIVEIRA, J.G.L.; MAGALHÃES, V.S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.23, p.482-487, 2001.
- MATSUMOTO, K.; VILARINHOS, A.D.; OKA, S. Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts. *Euphytica*, v.125, p.317-324, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

- NAVARRO, C.; ESCOBEDO, R.M.; MAYO, A. In vitro plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.51, p.17-25, 1997.
- PANIS, B.; WITHERS, L.A.; DE LANGHE, E. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *Cryoletters*, v.11, p.337-350, 1990.
- PEI, X.W.; CHEN, S.K.; WEN, R.M.; YE, S.; HUANG, J.Q.; ZHANG, Y.Q.; WANG, B.S.; WANG, Z.X.; JIA, S.R. Creation of transgenic bananas expressing human lysozyme gene for Panama wilt resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, v.47, p.971-977, 2005.
- ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M.J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.82, p.57-66, 2005.
- SAGI, L.; GREGORY, D.M.; REMY, S.; SWENNEN, R. Recent developments in biotechnological research on bananas (*Musa* spp.). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.15, p.313-317, 1998.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT: user's guide: statistics. Cary: SAS Institute, 2000.
- SCOTT, I.; DICK, A.; IRVINE, J.; STEAR, M.J.; MCKELLAR, Q.A.; KRIKORIAN, A.D.; IRIZARRY, H.; GOENAGA, R.; SCOTT, M.E.; LOCKHART, B.E.L. Stability in plant and bunch traits of a 'French-type' dwarf plantain micropropagated from the floral axis tip and five lateral corm tips of a single mother plant: good news on the tissue culture and bad news on banana streak virus. *Scientia Horticulturae*, v.81, p.159-177, 1999.
- SILVA, S. de O. e.; SOUZA JUNIOR, M.T.; ALVES, E.J.; SILVEIRA, J.R.S.; LIMA, M.B. Banana breeding program at Embrapa. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.1 p.399-436, 2001.
- STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J.; CÔTE, F. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. Montpellier: Ipgri, 2003. 31p. (Inibap Technical Guidelines, 8).
- STROSSE, H.; SCHOOF, H.; PANIS, B.; ANDRE, E.; REYNIERS, K.; SWENNEN, R. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Science*, v.170, p.104-112, 2006.
- STROSSE, H.; VAN DEN HOUWE, I.; PANIS, B. Cell and tissue culture, and mutation induction. In: MOHAN JAIN, S.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Enfield: Science Publishers, 2004. p.13-21.
- VUYLSTEKE, D. **Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm**. Rome: IBPGR, 1989. 56p. (Practical manual for handling crop germplasm. In vitro, 2).

Received on July 7, 2008 and accepted on September 15, 2008

CAPÍTULO II

ESTABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE BANANEIRA ‘TERRA’ REGENERADAS A PARTIR DE SUSPENSÃO CELULAR¹

¹ Artigo submetido a comitê editorial do periódico científico Plant Cell Reports

RESUMO

A micropropagação é uma ferramenta de grande importância para melhoramento genético de plantas, no entanto, é necessário que as mudas produzidas sejam de qualidade e que a fidelidade genética seja garantida. Mudanças de bananeira 'Terra' regeneradas a partir de suspensão celular foram plantadas em campo, com o objetivo de se avaliar a estabilidade genética, por meio de características agronômicas, morfológicas e moleculares (SSR). Foram avaliadas 50 mudas de bananeira 'Terra' originadas da regeneração de suspensão celular em quatro diferentes meios de culturas e como testemunha foram utilizadas 50 mudas de bananeira 'Terra' micropropagadas. Com relação à avaliação agronômica, as mudas apresentaram as mesmas características de produção quando comparadas as testemunhas; na avaliação morfológica, 2,8% das plantas apresentaram anormalidades, como ausência de inflorescência, pseudocaule rachado e arquitetura diferente desta variedade. A avaliação molecular (SSR), não detectou nenhuma variação genética nas amostras analisadas, inferindo-se, então, que a variação ocorrida foi do tipo epigenética.

Palavras chave: Variação epigenética. SSR. Propagação massal. *Musa* sp..

ABSTRACT

Micropropagation is a tool of great importance for plant breeding, however, it is necessary that the plants produced are of quality and genetic fidelity is guaranteed. Plants of Terra cultivar, regenerated from cell suspensions were analyzed in field aiming check your genetic stability, through morphological and molecular dates. We evaluated 50 plants originated from regeneration suspension using four different culture media, and 50 plants micropropagated used as control. With respect to agronomic evaluation plants showed the same characteristic of production when compared to the control, in the morphological, 2.8% of plants showed abnormalities, including absence of inflorescence, pseudostem cracked and different architecture of this variety. The molecular analysis using microsatellite markers no detected genetic variation in the samples analyzed, inferring, then, that the change occurred type epigenetics.

Keywords: SSR. *Musa* sp. Mass propagation. Epigenetic variation.

2.1 INTRODUÇÃO

A micropropagação é a produção massal de indivíduos geneticamente idênticos e fisiologicamente uniformes. Essa técnica permite, em um curto espaço de tempo, a multiplicação de um grande número de plantas livres de bactérias, fungos, vírus e nematóides (SOUZA et al., 1997; PEREIRA et al., 2001). No caso da bananeira, a propagação pode apresentar limitações com relação às taxas de multiplicação, isto porque algumas variedades, como a ‘Caipira’ (AAA), apresentam uma alta taxa de multiplicação, enquanto que outras, como às do subgrupo Terra multiplicam-se muito pouco.

A cultura de células em suspensão e sua regeneração em plantas, por meio da embriogênese somática, são processos que podem ser utilizados para a obtenção de um grande número de mudas sadias, a baixos custos de produção (MATSUMOTO e SILVA NETO, 2003). Esta tecnologia tem sido usada em diferentes variedades de bananeira (JALIL et al., 2003; STROSSE et al., 2006; MORAIS-LINO et al., 2008). Entretanto, poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a estabilidade genética e o comportamento em campo de plantas regeneradas a partir deste processo.

Na micropropagação tradicional, a variação somaclonal é um dos fatores limitantes, uma vez que leva a perda da identidade genética de um determinado genótipo. Essa variação pode resultar de alterações genéticas e ou epigenéticas (SAHIJRAM et al., 2003). Portanto, para propagar comercialmente plantas de uma variedade, por meio da cultura de tecidos, é importante conhecer a estabilidade genética dos propágulos produzidos.

A caracterização fenotípica, com base em uma descrição morfológica e fisiológica pode ser utilizada para detecção de variantes somaclonais, porém, este método requer uma ampla observação das plantas até a produção de frutos (JIN et al., 2008). Em bananeira, as alterações morfológicas comumente encontradas, produto de variações somaclonais, são a presença de plantas anãs, gigantes, em mosaico ou variegadas. Bairu et al. (2006), observaram que mudas micropropagadas de Cavendish durante 10 gerações apresentaram 88% das variações associadas com tipos anões.

A instabilidade genética de plantas produzidas pela regeneração *in vitro* tem sido analisada mediante o uso de marcadores moleculares em várias espécies, entre elas bananeira (VENKATACHALAM et al., 2007; RAY et al., 2006), algodão (JIN et al., 2008), *Pinus* spp.; (MARUM et al., 2009), kiwi (PALOMBI e DAMIANO, 2002) e *Quercus rubra* (WILHELM et al., 2005). Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, os microssatélites (SSR) mostram-se altamente eficientes para monitorar a variação genética durante o processo de

embriogênese somática (WILHELM et al., 2005). No entanto, são poucos os relatos disponíveis sobre a quantificação da estabilidade genética dos regenerantes de bananeiras originados a partir de suspensões celulares, sendo fundamental que métodos mais eficientes e seguros de multiplicação de bananeira sejam estabelecidos, de modo que a taxa de multiplicação seja aumentada, mantendo-se a identidade genética (LEMOS et al., 2001).

Este trabalho tem como objetivo estimar a estabilidade genética de plantas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira do subgrupo Terra, por meio da caracterização agrônômica e molecular, utilizando marcadores SSR.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas mudas da cultivar Terra Maranhão regeneradas a partir de suspensão celular, desenvolvidas a partir de quatro diferentes meios de cultura, descritos em Morais-Lino et al. (2008). Em todas as etapas de regeneração utilizou-se meio de cultura composto de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE e SKOOG 1962) e 0,7% de Agar, suplementados com diferentes reguladores de crescimento, sendo que para o tratamento 1 diferentes concentrações de reguladores de crescimento foram utilizadas em cada etapa de regeneração (diferenciação, maturação, germinação dos embriões e conversão em plantas); e para os demais tratamentos foi adotada as mesmas concentrações dos reguladores em todas as etapas de regeneração.

Os tratamentos e as concentrações dos reguladores de crescimento são descritos a seguir: Tratamento 1 - na fase de diferenciação foi utilizado 1.1 μM de ANA, 0.2 μM de zeatina, 0.7 μM de 2ip, 0.5 μM de kinetina, 680 μM de glutamina e 2 mM de prolina; na fase de maturação utilizou-se 2.2 μM de BAP e 11.4 μM de IAA; na germinação dos embriões formados o meio continha 2 μM de BAP e 2 μM de IAA e na regeneração de plantas 1 μM de BAP e 1 μM de IAA, Tratamento 2 - 2.2 μM de BAP e 2.2 μM de IAA, Tratamento 3 - 2.2 μM de BAP e 11.4 μM de IAA e Tratamento 4 - 2 μM de BAP e 2 μM de IAA.

Uma amostra aleatória de 50 mudas de bananeira 'Terra' de cada um dos quatro tratamentos foi aclimatizada em casa-de-vegetação e ao atingirem quatro meses de idade foram levadas a campo no espaçamento de 3x3x3 m. Como testemunha utilizou-se 50 mudas micropropagadas a partir de ápices caulinares.

A avaliação da estabilidade genética das plantas foi realizada mediante o emprego da caracterização agrônômica, morfológica e molecular.

2.2.1. Caracterização agronômica e morfológica

Foram avaliadas as seguintes características agronômicas: altura da planta (APL, cm); diâmetro do pseudocaule (DIP, cm); número de mudas na floração (NMF); número de folhas vivas no florescimento (NFF); número de pencas (NPE); número de frutos por cacho (NFR) e número de dias do plantio ao florescimento (NDF). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos mais a testemunha, com 50 repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na caracterização morfológica uma série de observações visuais foram realizadas visando identificar plantas atípicas considerando as seguintes características morfológicas: altura da planta, formato e inserção das folhas, formação do cacho, tamanho e formato dos frutos, e presença ou ausência de inflorescência. Como padrão foi utilizado plantas da mesma idade oriundas da micropropagação tradicional.

2.2.2. Análise molecular com microsatélites

Foi realizada uma amostragem aleatória de 18 plantas para cada um dos tratamentos utilizados e mais dez plantas micropropagadas a partir de ápices caulinares como testemunha.

O DNA genômico das 82 amostras foi extraído utilizando o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990). A quantidade e qualidade do DNA foram determinadas pela análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. As amostras foram diluídas em TE e padronizadas em 10 ng μL^{-1} . As reações de amplificação foram completadas com água ultrapura para o volume final de 15 μl contendo: 1,5 mM MgCl_2 , 100 μM de cada uma dos dNTP's, 0,2 μM de cada iniciador SSR (Tabela 1), 1 U de Taq polimerase, tampão 1X e 30 ng de DNA genômico.

Tabela 1. *Primers SSR* utilizados na análise de plantas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira ‘Terra’. Cruz das Almas, 2009.

Primers SSR	Repetição (F/R)
MaOCEN 10	ggaagaaagaagtggagaatgaa/tgaaatggataaggcagaagaa
Ma 1-27	tgaatccaagtttggtaag/caaacactgtccccatctc
Ma 1-17	tgaggcggggaatcgga/ggcgggagacagatggagtt
Mb1-69	ctgcctctccttctccttggaa/tcggatgagctctgactca
Mb 1-100	tcggttgctaataagaggaa/tctcgaggatggtgaaaga
CNPMF01	tgatgcattggatgatctcg/aaaacacaccaactccatccc
CNPMF 08	atcgaggaatttggagagg/atccacaatccgatcagctc
CNPMF 09	ccttcatcatcacggc/accacgacctcctcctcttc
CNPMF 10	cacatcacagctctgcttcttttcggctgatccaattc
CNPMF 26	tggagatgaagaagatgcc/tcatcaagtgcgttgattc
CNPMF 43	aaacctccaccaacacctc/gtttgggtgctcattgctgtg

As amplificações foram conduzidas em termociclador BIO-RAD utilizando-se o esquema de “touchdown” com ciclo inicial de 4 min. a 94 °C, seguido de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 55 °C, reduzindo-se um grau a cada ciclo, 1 min. a 72 °C, num total de 10 ciclos, seguido de 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 45 °C e 1 min. a 72 °C.

Os produtos das amplificações de SSR foram aplicados em gel agarose ultrapura 1000 (Invitrogen) na concentração de 3,0% e visualizados em luz ultravioleta com brometo de etídeo. Os resultados foram capturados em sistema fotográfico digital Kodak.

2.3 RESULTADOS

2.3.1. Caracterização agronômica e morfológica

A caracterização agronômica foi realizada considerando-se o primeiro ciclo de produção. Os valores médios para as variáveis avaliadas se encontram na Tabela 2.

A altura média de planta variou de 414,96 cm para o tratamento 2 a 385,74 cm para o tratamento 1, apresentando diferença significativa entre si, mas não diferiram dos demais tratamentos. O diâmetro do pseudocaule não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, podendo ser observado uma variação de 27,1 cm para o tratamento 2 a 24,1 cm para o tratamento 1.

O caráter número de mudas na floração variou de 12,2 no tratamento 4 a 10,1 no tratamento 1, havendo diferença significativa entre si e não diferindo dos demais tratamentos. Para o número médio de folhas no florescimento pode ser observado na Tabela 2 que não há diferença significativa entre os tratamentos, no entanto houve uma variação de 11,6 a 11,0 folhas/planta para os tratamentos 1 e 5, respectivamente.

Tabela 2 - Valores médios de altura da planta (APL), diâmetro do pseudocaule (DIP), número de mudas na floração (NMF), número de folhas no florescimento (NFF), número de pencas (NPE), número de frutos (NFR) e número de dias do plantio ao florescimento (NDPF) de mudas de bananeira 'Terra' regeneradas a partir de suspensão celular em quatro meios de cultura. Cruz das Almas, 2009.

TRAT	APL (cm)	DIP (cm)	NMF	NFF	NPE	NFR	NDPF (dias)
1	385,74 b ¹	24,1 a	10,1 b	11,6 a	9,9 a	140 ab	492 a
2	414,96 a	27,1 a	12,1 a	11,1a	11,0 a	164 a	477 a
3	404,83 ab	26,2 a	11,4 ab	11,2a	9,6 a	134 b	492 a
4	405,77 ab	27,0 a	12,2 a	11,5a	10,8 a	157 ab	474 a
5	410,80 ab	26,1 a	11,0 ab	11,0a	10,6 a	165 a	495 a
F	2,447*	2,678*	2,896*	0,947ns	1,621ns	2,851*	2,568*
Média	404,42	26,1	11,36	11,28	10,38	156	486
CV%	11,88	14,19	30,68	15,72	30,59	34,01	12,02

Tratamento 1: na fase de diferenciação utilizou 1.1 µM de ANA, 0.2 µM de zeatina, 0.7 µM de 2ip, 0.5 µM de kinetina, 680 µM de glutamina e 2 mM de prolina; na fase maturação utilizou-se 2.2 µM de BAP e 11.4 µM de IAA; na germinação dos embriões formados utilizou-se 2 µM de BAP e 2 µM de IAA e na regeneração de plantas utilizou-se 1 µM de BAP e 1 µM de IAA, Tratamento 2 - 2.2 µM de BAP e 2.2 µM de IAA, Tratamento 3: 2.2 µM de BAP e 11.4 µM de IAA, Tratamento 4: 2 µM de BAP e 2 µM de IAA, Tratamento 5: plantas utilizadas como testemunhas, micropropagadas a partir de ápices caulinares. ¹Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com relação ao número de pencas por cacho não houve diferença significativa entre os tratamentos, podendo ser observado uma variação de 11,0 para o tratamento 2 a 9,6 para o tratamento 3. O número de frutos variou de 165 para o tratamento 5 (testemunha) e 134 para o tratamento 3, havendo diferença significativa entre si e não diferindo dos demais tratamentos.

As plantas oriundas do tratamento 4 foram mais precoces para o florescimento e o tratamento 5 o mais tardio (cerca de três semanas), embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos para esta característica (Tabela 2).

Com relação à avaliação morfológica, os tratamentos 1, 4 e 5 conforme pode ser observado na Tabela 3, promoveram 10, 10 e 2% de plantas com variação morfológica, respectivamente, em todos os parâmetros avaliados. O tratamento 1 gerou 2% das plantas com pseudocaule rachado e 2% com ausência de formação da inflorescência. As demais plantas dos tratamentos 1, 4 e 5 geraram 6, 10 e 2%, das plantas com variação morfológica, respectivamente, com porte baixo, cacho e fruto com tamanho fora do padrão para bananeira do grupo Terra, quando comparadas com plantas normais do tratamento utilizado como testemunhas. De maneira geral, foram observadas poucas plantas com alterações

morfológicas, fato que permite inferir sobre a eficiência da técnica de obtenção e regeneração de suspensões celulares.

Tabela 3 - Avaliação morfológica em campo das plantas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira 'Terra'.

Tratamento	Varição no pseudocaule	Ausência de inflorescência masculina	Plantas tipo Terra	Plantas tipo Terrinha	Porcentagem de plantas normais (Terra) (%)
1	1	1	45	3	90
2	0	0	50	0	100
3	0	0	50	0	100
4	0	0	45	5	90
5	0	0	49	1	98

2.3.2 Avaliação molecular com microssatélites

As amostras 1 com variação no pseudocaule, 3 e 8 com variação tipo terrinha (tratamento 1); 69, 70 e 75 com variação do tipo terrinha (tratamento 4) e 81 também com variação do tipo Terrinha (tratamento 5), referem-se as plantas que apresentaram variação morfológica quando avaliadas em campo, as demais plantas que apresentaram variação morfológica, não foi possível coletar amostras foliares. Na avaliação molecular, esta variação não foi detectada em nenhum dos primers utilizados, sugerindo que esta variação teve origem epigenética. As Figuras 1 e 2 exemplificam dois perfis SSR das plantas regeneradas a partir suspensão celular de bananeira 'Terra' gerado pelos iniciadores Ma 1-17 e Mb 1-100, respectivamente.

Por meio dos resultados observados na análise molecular utilizando os primers de microssatélites, é possível inferir que não houve variação somaclonal entre as plantas regeneradas a partir de suspensão celular. Todos os primers apresentaram padrões de alelos únicos (monomórficos), independente do tratamento utilizado e da planta genotipada (Figuras 1 e 2). Desta forma, as plantas regeneradas a partir de suspensões celulares mantêm a identidade genética da cultivar original. É possível sugerir que os protocolos utilizados para a obtenção das suspensões celulares, assim como os protocolos utilizados para regenerar plantas não induzem variação genética.

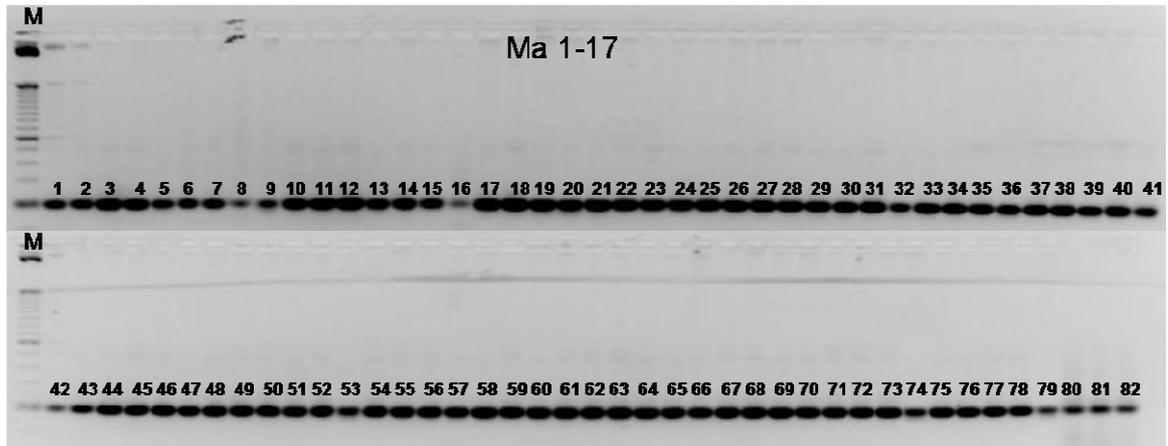


Figura 1- Perfil SSR de diferentes plantas regeneradas a partir suspensão celular de bananeira ‘Terra’ gerado pelos iniciadores Ma 1-17. A letra M representa o tamanho do marcador molecular utilizado (50pb). Amostras de 1 – 18 (tratamento 1), 19 – 36 (tratamento 2), 42- 59 (tratamento 3), 60 – 77 (tratamento 4) correspondem a 18 plantas de bananeira ‘Terra’ de cada tratamento, 37 – 41 e 78 – 82 correspondem as plantas de bananeira ‘Terra’ utilizadas como testemunhas. Cruz das Almas, 2009.

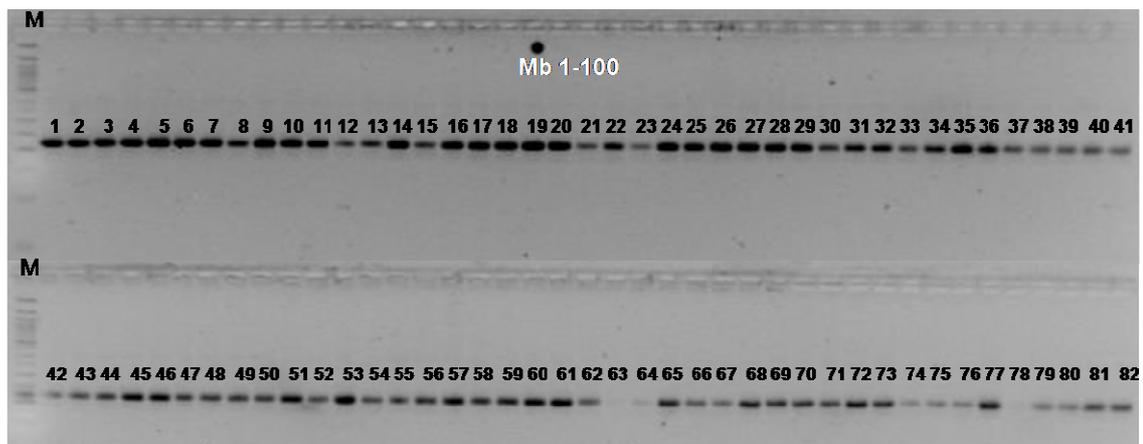


Figura 2- Perfil SSR de diferentes plantas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira ‘Terra’ gerado pelos iniciadores Mb 1-100. A letra M representa o tamanho do marcador molecular utilizado (50pb). Amostras de 1 – 18 (tratamento 1), 19 – 36 (tratamento 2), 42- 59 (tratamento 3), 60 – 77 (tratamento 4) correspondem a 18 plantas de bananeira ‘Terra’ de cada tratamento, 37 – 41 e 78 – 82 correspondem as plantas de bananeira ‘Terra’ utilizadas como testemunhas. Cruz das Almas, 2009.

2.4 DISCUSSÃO

Com relação aos meios de culturas utilizados para regeneração de suspensão celular de bananeira ‘Terra’, os resultados obtidos neste trabalho mostram que, os mesmos influenciaram no número de embriões convertidos em plantas, mantendo a fidelidade genética das plantas regeneradas.

Na avaliação agronômica as características avaliadas estão entre aquelas consideradas relevantes para identificação e seleção de indivíduos superiores (SILVA et al., 2002). Os maiores valores para altura de planta (414,96 cm) e diâmetro de pseudocaule (27,1 cm) observados neste trabalho estão abaixo dos citados por Silva et al. (2001) para o grupo Terra. Estas características assumem grande importância no melhoramento genético da bananeira, uma vez que estão relacionadas ao vigor da planta, podendo interferir na capacidade de sustentação do cacho e na suscetibilidade ao tombamento (SILVA et al., 2003). Apesar de no presente trabalho as plantas apresentarem porte mais baixo em relação aos citados nas referências, as mesmas apresentaram cachos grandes, com uma média de 156 frutos, podendo ser vulneráveis a quebra do pseudocaule.

Quanto ao número de mudas por plantas, emitidas na época de florescimento, os resultados deste trabalho podem ser de grande importância no que diz respeito à produção de mudas desta variedade, onde foram produzidos em média 11,3 mudas por planta, sendo considerado um valor ótimo para produção de mudas. Segundo Silva et al. (2008), as variedades de bananeira do grupo Terra apresentam baixo perfilhamento, produzindo 1 a 2 mudas por planta.

Os melhores resultados para número médio de pencas e de frutos por cacho observados neste trabalho foram semelhantes aos observados por Silva et al. (2008), em plantas advindas de mudas micropropagadas a partir de ápices caulinares. O caráter número de pencas é de grande interesse para o produtor e fundamental para o melhoramento genético da bananeira, uma vez que a penca constitui-se na unidade comercial (SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2006).

No que diz respeito à variedades do grupo Terra, existem dezenas de tipos que se diferenciam quanto à altura das plantas, cor do pseudocaule, cor da casca e do fruto, persistência ou ausência da inflorescência masculina, forma e tamanho dos frutos, entre outros (SILVA et al., 2001), sendo a variedade ‘Terrinha’ uma variante da variedade ‘Terra’. A

presença de variação na morfologia das plantas de bananeira do tipo 'Terra' não é considerada pela literatura como uma variação somaclonal, e sim, uma característica normal do genótipo.

A variação somaclonal, corresponde ao aparecimento de plantas anormais durante o processo de propagação, principalmente relacionado à estatura, cor, forma e má formação dos cachos (ISRAELI et al., 1991). A ausência dessas variações é importante para o sucesso e a superioridade no desempenho em campo das plantas micropropagadas em comparação com as mudas convencionais (BERNARDI et al., 2004).

A ocorrência de anormalidades na morfologia e fisiologia de plantas tem sido condicionada a ação epigenética, que não é freqüentemente transmitida a gerações subseqüentes (KAEPLER et al., 2000), e devido a sua instabilidade genética é um processo com importância prática em programas de melhoramento genético para gerar variantes valiosos. Porém, se torna um fenômeno indesejável quando o objetivo principal é a micropropagação ou transformação de material selecionado (PEREDO et al., 2009).

Pela análise molecular (SSR), é possível inferir que não houve variação somaclonal entre as plantas regeneradas a partir de suspensão celular. Todos os *primers* apresentaram padrões de alelos únicos (monomórficos), independente do tratamento utilizado e da planta genotipada. Os SSR's tem se mostrado extremamente eficientes em estudos visando a detecção da instabilidade genética em plantas provenientes de processos de embriogênese somática (WILHELM et al., 2005; MARUM, et al., 2009; JIN et al., 2008).

Marum et al. (2009), identificaram que apenas 9,6% das plantas de *Pinus pinaster*, regeneradas a partir da embriogênese somática, mostraram alterações genéticas detectadas por meio de marcadores SSR. Resultados similares foram encontrados por Burg et al. (2007) ao avaliarem a instabilidade genética de plantas de *Pinus silvestres* originadas de células embriogênicas e cotilédones e por Rahman & Rajora (2001) em mudas micropropagadas de *Pinus tremuloides*.

Em algodão Jin et al. (2008), observaram alto nível de variação somaclonal em calos embriogênicos e plantas regeneradas por meio da embriogênese somática, utilizando marcadores SSR. De acordo com os autores, a avaliação da estabilidade genética nos regenerantes, originados de suspensão celular, é um recurso essencial antes da adoção desta metodologia como um processo de propagação clonal em larga escala.

Avaliando variantes induzidos em plantas micropropagadas de bananeira 'Prata Anã' Guimarães et al. (2009), identificaram um único variante somaclonal utilizando marcadores RAPD e essa variação não foi detectada quando se utilizou marcadores SSR. Venkatachalan

et al. (2007) e Ray et al. (2006) analisaram a estabilidade genética de plantas micropropagadas de bananeira utilizando os marcadores moleculares RAPD e ISSR e não detectaram nenhuma variação somaclonal em nenhum deles. Palombi e Damiano (2002) analisando a variação induzida em plantas micropropagadas de Kiwi, fizeram a comparação entre os marcadores RAPD e SSR, observaram que somente o marcador SSR foi capaz de detectar a variação genética.

Como nenhuma variação genética foi detectada com o uso de marcadores SSR, as alterações morfológicas observadas podem ser decorrentes de variação epigenética. Em nosso estudo, aproximadamente 2,8% das plantas analisadas originadas de regeneração de suspensão celular de bananeira 'Terra' mostraram variação morfológica. Segundo Marum et al. (2009), os fatores epigenéticos ou a combinação de alterações genéticas e epigenéticas, são a base para observação da variação somaclonal ao nível morfológico.

Os resultados obtidos mediante as análises agronômicas, morfológicas e moleculares (SSR) de plantas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira 'Terra', sugerem que o processo de obtenção de mudas utilizado, nas condições descritas neste estudo, é adequado para a produção de massal mudas geneticamente estáveis.

REFERÊNCIAS

- BAIRU, M.W.; FENNELL, C.W.; Van STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (Musa AAA cv. 'Zelig'). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 347-351, 2006
- BERNARDI, W. F. et al. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 3, p. 503-506. 2004.
- BURG, K. et al. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. **Journal Experimental Botany**, Inglaterra, v. 58, p. 687-698. 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15. 1990.

- GUIMARÃES, N. C. C. et al. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras ‘Prata anã’, utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 448-454, 2009.
- ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; LAHAV, E. Qualitative aspects of somaclonal variation by *in vitro* techniques. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 48, p. 71-88. 1991.
- JALIL, M.; KHALID, N.; OTHMAN, R. Y. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 209-214. 2003.
- JIN, S. et al. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1303-1316. 2008.
- KAEPLER, S. M., KARPPLE, H. F., RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Holanda, v. 43, p. 179-188. 2000.
- LEMO, E. E. P. et al. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487. 2001.
- MARUM, L. et al. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 673- 682. 2009.
- MATSUMOTO, K. ; SILVA NETO, S. P. **Micropropagation of bananas**. In: S. Mohan Jain; Katsuaki Ishii. (Org.). Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003, v. p. 353-380.
- MORAIS-LINO, L. S. et al. Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1325-1330. 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473 – 497, 1962.
- PALOMBI, M. A.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 1061-1066. 2002.
- PEREDO, E. L.; ARROYO-GARCÍA, R., REVILLA, M. A. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. **Journal of Plant Physiology**, Australian, v. 166, p. 1101-1111. 2009.

- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 89-95. 2001.
- RAHMAN, M. H.; RAJORA, O. P. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v 20, p. 531-536. 2001.
- RAY, T. et al. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, p. 11-21. 2006.
- SAHIJRAM, L.; SONEJI, J. R.; BOLLAMMA, K. T. Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* SPP.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, v. 39, p. 551-556. 2003.
- SILVA, S. O.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V. **Variedades**. Informe Agropecuário, Bananicultura irrigada: inovações tecnológicas. Belo Horizonte- MG. v. 29, n. 245, p. 78-83. 2008.
- SILVA, S. O. et al. Avaliação de clones de banana Cavendish. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, p. 832-837. 2006.
- SILVA, S. O. et al. Avaliação de genótipos de bananeira em diferentes ambientes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 737-748. 2003.
- SILVA, S. O.; FLORES, J. C. O. LIMA NETO, F. P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1567-1574, 2002.
- SILVA, S. O.; SILVEIRA, J. R. S.; ALVES, E. J. **Cultivares**. In: ALVES, E. J. (Ed.). Cultivo de bananeira tipo Terra. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2001. 176p
- SOUZA, A. S. et al. **Propagação**. In: ALVES, E. J. (Org.) A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: EMBRAPA-SPI/Cruz das Almas, EMBRAPA-CNPMPF, 1997. p.151-195.
- STROSSE, H. et al. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue bananas and plantains (*Musa* spp.). **Plant Science**, v. 170, p. 104-112. 2006.
- STROSSE, H. et al. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. Montpellier: Ipgri, 2003. 31p. (Inibap Technical Guidelines, 8).

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, v. 43, n. 267-274. 2007.

WILHELM, E. et al. Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 790- 795. 2005.

CAPÍTULO III

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS MASCULINAS EM BANANEIRAS TRIPLÓIDES.¹

¹Artigo a ser submetido a comitê editorial do periódico científico *Plant Cell Reports*

RESUMO

Dentre as técnicas de propagação *in vitro* de fruteiras, a embriogênese somática se destaca por apresentar inúmeras vantagens, dentre elas destaca-se, a alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação. O objetivo deste trabalho foi induzir embriogênese somática dos genótipos de bananeira Grande naine e Maçã a partir de flores masculinas imaturas, estabelecer suspensão celular, regenerar plantas e avaliar a estabilidade genética das plantas geradas. O meio de indução de embriogênese foi o MS suplementado com diferentes doses de glutamina e o meio para regeneração das células em suspensão utilizou-se o MS suplementado com cinco doses combinadas de BAP e AIA. Como resultado observou-se que cada variedade respondeu diferentemente as doses de glutamina no meio de cultura, onde a variedade 'Grande naine' formou embriões somáticos em meio desprovido de glutamina enquanto que, a variedade 'Maçã' formou embriões somáticos na presença de glutamina. Para a fase de regeneração a variedade 'Grande naine' apresentou melhores resultados em formação de embriões no meio de cultura sem regulador de crescimento, porém estes embriões não foram convertidos em plantas quando mantidos no mesmo meio e para a variedade Maçã o maior número de plantas foram regeneradas neste mesmo meio. No que diz respeito à estabilidade destas plantas, ao serem analisadas utilizando marcadores microssatélites não foi observado variação genética com os iniciadores utilizados.

Palavras chave: SSR. Reguladores de crescimento. *Musa* sp.. Embriões somáticos.

ABSTRACT

Among in vitro fruit propagation techniques, somatic embryogenesis stands out for presenting many advantages, with high rate of multiplication being highlighted compared to any other propagation process. The objective of the present work was to induce somatic embryogenesis of Grande Naine and silk banana genotypes and evaluate the genetic stability of the plants. The medium for inducing embryogenesis was the MS supplemented with different doses of glutamine, and the medium for cell suspension regeneration was MS supplemented with five doses with combinations of BAP and IAA. Results showed that each variety responded differently to the doses of glutamine in the culture medium, whereas the 'Grande Naine' variety formed somatic embryos in the glutamine-free medium and 'Silk' variety formed somatic embryos in the presence of glutamine. For the regeneration phase, the 'Grande Naine' variety presented best results for embryo formation in culture medium without growth regulators; however, these embryos were not converted into plants when maintained in the same medium and for the Silk variety the greatest number of plants regenerated in this same medium. Regarding plant stability, no genetic variation was observed using microsatellite markers.

Key words: SSR. Somatic embryos. *Musa* sp.. Growth regulators.

3.1 INTRODUÇÃO

Os métodos tradicionais de melhoramento e de multiplicação sexuada de bananeira apresentam algumas limitações, como a dificuldade na obtenção de sementes em frutos partenocárpicos, a baixa fertilidade e a lenta taxa de multiplicação. Sua propagação é feita por meio de mudas retiradas das plantas adultas em campo ou por micropropagação (Borges et al., 2004). A depender do genótipo, a propagação pode apresentar problemas em relação às taxas de multiplicação. Dentre os métodos *in vitro* de propagação, a embriogênese somática se destaca como um importante método de regeneração usado para a propagação de plantas elite *in vitro* (FERREIRA et al., 2005), por apresentar como vantagens, a alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; o escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido, eliminando a dependência de períodos específicos de disponibilidade de material propagativo, permitindo estabelecer o período desejado para obtenção das mudas; além das mudas serem geneticamente iguais a planta mãe e fisiologicamente uniformes, com desenvolvimento normal e livre de vírus (ZIMMERMAN, 1993; MERKLE, 1995), podendo também ser utilizada para propagação clonal e melhoramento, tanto pela fusão de protoplastos como pela transformação genética.

A fase de indução de embriogênese é considerada de grande importância para obter embriões somáticos bem formados, contribuindo com as fases subsequentes de desenvolvimento, isto é, a maturação e a conversão em plantas (FILLIPI et al., 2001). Entre os explantes mais utilizados, as flores masculinas imaturas são as que têm apresentado melhores respostas à indução de culturas embriogênicas em bananeira (BECKER et al., 2000; JALIL et al., 2003; STROSSE et al., 2003).

As culturas de células em suspensão são utilizadas, principalmente, para o isolamento de protoplastos, embriogênese somática, produção de metabólitos secundários e estudos básicos de metabolismo. Na cultura da bananeira, células em suspensão com alta capacidade de regeneração têm aplicação na propagação clonal em massa, na criopreservação (NAVARRO et al., 1997; KOSKY et al., 2002; PANIS et al., 1990) e para o melhoramento genético não-convencional, por meio da fusão de protoplastos, da mutagênese, da variação somaclonal e da transformação genética (GANAPATHI et al., 2001; BECKER et al., 2000; MATSUMOTO et al., 2002; ASSANI et al., 2005; HOULLOU-KIDO et al., 2005; KUMAR et al., 2005; PEI et al., 2005; GHOSH et al., 2009). A incorporação destas técnicas biotecnológicas em programas de melhoramento genético depende de um protocolo eficiente

de regeneração das células em suspensão através da embriogênese somática utilizando genótipos nacionais.

A Propagação de plantas através de cultura de tecidos deve resultar, teoricamente, na produção de indivíduos clonais idênticos ao material inicial. No entanto, alterações em vários níveis, incluindo morfológicas, bioquímicas, genéticas e ou epigenéticas, são observados durante a propagação *in vitro* de plantas (RAHMAN e RAJORA, 2001; PEREDO et al., 2009). Estas variações podem ser avaliadas com base nas alterações fenotípicas, nas mudanças em padrões de isoenzimas e proteínas, na estrutura e número de cromossomos, alterações de DNA ou características epigenéticas (FOURRÉ, 2000).

Os microssatélites podem servir como marcadores altamente sensíveis para monitorar a variação genética, sinalizando o potencial deletério de mutações durante o cultivo *in vitro*, porque refletem uma taxa relativamente elevada de mutação (LOPES et al., 2006; BURG et al., 2007). Microssatélites consistem de repetições em tandem de curta seqüência. A variação ou instabilidade, observada em microssatélites, muitas vezes corresponde a uma alteração no tamanho das seqüências simples repetidas (LEROY et al., 2000). Palombi & Damiano (2002) relataram pela primeira vez o uso de marcadores SSR para investigar a variação genética em plantas micropropagadas de kiwi. Na literatura são encontrados relatos do uso de marcadores SSR visando detectar a variação somaclonal de plantas de bananeira micropropagadas (Guimarães et al., 2009), e nenhuma delas estuda a estabilidade genética de plantas regeneradas a partir de suspensão celular através da embriogênese somática.

O objetivo desse trabalho foi induzir a embriogênese somática a partir de flores masculinas imaturas das variedades de bananeira Maçã e Grande naine, estabelecer suspensão celular e avaliar a estabilidade genética das plantas regeneradas com base em marcadores moleculares SSR.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Indução de embriogênese e estabelecimento de células em suspensão

Foram utilizadas inflorescências masculinas de bananeiras das variedades Grande naine e Maçã, coletadas no Banco Ativo de Germoplasma de Bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas (BA). Inicialmente, reduziram-se essas

inflorescências para um tamanho de 10 cm de comprimento, as quais foram, posteriormente, lavadas em solução de água e detergente.

Em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, este material foi borrifado com álcool 70% e flambado duas vezes. Após esse processo de desinfestação, iniciou-se a retirada dos dicásios (flores imaturas) das inflorescências masculinas, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e bisturi. Essas inflorescências foram colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura constituído de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 3% de sacarose, solidificado com 0,7% de agar e suplementado com 1 mg L⁻¹ de AIA, 4 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1 mg L⁻¹ de ANA, variando-se as concentrações de glutamina (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹), com pH ajustado para 5,8 e autoclavados durante 20 minutos a 121°C. As culturas foram mantidas em sala escura, com temperatura de 27 ± 1°C, até a formação de calos embriogênicos e/ou embriões somáticos.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (variedades de bananeira) x 5 (concentrações de glutamina), com 12 repetições por tratamento. O material foi observado semanalmente durante 120 dias, avaliando-se a presença ou ausência de embriões somáticos e não calos embriogênicos. Os dados foram analisados através análise estatística.

Massas embriogênicas contendo embriões somáticos foram transferidos para Erlenmeyer de 125 ml contendo 15 ml de meio líquido constituído de sais e vitaminas do MS, suplementado com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 100 mg L⁻¹ de glutamina, 1 mg L⁻¹ de biotina, 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, e 44,5 g L⁻¹ de sacarose (Morais-Lino et al., 2008). As culturas foram mantidas no escuro a 27 ± 2°C, sob agitação de 120 rpm e subcultivados a cada 10 dias.

3.2.2 Regeneração das células em suspensão

Para a variedade Maçã a densidade das células em suspensão foi ajustada para 5% do volume de células aglomeradas (VCA), com uma diluição de um ml de células em suspensão aglomeradas em 19 ml de meio de cultura líquido. As células em suspensão da variedade Grande naine, como eram compostas de aglomerados menores, foram diluídas para 3,3% VCA, diluindo-se um ml de células em suspensão aglomeradas em 29 ml de meio de cultura líquido. Um ml da nova suspensão de cada variedade foi plaqueada sob papel filtro em placa de Petri contendo meio de cultura constituído de sais e vitaminas do meio MS, 30 g L⁻¹ (3%) de sacarose, 7 g L⁻¹ (0,7%) de agar, testando cinco concentrações diferentes dos reguladores BAP e AIA (0,0 e 0,0 mg L⁻¹ [testemunha]; 0,2 e 0,1 mg L⁻¹; 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; 0,6 e 0,5 mg L⁻¹

¹; 0,8 e 0,7 mg L⁻¹), respectivamente. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 (cinco) tratamentos (concentrações combinadas de BAP e AIA) e 5 repetições. Foram avaliadas a média do número de embriões somáticos germinados, não germinados e o número de plantas convertidas por tratamento. Os dados foram tabulados e submetidos à análise de variância, utilizando o programa estatístico SAS, versão 9.1 (SAS INSTITUTE INC. 2002 - 2003). Os dados foram transformados para log (x + 10) e as médias agrupadas pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

As culturas foram mantidas nestes meios até a completa regeneração das plantas. Mensalmente as culturas foram transferidas para meio fresco. No início da diferenciação das células em embriões, as culturas foram mantidas em uma sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2°C, no escuro durante um mês e posteriormente foram transferidas para uma sala de crescimento com as mesmas condições sob iluminação com fotoperíodo de 16 h. As plantas já enraizadas foram individualizadas em caixas Magenta contendo meio de cultura MS, sem reguladores de crescimento. As mudas de bananeira das variedades Grande naine e Maçã, obtidas a partir das suspensões celulares, foram aclimatizadas em casa-de-vegetação, sendo posteriormente levadas a campo.

3.2.3 Extração de DNA e Amplificação de SSR

Com as plantas já em campo, foram selecionadas aleatoriamente 18 plantas de bananeira de cada tratamento [BAP e AIA (0,0 e 0,0 mg L⁻¹ [testemunha]; 0,2 e 0,1 mg L⁻¹; 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; 0,6 e 0,5 mg L⁻¹; 0,8 e 0,7 mg L⁻¹)] das variedades Maçã e Grande naine, e como testemunha foram utilizadas 10 plantas da variedade 'Maçã' regeneradas do tratamento sem reguladores de crescimento. Para a variedade Grande naine, que regenerou em média uma planta no meio de cultura utilizado como testemunha, retirou amostras de plantas obtidas da micropropagação de ápices caulinares, como testemunhas. Realizou-se a extração do DNA genômico utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1990). A quantidade e qualidade do DNA foram determinadas pela análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, sendo as amostras diluídas em TE e padronizadas em 10 ng µL⁻¹. As reações de amplificação foram completadas com água ultrapura para o volume final de 15 µl contendo: 1,5 mM MgCl₂, 100 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada iniciador SSR (Tabela 1), 1 U de Taq polymerase, tampão 10 x e 30 ng de DNA genômico.

As amplificações foram conduzidas em termociclador BIO-RAD utilizando-se o esquema de “touchdown” com ciclo inicial de 4 min. a 94 °C, seguido de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 55 °C, reduzindo-se um grau a cada ciclo, 1 min. a 72 °C, num total de 10 ciclos, seguido de 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 45 °C e 1 min. a 72 °C.

Os produtos das amplificações de SSR foram aplicados em gel agarose ultrapura 1000 na concentração de 2,5%. Os resultados foram capturados em sistema fotográfico digital Kodak.

Tabela 1 - Primers SSR utilizados nas análises das plantas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira ‘Maçã’ e ‘Grande naine’. Cruz das Almas, 2009.

Primers SSR	Repetição (F/R)
MaOCEN 10	ggaagaagaagtggagaatgaa/tgaaatggataaggcagaagaa
Ma 1-27	tgaatcccaagtttggtcaag/caaacactgtcccatctc
Ma 1-17	tgaggcggggaatcggtg/ggcgggagacagatggagtt
Mb1-69	ctgcctctccttctcctttggaa/tcggatgagctctgactca
Mb 1-100	teggctggctaatagaggaa/tctcgaggatggtgaaaga
AGMI 67/68	ataccttctcccgttctcttc/tggaaaccaatcattgatc
CNPMF01	tgatgcattggatgatctcg/aaaacacaccaactccatccc
CNPMF 08	atcgaggaatttgggagagg/atccacaatccgatcagctc
CNPMF 09	ccttcatcatcacagcg/accacgacctcctctcttc
CNPMF 10	cacatcacagctctgcttc/ttttcggctgatccaattc
CNPMF 43	aaacctccaccaaacctc/gtttggctcattgctgtg

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Indução de embriogênese e estabelecimento de células em suspensão

Aos 90 dias de cultivo *in vitro* das flores imaturas das cultivares Grande naine e Maçã, observou-se somente a formação de calos de coloração amarelada, independente da concentração de glutamina. Após 180 dias de cultivo, foram observadas diferentes respostas entre as cultivares de bananeiras utilizadas e as concentrações de glutamina (Tabela 2).

Na cultivar Grande naine ocorreu formação de embriões somáticos na ausência de glutamina (Figura 1A) e na presença de 200 mg L⁻¹ de glutamina (Tabela 2). Nos demais tratamentos ocorreu a formação de calos não embriogênicos, exceto na presença de 100 mg L⁻¹ de glutamina, onde as flores imaturas mostraram-se oxidadas, não apresentando nenhum tipo de crescimento ou formação de embriões somáticos.

Em relação à bananeira ‘Maçã’ houve a formação de embriões somáticos de coloração esbranquiçada (Figura 1B) nas concentrações de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de glutamina com frequências de 60, 50 e 40 % dos explantes, respectivamente (Tabela 2), sendo que as flores imaturas que não formaram embriões sofreram oxidação (Figura 1C).

Apesar da baixa frequência de embriões somáticos induzidos nas cultivares de bananeiras estudadas, as massas embriogênicas contendo embriões somáticos de cada variedade, foram transferidas para meio de cultura para o estabelecimento de suspensões celulares.

Tabela 2. Frequência (%) de embriões somáticos (ES) e de calos não embriogênicos (CNE), obtidos no cultivo de inflorescências masculinas das cultivares de bananeira Maçã e Grande naine em meio de cultura para indução de embriogênese somática utilizando cinco concentrações de glutamina, após 180 dias de cultivo. Cruz das Almas, 2009.

Cultivares	Concentração de glutamina (mg L ⁻¹)									
	0		50		100		150		200	
	ES	CNE	ES	CNE	ES	CNE	ES	CNE	ES	CNE
Grande naine	50	50	0	100	0	0	0	100	50	50
Maçã	0	0	60	40	50	50	40	60	0	50

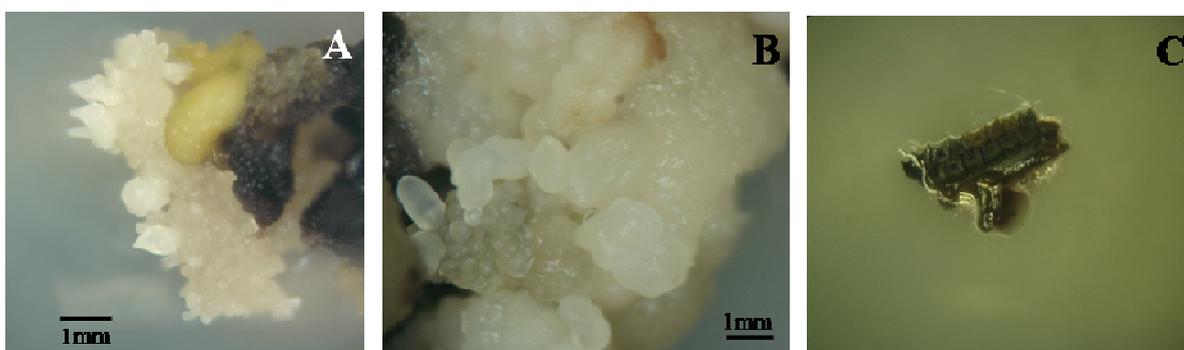


Figura 1 - Diferentes respostas da glutamina na indução de embriogênese somática em inflorescências masculinas de bananeira. A - Embriões somáticos da variedade Grande naine em meio de cultura sem glutamina, B - Embriões somáticos da variedade Maçã em 50 mg L⁻¹ de glutamina, C - Inflorescência masculina com oxidação.

Com relação ao estabelecimento das suspensões celulares, após 30 dias de subcultivos fez-se a primeira passagem das células pela peneira para retirada do material inicial. Com dois meses de subcultivos observou-se no microscópio invertido que as células em suspensão apresentavam aglomerados com tamanho variado constituído de células densas. Após três

meses de cultivo, observou-se a formação de aglomerados celulares muito pequenos para a variedade Grande naine, (Figura 2A, 2B e 2C) e de rápida multiplicação, enquanto que para a variedade Maçã houve a formação de aglomerados celulares bem maiores (Figura 3A, 3B e 3C), observando-se que esta variedade necessita de um maior número de subcultivos para formar uma suspensão com aglomerados celulares menores.

3.3.2 Regeneração das células em suspensão

Duas semanas depois das células em suspensão da variedade Grande naine serem plaqueadas em meio de cultura para regeneração, observou-se o início da formação de estruturas pró-embriônicas (Figura 2D). Com um mês de plaqueadas em meio de cultura, observou-se que os embriões já estavam formados, independentemente da combinação da concentração dos reguladores de crescimento (Figura 2E) ou ausência destes (Figura 2F). Completados 45 dias, os embriões foram transferidos para meio fresco para maturação, germinação (Figura 2G) e regeneração de plantas (Figura 2H), podendo ser observado um sistema radicular bastante desenvolvido.

Para a variedade Maçã foi observada a diferenciação dos primeiros embriões duas semanas depois de plaqueadas (Figura 3D) e após trinta dias os embriões já estavam formados (Figura 3E). Em todos os tratamentos que constituíam as associações dos reguladores de crescimento houve a formação de plantas normais e vigorosas (Figuras 3F e 3G), com bom desenvolvimento do sistema radicular e com poucas perdas durante o processo de aclimatização em estufa para as duas cultivares (Figura 2I e 3H).

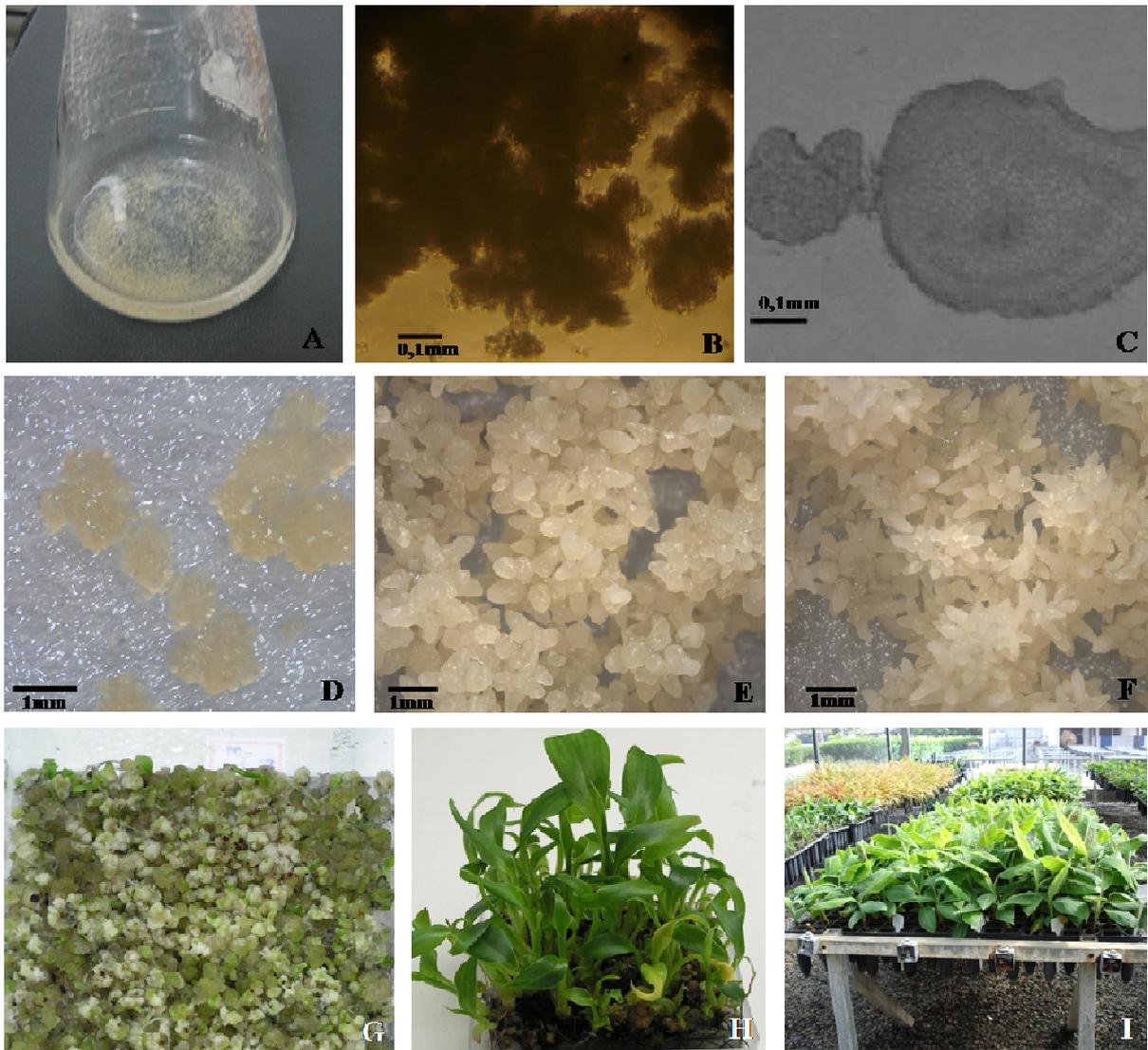


Figura 2 - Suspensão celular e regeneração de plantas de bananeira 'Grande naine' (AAA). A - Suspensão celular; B - Aglomerados celulares visto em microscópio; C - Corte histológico de um aglomerado celular; D - Formação de embriões 15 dias após plaqueamento; E e F- Embriões somáticos formados em meio com e sem reguladores de crescimento, respectivamente; G - Germinação dos embriões somáticos; H - Plantas regeneradas de suspensão celular; I - Aclimatização em casa-de-vegetação.

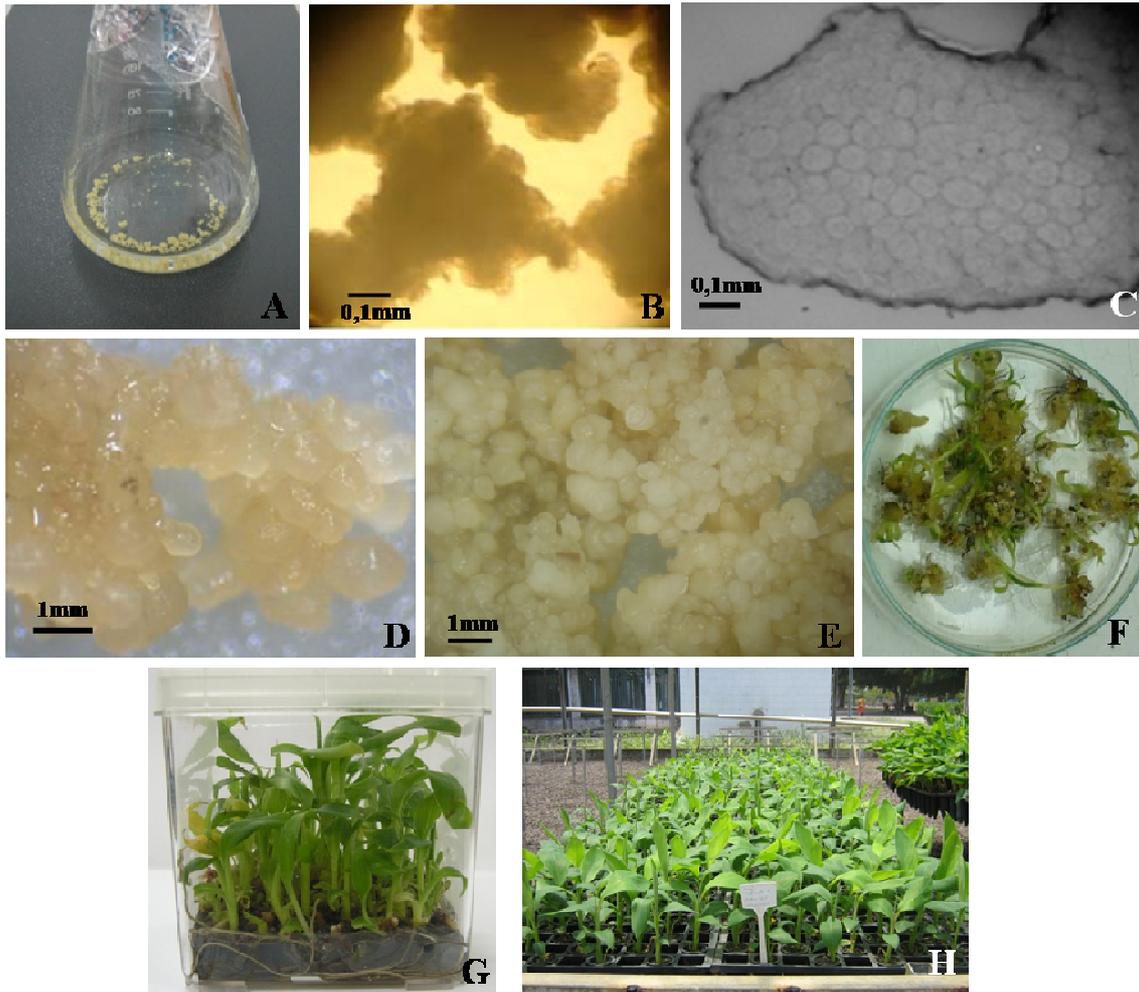


Figura 3 - Suspensão celular e regeneração de plantas de bananeira ‘Maçã’ (AAB). A - Suspensão celular; B - Aglomerados celulares visto em microscópio; C – Corte histológico de um aglomerado celular; D - Formação de embriões 15 dias após plaqueamento; E – Embriões somáticos formados in vitro com 30 dias após plaqueamento; F – Germinação dos embriões somáticos; G – Plantas regeneradas de suspensão celular; H – Aclimatização das plantas regeneradas.

As médias dos tratamentos não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) para as variáveis, número de embriões formados e número de embriões não germinados, para as variedades Maçã e Grande naine (Tabela 3). O número de embriões formados variou, na variedade Grande naine, de 11072,6 (Tratamento 1) a 6076,67 (Tratamento 5) e na variedade Maçã esta variação foi de 295,4 (Tratamento 1) a 106 (Tratamento 2). Para a variável número de embriões não germinados houve uma variação de 11071 (Tratamento 1) a 4180,67 (Tratamento 5) para a variedade Grande naine e para a Maçã houve uma variação de 131,4 (Tratamento 1) a 21,5 (Tratamento 2).

Com relação à variável número de plantas regeneradas, não houve diferença significativa nos tratamentos de 2 a 5, mas houve diferença entre estes e o tratamento 1 para a

variedade Grande naine. Para o genótipo Maçã os tratamentos 1 e 5 foram similares estatisticamente, mas diferiram dos demais.

Para ‘Grande naine’ o meio de cultura composto somente de sais e vitaminas do MS, sem acréscimo de regulador de crescimento (Tratamento 1), promoveu melhores resultados com uma média de 11.072,60 embriões somáticos formados por ml de VCA 3,3% (Tabela 3). No entanto, estes embriões não foram convertidos em plantas. Em relação ao maior número de plantas regeneradas para a variedade Grande naine, o meio de cultura composto de sais e vitaminas do MS, suplementado com 0,8 e 0,7 mg L⁻¹ de BAP e AIA (Tratamento 5), respectivamente, promoveu o maior número de plantas regeneradas, com uma média de 1.896 plantas por ml de VCA 3,3% (Tabela 3). Para a cultivar Maçã o tratamento 1, composto de sais e vitaminas do MS, sem acréscimo de reguladores de crescimento, proporcionou a formação de um maior número de embriões (295) por ml de VCA 5 %, quando comparado aos demais tratamentos.

Em relação a taxa de conversão de embriões em plantas, o melhor resultado para a variedade Grande naine, foi obtido no tratamento 5 (20,21%) e o pior no tratamento 1 (0,01%). Para o genótipo Maçã a maior porcentagem de conversão de embriões em plantas foi obtida quando se utilizou o tratamento 2 (79,72%) e a menor foi obtida quando utilizou o tratamento 1(55,52%).

Foram aclimatizadas um total de 4.000 plantas de todos os tratamentos da variedade Grande naine (Figura 2I) e 1.534 plantas da ‘Maçã’. Três meses após a aclimatização não foram observadas variações somaclonais. Após este período as plantas foram transferidas para telado e posteriormente levadas a campo.

Tabela 3. Média do número de embriões formados, embriões não germinados, número de plantas regeneradas e taxa de conversão em plantas de bananeira, a partir da regeneração de suspensão celular das variedades Grande naine e Maçã em 5 repetições por tratamento (BAP e AIA: 1: 0,0 e 0,0 mg L⁻¹; 2: 0,2 e 0,1 mg L⁻¹; 3: 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; 4: 0,6 e 0,5 mg L⁻¹; 5: 0,8 e 0,7 mg L⁻¹), após cinco meses de cultivo. Cruz das Almas, 2009.

Tratamento	Nº de embriões		Nº de plantas		Embriões não germinados		Taxa de conversão em plantas (%)	
	Grande naine	Maçã	Grande naine	Maçã	Grande naine	Maçã	Grande naine	Maçã
1	11072,6a ¹	295,4a	1b	164a	11071a	131,4a	0,01	55,52
2	8558,4a	106a	706,8a	84,5b	7851,6a	21,5a	8,01	79,72
3	10950a	127,75a	677,33a	87,75b	10272,67a	40,0a	6,19	68,69
4	6495,75a	152a	621a	93,8b	5874,75a	58,2a	9,48	61,71
5	6076,67a	250,44a	1896a	149,8a	4180,67a	100,6a	20,21	59,82
t	0.6011ns	0.1899ns	0.3018ns	0.0115**	0.5571ns	0.5523ns		
cv	9.23	9.07	30.52	6.07	13.47	21.6		

¹Médias seguidas de letras minúsculas na colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

3.3.3. Estabilidade genética das mudas produzidas por meio de marcadores SSR

Por meio dos resultados observados através da análise molecular utilizando os 11 primers de microssatélites, é possível inferir que não houve variação somaclonal entre as plantas regeneradas a partir de suspensão celular, tanto para a cultivar Grande naine quanto para a Maçã. Todos os primers apresentaram padrões de alelos únicos (monomórficos), independente do tratamento utilizado e da planta genotipada (Figuras 4, 5, 6 e 7). As plantas regeneradas destas variedades mantêm a identidade genética das cultivares originais. Com isso, é possível inferir que os protocolos utilizados para a obtenção das suspensões celulares, assim como os utilizados para regenerar plantas não induzem variação genética.

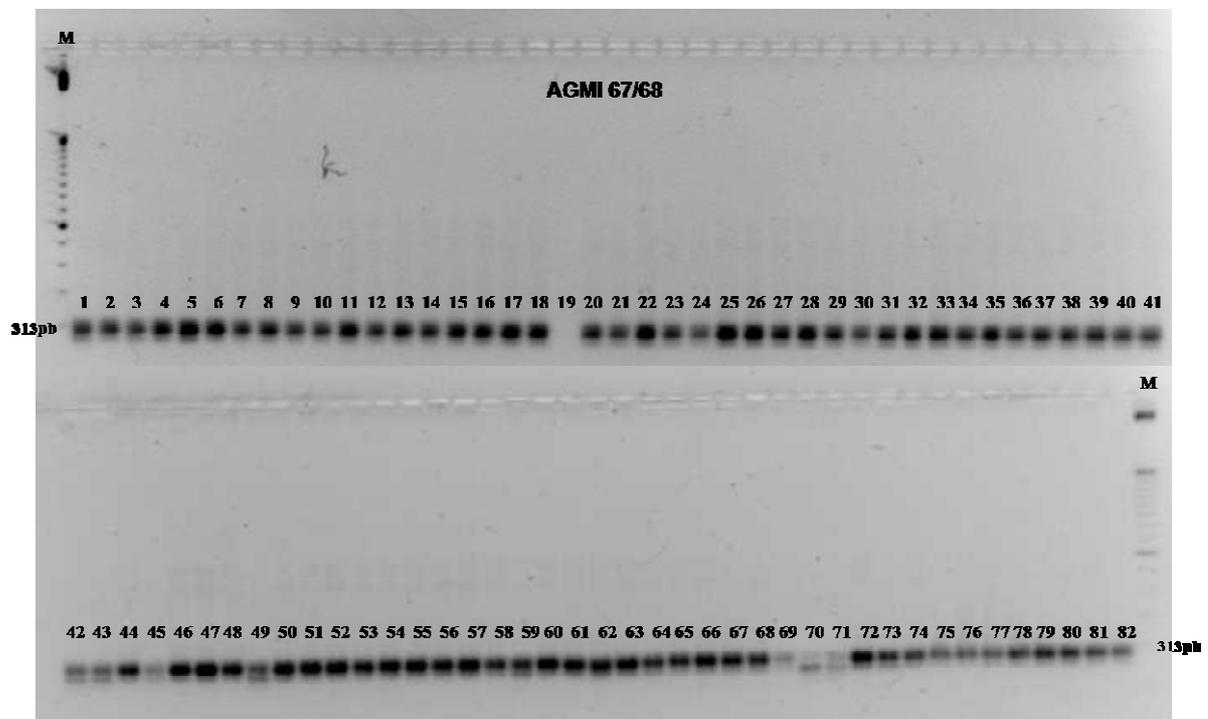


Figura 4 - Perfil SSR de diferentes plantas regeneradas a partir suspensão celular de bananeira ‘Grande naine’ gerado pelos iniciadores AGMI 67/68. A letra M representa o tamanho do marcador molecular utilizado (50pb). Amostras de 1 – 18 (TRAT 1), 19 – 36 (TRAT2), 42- 59 (TRAT 3), 60 – 77 (TRAT 4) correspondem a 18 plantas de bananeira ‘Grande naine’ de cada tratamento, 37 – 41 e 78 – 82 correspondem as plantas de bananeira ‘Grande naine’ utilizadas como testemunha.

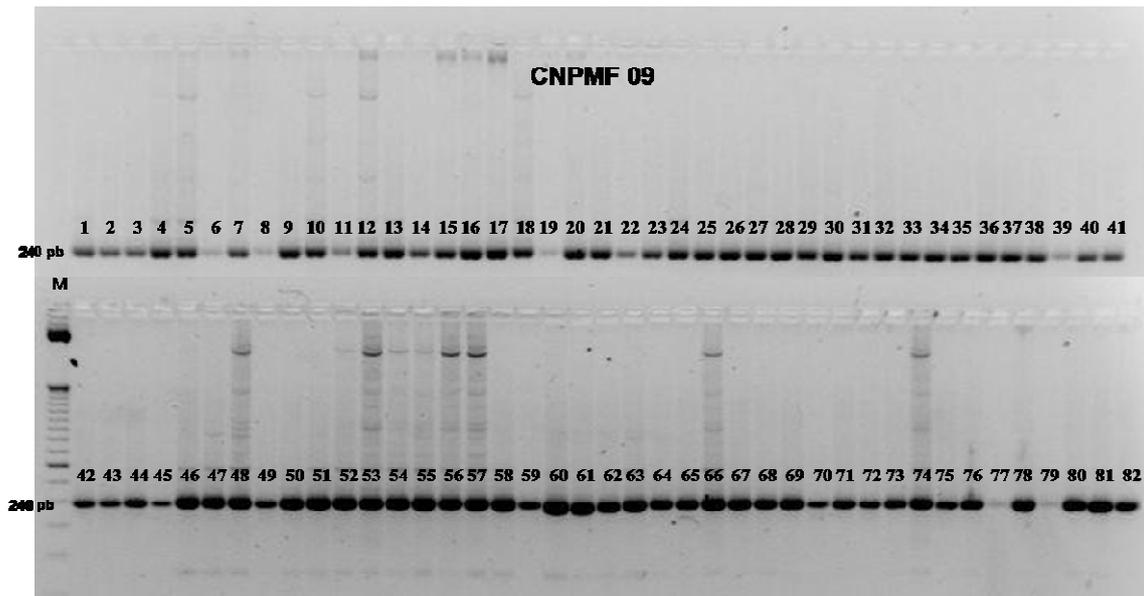


Figura 5 - Perfil SSR de diferentes plantas regeneradas a partir suspensão celular de bananeira ‘Grande naine’ gerado pelos iniciadores CNPMF 09. A letra M representa o tamanho do marcador molecular utilizado (50pb). Amostras de 1 – 18 (TRAT 1), 19 – 36 (TRAT2), 42- 59 (TRAT 3), 60 – 77 (TRAT 4) correspondem a 18 plantas de bananeira ‘Grande naine’ de cada tratamento, 37 – 41 e 78 – 82 correspondem as plantas de bananeira ‘Grande naine’ utilizadas como testemunha.

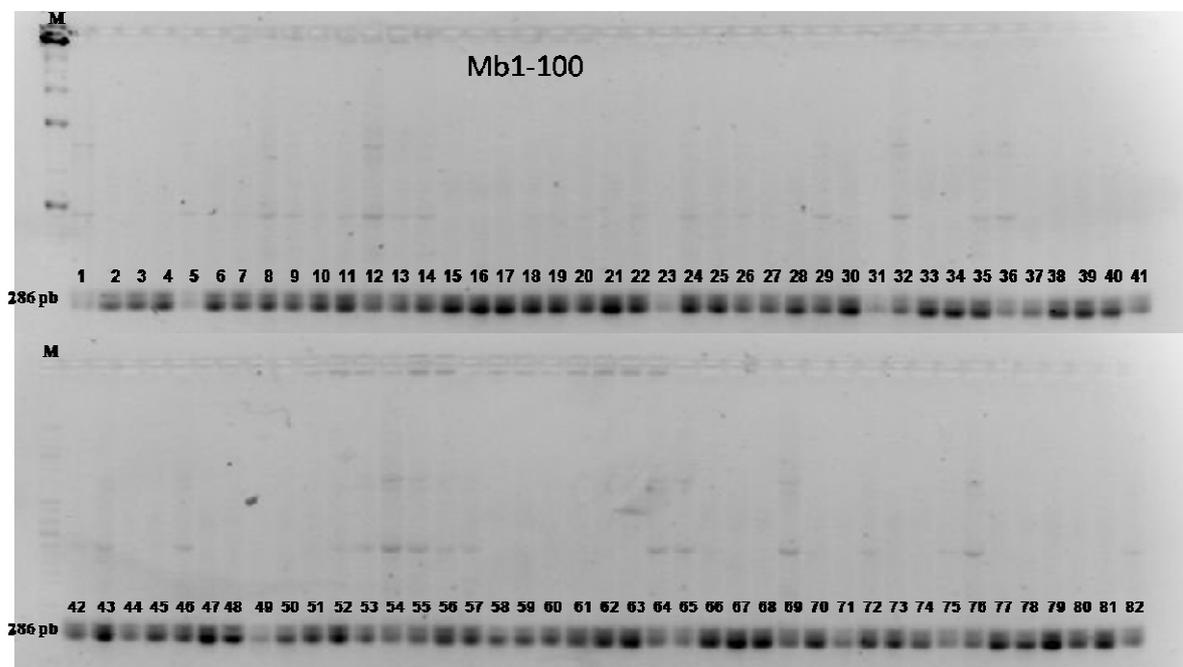


Figura 6 - Perfil SSR de diferentes plantas regeneradas a partir suspensão celular de bananeira ‘Maçã’ gerado pelos iniciadores Mb1-100. A letra M representa o tamanho do marcador molecular utilizado (50pb). Amostras de 1 – 18 (TRAT 1), 19 – 36 (TRAT2), 42- 59 (TRAT 3), 60 – 77 (TRAT 4) correspondem a 18 plantas de bananeira ‘Maçã’ de cada tratamento, 37 – 41 e 78 – 82 correspondem as plantas de bananeira ‘Maçã’ utilizadas como testemunha.

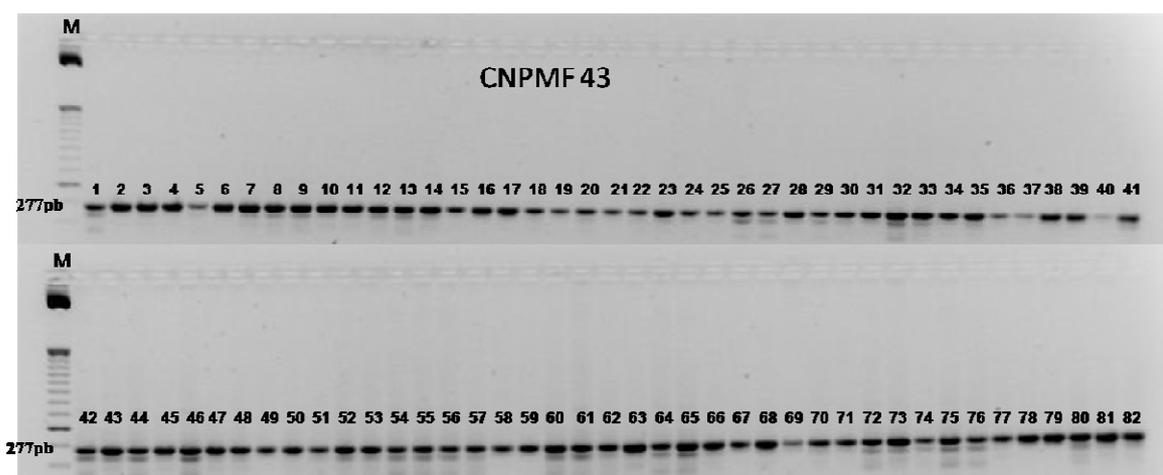


Figura 7 - Perfil SSR de diferentes plantas regeneradas a partir suspensão celular de bananeira ‘Maçã’ gerado pelos iniciadores CNPMF 43. A letra M representa o tamanho do marcador molecular utilizado (50pb). Amostras de 1 – 18 (TRAT 1), 19 – 36 (TRAT2), 42- 59 (TRAT 3), 60 – 77 (TRAT 4) correspondem a 18 plantas de bananeira ‘Maçã’ de cada tratamento, 37 – 41 e 78 – 82 correspondem as plantas de bananeira ‘Maçã’ utilizadas como testemunha.

3.4 DISCUSSÃO

Existem vários trabalhos de indução de embriogênese somática de bananeira e regeneração em plantas (JALIL et al., 2003; KOSKY et al., 2002; STROSSE et al., 2006) e nenhum sobre a estabilidade genética das plantas regeneradas por este processo.

Foi observado que as cultivares Grande naine e Maçã respondem diferentemente às concentrações de glutamina utilizadas como suplemento no meio de cultura MS para indução da embriogênese somática. De acordo com George e Debergh (2008), em alguns gêneros a maioria dos genótipos são competentes, mas em outros pode haver uma variação larga, até mesmo em competência entre cultivares dentro de uma mesma espécie.

A variedade Grande naine formou embriões somáticos na ausência de glutamina, aminoácido utilizado como suplemento a meios de cultura para induzir a formação de embriões somáticos, confirmando os resultados obtidos em outros trabalhos em bananeira do subgrupo Cavendish (STROSSE et al., 2003, ASSANI et al., 2001). Para a variedade Maçã é necessária a presença de glutamina para indução da embriogênese. Alguns trabalhos em bananeira utilizam outros reguladores para induzir a embriogênese somática (HOULLOU-KIDO et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2002, FILIPPI et al., 2001).

Quanto ao estabelecimento das suspensões celulares após três meses de subcultivos, observou-se diferença somente na formação dos aglomerados celulares entre as variedades Grande naine e Maçã, onde a primeira era composta de aglomerados celulares muito

pequenos, de coloração branco-amarelada, e a segunda apresentava aglomerados celulares maiores e amarelados. Segundo Jalil et al. (2003), a pigmentação amarelada do citoplasma indica o caráter embriogênico das células em suspensão. As células em suspensões obtidas neste trabalho para as duas variedades, podem ser classificadas segundo Domergue et al. (2000), como do tipo III (citoplasma com pequenos vacúolos, presença de grãos de amido, relação nucleoplásmica alta). Os autores descrevem que estas células são altamente embriogênicas com um número médio de embriões em torno de 150.000 a 130.000 por ml^{-1} de células aglomeradas, com 90 e 80% de germinação, respectivamente.

A regeneração da suspensão celular é de grande importância para conhecimento da qualidade da suspensão estabelecida. Neste trabalho as suspensões celulares foram diluídas em 20 e 30 vezes, para a variedade Maçã e Grande naine, respectivamente, com o objetivo de aumentar a eficiência de regeneração e os resultados obtidos corroboram aqueles observados por outros autores. Em trabalhos com a variedade Grande naine (AAA) Côte et al. (1996), observaram germinação de 3 – 20% de um total de 370.000 embriões por ml de células aglomeradas. Georget et al. (2000), estudando a mesma variedade obtiveram 154.000 embriões por ml de células aglomeradas para a variedade Grande naine e Strosse et al. (2006), regeneraram 48.000 plantas de Cavendish e 20.000 de plátanos por ml de células compactadas.

Com relação à variedade ‘Maçã’ com a qual foi obtida as maiores taxas de conversão em plantas. Estes resultados podem ser considerados bons quando comparados com os obtidos por Houllou-Kido et al. (2005), que obtiveram uma regeneração em torno de 400 plantas por 10 ml de células compactadas e não diluídas, utilizando os reguladores de crescimento BAP e AIA, em baixas concentrações ($0,045 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,205$ de AIA).

Independente da concentração de reguladores de crescimento utilizada observou-se a regeneração de plantas em todos os tratamentos das duas variedades. A formação de um maior número de embriões para a variedade Grande naine, em meio de cultura desprovido de regulador de crescimento e a conversão de somente de uma planta neste mesmo meio, pode ser devido à ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura, onde, auxinas e citocininas são os dois principais reguladores do crescimento envolvidos na regulação da divisão e diferenciação de células e tem desempenhado um importante papel na indução de embriogênese somática e organogênese (FEHE’R et al., 2003).

Com relação a estabilidade genética das plantas geradas por meio da análise molecular utilizando 11 *primers* SSR, não foi detectada nenhuma variação genética (somaclonal) entre

as amostras, uma vez que o padrão dos alelos foi comum aos tratamentos (Figuras 4, 5, 6 e 7) para as duas variedades analisadas. Shchukin et al. (1997) relataram que a taxa de variação somaclonal foi maior em plantas regeneradas da cultura de ápices da cv. Grande naine (5,3%), quando comparados àquelas derivadas de embriogênese somática (0,5 e 3,6%).

Os SSR's tem se mostrado extremamente eficientes em estudos visando a detecção da instabilidade genética em plantas provenientes de processos de embriogênese somática (WILHELM et al., 2005; MARUM, et al., 2009; JIN et al., 2008).

Apenas 9,6% das plantas de *Pinus pinaster* regeneradas a partir da embriogênese somática mostraram alterações genéticas detectadas por meio de marcadores SSR (MARUM et al., 2009). Resultados similares foram encontrados por Burg et al. (2007) ao avaliarem a instabilidade genética de plantas de *Pinus silvestres* originadas de células embriogênicas e cotiledonares e por Rahman e Rajora (2001) em mudas micropropagadas de *Pinus tremuloides*.

Em algodão Jin et al. (2008), observaram alto nível de variação somaclonal em calos embriogênicos e plantas regeneradas por meio da embriogênese somática. De acordo com os autores, a avaliação da estabilidade genética nos regenerantes, originados de suspensão celular, é um recurso essencial antes da adoção desta metodologia como um processo de propagação clonal em larga escala.

No presente trabalho, os resultados obtidos mostram que a regeneração de plantas a partir de células pode ser eficiente para obtenção de mudas de bananeira em larga escala sem a presença de variação somaclonal.

3.5 CONCLUSÕES

1. Cada variedade responde diferentemente a determinada concentração de glutamina adicionada ao meio de cultura.
2. É possível regenerar plantas a partir de suspensão celular da bananeira em larga escala com fidelidade genética.
3. O uso de marcadores microssatélites foi eficiente na confirmação da fidelidade genética das plantas regeneradas de suspensão celular das variedades de bananeira Grande naine e Maçã.

REFERÊNCIAS

- ASSANI, A. et al. Protoplast fusion in banana (*Musa* spp.): comparison of chemical (PEG: polyethylene glycol) and electrical procedure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, p. 145-151. 2005.
- ASSANI, A. et al. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.20, p.482-488, 2001.
- BECKER, D. K. et al. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv 'Grand Nain' via microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 229–234. 2000.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **Condições edafoclimáticas**. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Eds) O cultivo da bananeira. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 279 p. 2004.
- BURG, K. et al. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. **Journal of Experimental Botany**, Inglaterra, v. 58, p. 687–698. 2007.
- CÔTE, F. X. et al. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. **Physiology Plant**, v. 97, p. 285-290. 1996.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15. 1990.
- FEHE'R, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, p. 201-228. 2003.
- FERREIRA, M. G. R. et al. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, 2005.
- FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, Curitiba, v. 58, n. 4, p. 711-716. 2001.
- FOURRÉ, J. L. **Somaclonal variation and genetic molecular markers in woody plants**. In: Jain, S. M.; Minocha, S. C. (eds) Molecular biology of woody plants. Kluwer, The Netherlands, pp 425–449, 2000

- GANAPATHI, T. R. et al. Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana CV. rastha II (MUSA SPP. AAB Group). **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, v. 37, p. 178-181. 2001
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. **Micropropagation: uses and methods**. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, G. J. (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition, p. 335-355. 2008.
- GEORGET, F. et al. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 748-754. 2000.
- GHOSH, A. et al. Establishment of embryogenic cell suspension cultures and Agrobacterium-mediated transformation in an important Cavendish banana cv. Robusta (AAA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, p. 131–139. 2009.
- GUIMARÃES, N. C. C. et al. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras ‘Prata anã’, utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 448-454. 2009.
- HOULLOU-KIDO, L. M. et al. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1081-1086. 2005.
- JALIL, M.; KHALID, N.; OTHMAN, R. Y. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 209–214. 2003.
- JIN, S. et al. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1303–1316. 2008.
- KOSKY, R.G. et al. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, p. 21-26. 2002.
- KUMAR, G. B. S. et al. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. **Planta**, v. 222, p. 484-493. 2005.
- LEROY, X. J.; LEON, K.; BRANCHARD, M. Plant genomic instability detected by microsatellite-primers. **Electronic Journal Biotechnology**, Chile, n. 3, p. 5–10. 2000.

- LOPES, T. et al. Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. **Tree Physiology**, Victoria-Canadá, v. 26, p. 1145–1152. 2006.
- MARUM, L. et al. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 673 - 682. 2009.
- MATSUMOTO, K.; VILARINHOS, A. D.; OKA, S. Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts. **Euphytica**, Lavras, v. 125, p. 317-324. 2002.
- MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academics, 1995. p.155-203.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962
- NAVARRO, C.; ESCOBEDO, R. M.; MAYO, A. In vitro plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p. 17–25. 1997.
- PALOMBI, M. A.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 1061-1066. 2002.
- PANIS, B.; WITHERS, L. A.; DE LANGHE, E. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. **Cryoletters**, London, v. 11, p. 337-350. 1990.
- PEI, X. W. et al. Creation of transgenic bananas expressing human lysozyme gene for Panama wilt resistance. **Journal of Integrative Plant Biology**, China, v. 47, p. 971-977. 2005.
- PEREDO, E. L.; ARROYO-GARCÍA, R.a; REVILLA, M. A. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. **Journal Plant Physiology**, v. 166, p. 1101-1111, 2009.
- RAHMAN, M. H.; RAJORA, O. P. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 531–536. 2001.
- SAS INSTITUTE INC. **Statistical Analysis System**. Release 9.1. (Software). Cary, 2002 - 2003.
- SHCHUKIN, A.; BEN-BASSAT, D.; ISRAELI, Y. Plant regeneration via somatic embryogenesis in Grand Naine banana and its effect on somaclonal variation. **Acta Horticulturae**, Rome –Italy, v. 447, p. 317–318. 1997.

STROSSE, H. et al. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. In: VEZINA & PICQ (Eds.). INIBAP Tec. Guidelines 8. INIBAP, Montpellier, France. 2003. 31p.

STROSSE, H. et al. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue bananas and plantains (*Musa* spp.). **Plant Science**, v. 170, p. 104-112. 2006.

WILHELM, E. et al. Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 790- 795. 2005.

ZIMMERMANN, J. L. Somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plantas. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 5, p. 1411-1423. 1993.

CAPÍTULO IV

ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE BANANEIRA ‘GRANDE NAINÉ’ REGENERADAS A PARTIR DE SUSPENSÃO CELULAR

RESUMO

A utilização de técnicas de cultura de tecidos para a regeneração e propagação massal de genótipos superiores via embriogênese somática esta se tornando prática rotineira em muitos laboratórios para algumas espécies de plantas. A aclimatização destas plantas geradas é de grande importância para garantir a otimização do processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de plantas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira da cultivar Grande naine em diferentes substratos. As mudas provenientes da regeneração de suspensão celular em meio MS com quatro combinações de BAP e AIA foram transplantadas para tubetes contendo seis substratos diferentes: SC1 (Ecoterra®), SC2 (PlantMax®), SC3 (Solo), SC4 (SC1+ vermiculita®), SC5 (SC2 + Vermiculita), e SC6 (SC3 + vermiculita), num delineamento experimental inteiramente casualizado com 24 tratamentos com 20 repetições. Foram avaliadas as características, altura de planta, diâmetro do pseudocaule, número de folhas e de raízes, comprimento de folhas e raízes, e largura de folhas aos 30 e 60 dias. O maior crescimento de planta aos 30 dias foi obtido quando se cultivou as mudas no substrato SC3 e o menor quando se utilizou o substrato SC2 com ou sem vermiculita, e aos 60 dias o maior crescimento foi com o substrato SC3 (solo) e SC4 e o menor com o SC2. O meio B suplementado com $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA proporcionou os melhores resultados para a maioria dos caracteres avaliados.

Palavras-chave: Produção de mudas. *Musa* sp.. Embriogênese somática.

ABSTRACT

The use of plant tissue culture techniques for regeneration and mass propagation of superior genotypes through somatic embryogenesis is becoming a daily practice in many laboratories for some plant species. The acclimatization of these plants is very important in order to guarantee the optimization of the process. The objective of the present work was to evaluate growth of regenerated plants from cell suspension of Grande Naine banana cultivar in different substrates. Seedlings from cell suspension regeneration in MS medium with four combinations of BAP and IAA were transplanted into tubetes with six different substrates: SC1 (Ecoterra®), SC2 (PlantMax®), SC3 (Soil), SC4 (SC1+ vermiculite®), SC5 (SC2 + Vermiculite), e SC6 (SC3 + vermiculite), in complete random blocks, 24 treatments and 20 replicates. The following characteristics were evaluated: plant height, pseudostem diameter, number of leaves and roots, length of leaves and roots and width of leaves at 30 and 60 days. The largest plant growth at 30 days occurred when seedlings were cultivated in the SC3 treatment and smallest at SC2 with or without vermiculite; and at 60 days, largest growth was observed with SC3 (soil) substrate and smallest at SC2. The B medium supplemented with 0,4 mg L⁻¹ of BAP and 0,3 mg L⁻¹ of IAA showed best results for most of the characteristics evaluated.

Key-words: Somatic embryogenesis. Seedling production. *Musa* sp..

4.1 INTRODUÇÃO

A propagação da bananeira, independente da cultivar, é realizada por meio de mudas desenvolvidas a partir de gemas oriundas do seu caule subterrâneo ou rizoma, porém, esse sistema é lento e permite a disseminação de pragas que são, atualmente, um dos fatores limitantes à expansão da cultura. Apesar de inadequado, o uso de mudas convencionais ainda é bastante utilizado pelos agricultores (ALVES et al., 2004).

Mudas obtidas por micropropagação é uma alternativa bastante promissora, cuja principal meta é a produção massal de indivíduos geneticamente idênticos e fisiologicamente uniformes, com desenvolvimento normal e com plantas livres de doenças, pragas e vírus (KOZAI et al., 1997). A embriogênese somática destaca-se, entre as técnicas de micropropagação por apresentar as maiores taxas de multiplicação quando comparada aos outros processos de propagação (ZIMMERMAN, 1993).

A aclimatização representa uma etapa fundamental dentro de um programa de produção de mudas, sendo que, em alguns casos, chega a ser o fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Dentre os fatores importantes envolvidos na aclimatização *ex vitro*, destaca-se o substrato a ser utilizado, pois ele pode facilitar ou impedir o crescimento das mudas conforme suas propriedades físico-químicas. As características do substrato, entre elas a aeração, associado à elevada capacidade de retenção de água, são fatores fundamentais durante a aclimatização (CALVETE, 1998), por isso é de se esperar que cada cultura tenha diferente exigência de substrato para o seu melhor desenvolvimento (SCHMITZ et al., 2002). Neste contexto, é fundamental a determinação dos substratos adequados para a aclimatização de mudas *ex vitro*, os quais devem garantir a manutenção mecânica do sistema radicular, a estabilidade da planta, o suprimento de água e nutrientes e as trocas gasosas entre as raízes e o ar atmosférico (SILVEIRA et al., 2002).

Os substratos hortícolas são os mais utilizados na aclimatização de mudas, eles são constituídos por vermiculita expandida, materiais orgânicos (turfa, casca de *Pinus*, casca de arroz carbonizada ou composto orgânico), fertilizantes e aditivos, estes substratos são encontrados prontos para o uso, formulados por firmas idôneas, disponíveis no mercado (FILGUEIRA, 2000), como o PlantMax®.

A aclimatização é a fase final da micropropagação e quando mal conduzida, inviabiliza todo o processo de multiplicação *in vitro*. A transferência de plantas do laboratório para telados e posterior aclimatização é influenciada por vários fatores. Dentre esses estão, a

qualidade da muda e o substrato utilizado. O objetivo deste trabalho foi identificar o melhor substrato para o crescimento de plantas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira da cultivar Grande naine e verificar o efeito residual do BAP e AIA sobre a aclimatização das plantas.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na casa-de-vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas (BA), no período de agosto a setembro de 2008. Foram utilizadas 20 plantas regeneradas de suspensão celular de bananeira cultivar Grande naine oriundas de quatro meios de cultura constituídos de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE & SKOOG, 1969) acrescido de diferentes concentrações de BAP e AIA, descritas a seguir: Meio A: 0,2 e 0,1 mg L⁻¹; Meio B: 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; Meio C: 0,6 e 0,5 mg L⁻¹ e Meio D: 0,8 e 0,7 mg L⁻¹. As plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação em tubetes contendo os seguintes substratos: SC1 (Ecoterra®: Substrato comercial, composto de folhas de eucalipto decompostas, farelo de rocha, biogel e rico em microorganismos em decomposição), SC2 (PlantMax® Horticultura: Substrato comercial, composto de casca de pinus, vermiculita, turfa, corretivo de acidez, nitrato de potássio, superfosfato simples), SC3 (Solo comum), SC4 (SC1 + vermiculita - 2:1), SC5 (SC2 + vermiculita - 2:1) e SC6 (Solo + vermiculita - 2:1). A irrigação foi realizada manualmente com mangueira, uma vez por dia, no período da manhã.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 (substratos) x 4 (meios de cultura), totalizando 24 tratamentos, com 20 repetições. Cada parcela experimental foi composta por uma planta. As características altura da planta (APL), diâmetro do pseudocaule (DPC) e número de folhas (NFL), foram avaliadas no transplântio, aos 30 e 60 dias após a aclimatização. Aos 30 e 60 dias após transplântio (DAT) foram avaliadas a largura (LFD) e o comprimento (CFD) da folha mais nova e expandida (folha D), o comprimento da maior raiz (CRZ) e o número de raízes (NRZ). Para os caracteres comprimento e número de raízes realizou-se avaliação destrutiva de 10 plantas aos trinta dias após plantio (DAP). As demais plantas foram mantidas em casa de vegetação até os 60 dias após o plantio, onde avaliaram-se as mesmas características mensuradas ao 30 DAP. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para cada tempo de avaliação e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios para altura de plantas (APL), diâmetro do pseudocaule (DPC) e número de folhas (NFL) de plantas da cultivar Grande naine regeneradas a partir de suspensão celular em quatro meios de cultura e seis substratos estão apresentados na Tabela 1.

Para altura de plantas na época de transplântio (Figura 1A), houve variação de 3,8 cm (substrato SC1 e plantas originadas do meio D) a 2,02 cm nos substratos SC5 e SC6 em plantas originadas do meio D, com o maior valor de média geral para o substrato SC1 de 3,05 cm e a menor média de 2,51 cm dos substratos SC5 e SC6. Lisei de Sá & Braga (2002), observaram na aclimatização de bananeira 'Prata' micropropagadas, que o comprimento de brotos entre 30 e 60 mm, ao final da fase de enraizamento, conferiu maior vigor, facilidade de manuseio e uniformidade das plântulas durante o transplântio para casa de vegetação, evitando perdas nesta fase.

Após o período de aclimatização de 30 dias (Figura 1C) a altura variou de 10,83 cm para plantas provenientes do meio B e aclimatizadas no substrato SC4 a 4,03 para plantas originadas do meio de cultura D e aclimatizadas em substrato SC5, com uma média geral de 9,11 para meio B e 8,9 cm para substrato SC1. Aos 60 dias (Figura 1D) após plantio a altura de planta teve uma variação de 19,13 cm para plantas provenientes do meio B e aclimatizadas em substrato SC3 a 4,27 cm para plantas regeneradas no meio B e aclimatizadas no substrato SC2, com uma média geral de 13,2 cm para meio B e 17,26 cm para substrato SC3.

Tabela 1. Valores médios de Altura de plantas (APL), diâmetro do pseudocaule (DPC) e número de folhas (NFL) no transplântio (0 dias) 30 e 60 dias após transplântio de mudas de bananeira ‘Grande naine’ regeneradas a partir de suspensão celular, em quatro meios de cultura (ME) aclimatizadas em seis diferentes substratos (SUB). Cruz das Almas, 2009.

Dias	Sub	APL (cm)					DPC (cm)					NFL				
		BAP e AIA					BAP e AIA					BAP e AIA				
		A	B	C	D	Média	A	B	C	D	Média	A	B	C	D	Média
0	SC1	3,41aA	2,49bB	2,50bA	3,80aA	3,05	0,48aA	0,45aB	0,44aA	0,48aA	0,46	3,2 bA	3,4bA	4,1aA	3,5 bA	3,55
	SC2	3,06aA	2,54abB	2,30bA	2,82abB	2,68	0,46abA	0,47aB	0,40cA	0,41bcB	0,44	3,4aA	3,6aA	3,8aA	3,7aA	3,63
	SC3	2,58aB	3,09aA	2,00bA	2,97aB	2,66	0,45bA	0,53aA	0,40bA	0,28cD	0,42	3,3bA	3,3 bA	4,0 aA	3,9 aA	3,63
	SC4	2,90aB	2,29bB	2,11 bA	3,09 aB	2,60	0,43aA	0,44aB	0,41aA	0,36cC	0,41	3,6aA	3,6 aA	3,5 aB	3,5 bA	3,55
	SC5	2,78aB	2,34abB	2,02 bA	2,89 aB	2,51	0,46aA	0,46aB	0,36bB	0,31cD	0,40	3,2 aA	3,4 aA	3,4 aB	3,7 aA	3,43
	SC6	2,78aB	2,34abA	2,02 bA	2,89aC	2,51	0,43abA	0,48aB	0,42bA	0,25cE	0,40	3,6 aA	3,5 aA	3,8aA	3,7 aA	3,65
Médias		2,92	2,52	2,16	3,08		0,45	0,47	0,41	0,35		3,38	3,47	3,77	3,67	
30	SC1	8,59bB	10,27aA	8,69bA	8,05bA	8,90	0,78abB	0,84aB	0,74bA	0,70bA	0,77	7,10 aA	7,05 aB	7,30 aA	7,30 aA	7,19
	SC2	4,50bD	4,48bC	5,59abC	5,67aB	5,06	0,50bC	0,60abC	0,61aB	0,60aB	0,58	5,55 cD	5,65 abC	6,30 aB	6,10abB	5,90
	SC3	9,77aA	9,95aA	7,60bB	5,17cB	8,12	0,80bB	0,91aA	0,69cA	0,54dC	0,74	6,60 aB	6,90 aB	6,55 aB	6,26 aB	6,58
	SC4	8,89bB	10,83aA	8,20bA	5,94cB	8,47	0,78abB	0,87aA	0,73bA	0,52cC	0,72	7,50 aA	7,75 aA	7,35 aA	6,32 bB	7,23
	SC5	7,40bC	8,74 aB	5,10 cC	4,03 cC	6,32	0,73aB	0,80aB	0,55bB	0,43cD	0,63	6,30 abC	6,85 aB	5,90 bC	5,61 bC	6,17
	SC6	9,91aA	10,39aA	6,94 bB	6,42 bB	8,42	0,88aA	0,86aA	0,70bA	0,61cB	0,76	6,70 aB	6,80 aB	6,65 aB	6,56 aB	6,68
Médias		8,18	9,11	7,02	5,88		0,75	0,81	0,69	0,57		6,63	6,83	6,68	6,36	6,63
60	SC1	12,20cC	13,57abC	15,11aB	14,10aA	13,75	1,02aC	1,04aC	1,07aB	1,13aA	1,07	6,78 aA	7,30 aA	7,33 aA	7,30 aA	
	SC2	4,93abD	4,27bE	5,60abD	6,09aC	5,22	0,71aD	0,73aD	0,76aC	0,71aC	0,73	5,90abB	5,40 bB	5,60 abB	6,60 aA	5,88
	SC3	18,14 abA	19,13aA	16,87bA	14,88cA	17,26	1,36aA	1,45aA	1,31abA	1,21bA	1,33	6,70 bA	7,20 abA	7,50 abA	7,90 aA	7,33
	SC4	13,22cC	16,54abB	17,68aA	15,28bA	15,68	1,19aB	1,25aB	1,29aA	1,15aA	1,22	6,20 bB	6,37 ba	7,80 aA	7,11 abA	6,87
	SC5	7,39 bB	9,68 aD	6,22bcD	5,58 cC	7,22	0,97aC	1,01aC	0,78bC	0,58cD	0,84	5,89 aB	6,60 aA	6,10 aB	5,44 aB	6,01
	SC6	15,14aB	15,99aB	11,69bC	11,75bB	13,64	1,23aB	1,27aB	1,04bB	0,97bB	1,13	7,00 abA	6,44 bA	6,80 abA	7,71 aA	6,99
Médias		11,84	13,20	12,20	11,28		1,08	1,13	1,04	0,96		6,41	6,55	6,86	7,01	6,41

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada substrato e tempo de aclimatização e da mesma letra maiúscula em cada meio de cultura não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. SUB: 1- SC1(Ecoterra®), 2- SC2 (PlantMax®), 3- SC3(Solo comum), 4- SC4 (SC1 + vermiculita), 5- SC5 (SC2 + vermiculita), 6- SC6 (SC3 + vermiculita). ME: BAP e AIA - A. 0,2 e 0,1 mg L⁻¹; B. 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; C. 0,6 e 0,5 mg L⁻¹; D. 0,8 e 0,7 mg L⁻¹.

Tabela 2. Valores médios de número de raízes (NRZ), comprimento de raízes (CRZ), largura folha D (LFD), comprimento folha D (CFD), de mudas de bananeira ‘Grande naine’ regeneradas a partir de suspensão celular, em função de quatro meios de cultura (ME) aclimatizadas em seis diferentes substratos (SUB). Cruz das Almas, 2009.

Dias	Sub	NRZ					CRZ (cm)					LFD (cm)				
		BAP e AIA					BAP e AIA					BAP e AIA				
		A	B	C	D	Média	A	B	C	D	Medas	A	B	C	D	Média
30	SC1	9,8 aA	10,0 aA	8,5 aB	8,2 aA	9,13	17,9 aA	20,93 aA	19,68aA	18,59aA	19,28	6,06 aBA	6,83 aB	5,77 bA	5,48 bA	6,04
	SC2	7,2 aB	7,0 aB	7,6 aB	6,8 aA	7,15	19,84 aA	20,92 aA	20,16 aA	21,77 aA	20,67	3,28 abC	3,25 cD	3,98 abC	4,12 aB	3,66
	SC3	8,9abA	9,4abA	10,2 aA	7,5 cA	9,00	17,44abA	20,12 aA	18,73abA	15,1 bB	17,85	5,77 aB	6,48 aB	4,81 bB	3,49 cC	5,14
	SC4	9,9 aA	9,5abA	8,7 abB	7,7 bA	8,95	20,55 aA	19,76 aA	18,41abA	15,03 bB	18,44	6,40 bA	7,51 aA	5,66 bA	3,96 cB	5,88
	SC5	8,5 aB	9,1 aA	7,7 aB	7,75 aA	8,26	20,18 aA	22,0 aA	19,45abA	15,36 bB	19,25	5,10 aB	5,24 aC	3,69 bC	2,64 cD	4,17
	SC6	9,9 aA	10,0 aA	8,8 aB	6,0 bA	8,68	19,24 aA	18,62 aA	17,43 aA	16,05 aB	17,84	6,51 aA	6,65 aB	4,79 bB	4,39 bB	5,59
Médias		9,03	9,17	8,58	7,33	8,53	19,19	20,39	18,98	16,98		5,52	5,99	4,78	4,01	
60	SC1	13,4 aA	10,9 aA	11,1 aA	11,8 aA	13,05	17,24 aB	18,72 aA	17,88 aB	18,62 aA	18,12	8,38 bB	8,70 abB	9,63 aA	9,51aA	9,06
	SC2	7,1 aB	7,8 aA	8,5 aA	8,1 aA	7,88	19,40 aB	21,04 aA	20,50 aB	19,47 aA	20,10	2,45 abD	1,99 bD	3,26 aD	3,36 aD	2,77
	SC3	13,2 aA	10,5 aA	11,2aA	11,8aA	11,68	19,42 aB	19,69 aA	17,66 aB	18,51 aA	18,82	9,54 abA	10,06 aA	8,73bB	8,60 bB	9,23
	SC4	11,8 aA	11,0 aA	10,8 aA	10,4 aA	11,00	17,95 aB	17,15 aA	19,09 aB	17,39 aA	17,90	8,05 bB	9,19 aB	9,92 aA	9,26 aA	9,11
	SC5	11,3 aA	11,8 aA	11,8 aA	10,6 aA	11,38	30,26 aA	20,59 bA	28,23 aA	18,12 bA	24,30	4,12 abC	4,88 aC	3,50 bD	3,42 bD	3,98
	SC6	12,3 aA	11,7 aA	11,6 aA	9,3 aA	11,23	23,05 aB	22,01 aA	18,67 aB	22,38 aA	21,53	8,28 abB	9,00 aB	7,42 bcC	6,58 cC	7,82
Médias		12,35	10,62	10,83	10,33		21,22	19,87	20,34	19,08		6,80	7,30	7,08	6,79	

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada substrato e tempo de aclimatização e da mesma letra maiúscula em cada meio de cultura não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. SUB: 1- SC1(Ecoterra®), 2- SC2 (Plantmax®), 3- SC3(Solo comum), 4- SC4 (SC1 + vermiculita), 5- SC5 (SC2 + vermiculita), 6- SC6 (SC3 + vermiculita). ME: BAP e AIA - A. 0,2 e 0,1 mg L⁻¹; B. 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; C. 0,6 e 0,5 mg L⁻¹; D. 0,8 e 0,7 mg L⁻¹.

Continuação Tabela 2

Dias	Sub	CFD				Média
		BAP e AIA				
		A	B	C	D	
30	SC1	12,48abA	13,90 aA	12,09 bA	11,63 bA	12,53
	SC2	8,15 aB	8,01 aC	8,96 aC	9,42 aB	8,64
	SC3	12,23 bA	14,26 aA	9,99 cB	7,68 dC	11,04
	SC4	12,91 bA	15,14 aA	11,80 bA	8,84 aB	12,17
	SC5	12,03 aA	12,82 aB	8,41 bC	6,86 bC	10,03
	SC6	13,38aA	14,26 aA	9,98 bB	9,62 bB	11,81
Médias		11,86	13,07	10,21	9,01	
60	SC1	17,09 bB	18,37abB	19,19abB	19,41 aA	18,52
	SC2	7,60 bcD	6,80cD	9,13 abD	10,04 aC	8,39
	SC3	21,38 aA	22,79 aA	20,73 abA	19,24 bB	21,04
	SC4	17,83 bB	19,29abB	21,22 aA	19,44abA	19,45
	SC5	11,03 bC	13,57 aC	9,88 bD	10,08 bC	11,14
	SC6	20,47 aA	21,17 aA	16,22 cC	16,04 bB	18,48
Médias		15,90	17,00	16,06	15,71	

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada substrato e tempo de aclimatização e da mesma letra maiúscula em cada meio de cultura não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. SUB: 1- SC1 (Ecoterra®), 2- SC2 (PlantMax®), 3- SC3(Solo comum), 4- SC4 (SC1 + vermiculita), 5- SC5 (SC2 + vermiculita), 6- SC6 (SC3 + vermiculita). ME: BAP e AIA - A. 0,2 e 0,1 mg L⁻¹; B. 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; C. 0,6 e 0,5 mg L⁻¹; D. 0,8 e 0,7 mg L⁻¹.

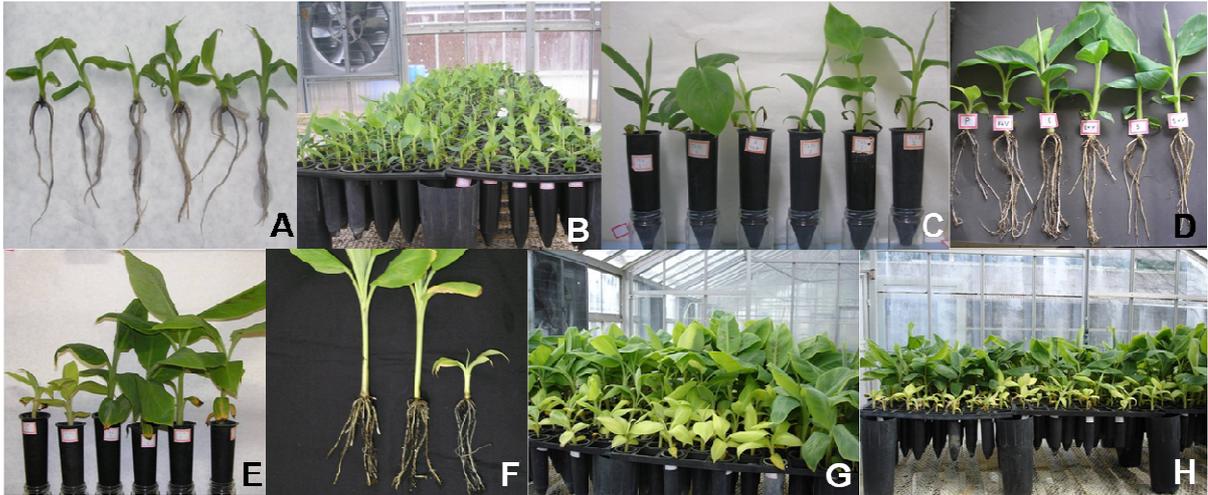


Figura 1: Mudanças de banana 'Grande naine' regeneradas a partir de suspensão celular em quatro meios de cultura, aclimatizadas em seis diferentes substratos: A: mudas antes da aclimatização, B: mudas com 15 dias após aclimatização, C: plantas com um mês de aclimatizadas (da esquerda para direita, duas plantas crescidas no substrato SC1, SC2 e SC3), D: plantas com um mês de aclimatizadas mostrando o sistema radicular (da esquerda para direita, duas plantas crescidas no substrato SC2, SC1 e SC3), E: plantas com 60 dias de aclimatização (da esquerda para direita, duas plantas crescidas no substrato SC2, SC1 e SC3), F: plantas com raízes sessenta dias após aclimatização (da esquerda para direita, plantas crescidas no substrato SC3, SC2 e SC1), G: plantas com folhas amareladas crescidas em substrato SC5 e H: plantas com folhas amareladas crescidas em substrato SC2.

A altura da planta é uma variável muito importante e até mesmo determinante para a definição do momento do transplântio para o campo. O número e o tamanho das folhas são informações de extrema importância, pois determinam a área fotossintetizante, fundamental para a sobrevivência e desenvolvimento da planta (SOUZA JUNIOR et al., 2001).

Em relação ao diâmetro do pseudocaule (DPC), na época de transplântio as médias variaram de 0,53 cm para plantas regeneradas em meio B e aclimatizadas no substrato SC3 a 0,25 cm para plantas regeneradas no meio D e aclimatizadas no substrato SC6. Aos 30 dias após o plantio o DPC variou de 0,91 cm para plantas regeneradas em meio B e aclimatizadas em substrato SC3 a 0,43 cm para plantas provenientes do meio D aclimatizadas em substrato SC5, com uma média geral de 0,81 cm para o meio B e 0,77 cm para o substrato SC1. Para 60 DAP em casa de vegetação este caráter apresentou uma variação de 1,45 cm para plantas regeneradas em meio B e aclimatizadas no substrato SC3 a 0,58 cm para plantas provenientes do meio D e aclimatizadas no substrato SC5, com média geral de 1,33 cm para o substrato SC3 e 1,13 cm para Meio B. Os melhores valores foram observados para a combinação Meio B e Substrato SC3, tanto aos 30 quanto aos 60 dias após o plantio.

Para o caráter número de folhas na época de transplântio houve variação de 4,1 folhas para plantas originadas do meio C e aclimatizadas no substrato SC1 a 3,2 folhas para plantas regeneradas no meio A e aclimatizadas nos substratos SC1 e SC5. Aos 30 DAP, a melhor combinação foi obtida quando se utilizou plantas provenientes do Meio B aclimatizadas no

Substrato SC4 (7,75 folhas), enquanto que os piores valores foram observados em mudas originadas da regeneração em Meio A e aclimatizadas a em Substrato SC2 (5,5 folhas). Aos 60 DAP, o número de folhas variou de 7,9 para plantas oriundas do meio D e aclimatizadas no Substrato SC3 a 5,4 para a plantas provenientes do meio B e aclimatizadas em substrato SC2 (Tabela 1).

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios para número de raízes (NRZ), comprimento de raízes (CRZ) e largura (LFD) da folha D de mudas de bananeira da cultivar Grande naine. O caráter número de raízes aos 30 DAP variou de 10,2 para plantas regeneradas em meio C e aclimatizadas no substrato SC3 a 6,0 raízes para plantas provenientes do meio D e aclimatizadas no substrato SC6, com uma média geral de 9,13 para substrato SC1 e 9,17 para Meio B. Aos 60 DAP este caráter variou de 13,4 raízes para plantas originadas de meio A e aclimatizadas no substrato SC1 a 7,1 para plantas oriundas de meio A aclimatizadas em substrato SC2, com média geral de 13,05 para substrato SC1 e 12,35 para meio A.

Em relação ao comprimento das raízes, aos 30 DAP, as plantas provenientes do meio B aclimatizadas no Substrato SC5, apresentaram os melhores resultados, com 22,0 cm de comprimento de raiz e aos 60 dias os maiores comprimento de raízes foram obtidos quando se utilizou plantas regeneradas em meios A e C e aclimatizadas no substrato SC5 com valores de 30,26 e 28,23 cm, respectivamente (Tabela 2).

Para a largura da folha D (LFD), foi observada aos 30 DAP uma variação de 7,51 cm para plantas provenientes do meio B e aclimatizadas no substrato SC4 a 2,64 cm para plantas regeneradas em meio D e aclimatizadas no substrato SC5 com media geral de 5,99 cm para meio B e 6,04 cm para o substrato SC1. Aos 60 DAP a LFD variou de 10,06 cm para plantas oriundas do meio B aclimatizadas no substrato SC3 a 1,99 cm para plantas provenientes do meio B e aclimatizadas no substrato SC2, com media geral de 9,23 cm para o substrato SC3 e 7,30 cm para Meio B (Tabela 2).

Com relação ao comprimento da folha D (CFD) (Tabela 2) observou-se que a variação foi de 15,14 cm para plantas provenientes do meio B e aclimatizadas no substrato SC4 a 6,86 cm para plantas regeneradas em meio D e aclimatizadas no substrato SC5, com média geral de 13,07 cm para Meio B e 12,53 cm para o substrato SC1. Aos 60 DAP o CFD variou de 22,79 cm para plantas provenientes do meio B e aclimatizadas no substrato SC3 a 6,80 cm para plantas regeneradas em Meio B e aclimatizadas no substrato SC2, com média geral de 17,00 cm para Meio B e 21,04 cm para o substrato SC3.

Os principais efeitos dos substratos se manifestam sobre as raízes, e assim influenciam o crescimento da própria raiz e da parte aérea (HARTMAN et al., 1990). Pereira et al. (2005)

trabalhando com aclimatização de bananeira utilizando como substrato o PlantMax® obtiveram aos final de 30 DAP as melhores médias para altura de plantas, diâmetro do pseudocaule e numero de folhas. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho.

O uso de substratos comerciais assegura a repetibilidade dos resultados em trabalhos de pesquisa e na produção comercial de plantas, devido à sua uniformidade química e física (HOFFMANN et al., 2001). O Substrato PlantMax® tem sido utilizado para a formação de mudas de eucalipto, pinus, citrus, maracujazeiro, olerícolas e também cafeeiro (SKREBSKY et al., 2006). Quando comparado a outros substratos, apresenta vantagens pela sua uniformidade físico-química (HOFFMANN et al., 2001; COUTO et al., 2003), todavia esse substrato necessita de suplementação nutritiva para se obter mudas de melhor qualidade.

Considerando o sistema radicular (número e comprimento das raízes) das plantas aclimatizadas (Figura 1E e 1F), observou-se um bom desenvolvimento radicular em todos os substratos utilizados. Entretanto os substratos SC2 e SC5 que apresentaram PlantMax® em sua composição, promoveram a formação de um menor numero de raízes aos 30 e 60 dias com escurecimento dos pelos absorventes. Acrescenta-se ainda, que nesses tratamentos houve uma redução no crescimento da parte aérea, com uma paralisação no surgimento de novas folhas e pouca expansão da largura e comprimento foliar, como pode ser observado nos dois períodos de avaliação, em relação aos demais substratos (Tabela 2).

Após 60 dias de transplântio os substratos não suportaram o crescimento das plantas devido ao esgotamento de nutrientes ou até mesmo em função do espaço limitado nos tubetes para desenvolvimento das raízes. Também foi observado que o tempo de permanência de mudas aclimatizadas em substratos como o SC1 ou SC3 com ou sem vermiculita é de, no máximo, 60 dias, quando as plantas apresentam um desenvolvimento necessário para serem transferidas para telado em recipientes maiores e ou campo. No entanto, Costa et al. (2008) relatam que aos 90 dias após transplântio as mudas micropropagadas, apresentaram pouco desenvolvimento da parte aérea, onde muitas vezes as plantas apresentavam apenas uma folha expandida, e rizoma pouco definido, com fraca iniciação de primórdios radiculares, sugerindo baixa quantidade de reservas para sustentarem seu crescimento *ex vitro*.

Os resultados obtidos com relação ao substrato SC2 corroboram aqueles observados por outros autores (SKREBSKY et al., 2006; PEREIRA et al., 2005, Rocha et al., 2008). No entanto, observou-se um efeito negativo deste substrato no crescimento de mudas regeneradas a partir de suspensão celular de bananeira ‘Grande naine’, gerando plantas pouco desenvolvidas quando comparadas aos outros substratos testados, proporcionando

crescimento das plantas nos primeiros 30 dias e a partir de então paralisando o crescimento, tornando as folhas amareladas e coriáceas (Figura 1G e H). Alguns substratos podem apresentar concentrações tóxicas de alguns elementos, entre eles o alumínio, o ferro e o manganês e, também, baixo teores de nutrientes essenciais Leon (1993) apud Einloft et al. (1999). Em videira observou-se sintomas de deficiência de ferro como o amarelecimento nas folhas novas e brotos e de manganês as partes apicais mortas, aspecto clorótico geral das folhas novas, podendo confundir seus sintomas com carência de ferro, de zinco, ou de magnésio (TERRA et al., 1993).

Os resultados obtidos neste trabalho com o substrato SC1 (Ecoterra) corroboram com os obtidos por Rocha et al. (2008), estes autores em trabalho com aclimatização de microplantas de jenipapeiro, citam que o teor de matéria orgânica (204 g.dm^{-3}) deste substrato aliado à concentração de fósforo (970 mg.dm^{-3}), potássio (930 mg.dm^{-3}), cálcio ($19,5 \text{ Cmol.dm}^{-3}$), magnésio ($5,3 \text{ Cmol.dm}^{-3}$), alumínio ($0,25 \text{ Cmol.dm}^{-3}$), sódio ($0,32 \text{ Cmol.dm}^{-3}$), favoreceu o bom desenvolvimento das plantas tanto da parte aérea quanto do sistema radicular.

Todos os substratos utilizados mostraram valores estatisticamente diferentes entre si, observando-se superioridade para os tratamentos que não continham o substrato SC2. De uma forma geral as combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIA, adicionados ao meio de cultura para regeneração das células em suspensão, não interferiu no desenvolvimento das mudas de bananeira 'Grande naine' *ex vitro*, porém, observou-se que o meio B suplementado com $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA promoveu os melhores resultados para a maioria dos caracteres avaliados. Durante o desenvolvimento das mudas em casa de vegetação, foi realizada avaliação visual e não foi observada a presença de variantes somaclonais. Desta forma, as condições propostas para a aclimatização de mudas de bananeira da cultivar Grande naine, regeneradas a partir de suspensão celular, são bastante favoráveis.

4.4 CONCLUSÕES

1. É possível a aclimatização de mudas de bananeira da variedade Grande naine regeneradas de suspensão celular;
2. Mudas de bananeira apresentam bom desenvolvimento no substrato comercial Ecoterra®;
3. Os substratos utilizados para aclimatização das mudas de bananeira não suportaram o crescimento das mesmas após os 60 dias;
4. A utilização dos reguladores de crescimento BAP e AIA na fase de regeneração de plantas melhoram a capacidade de aclimatização e desenvolvimento inicial das mudas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. J. et al. **Propagação**. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (EDS). O cultivo da bananeira. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p. 59-86. 2004.
- CALVETE, E. O. **Concentração de sacarose in vitro e seleção de substratos para aclimatização ex vitro de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- COSTA, F. H. S. et al. Relação entre o tempo de enraizamento in vitro e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 31-37. 2008.
- COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29c (*Prunus cerasifera* EHRH.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 125-128. 2003.
- EINLOFT, R. et al. Crescimento de gramíneas e leguminosas em substrato rico em Mn proveniente de área de empréstimo. **Revista Árvore**, Viçosa. 23, n., p. 203-212. 1999.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402 p.
- 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.99-170.

- HARTMANN, H. T. KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 5 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 642p.
- HOFFMANN, A et al. B. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'MARUBAKAIDO'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.2, p.462-467. 2001.
- KOZAI, T; KUBOTA, C.; BYOUNG, R. J. Enviromental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p. 49-56. 1997.
- LISEI DE SÁ, M. E.; BRAGA, M. F. Avaliação de protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata-anã (subgrupo AAB). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 236-239. 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid`growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962
- PEREIRA, Marlon Cristian Toledo et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 2, p. 238-240. 2005.
- ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento in vitro e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.
- SCHMITZ, J. A. K.; SOUZA, P. V. D.; KAMPF, A. N. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 937-944. 2002.
- SILVEIRA, E. B. et al. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 211-216, 2002.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida in vitro sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1416-1423. 2006.
- SOUZA JUNIOR, E. E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] CV. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v. 31, n. 2, p. 147-151. 2001.
- TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, N. A. M. **Tecnologia para produção de uva Itália na região noroeste do Estado de São Paulo**. Campinas, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1993. 51p. (Documento Técnico, 97).

ZIMMERMANN, J. L. Somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plantas. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423. 1993.

CONCLUSÃO GERAL

1. Com a metodologia desenvolvida neste trabalho é possível produzir mudas de bananeira regeneradas a partir de suspensão celular com qualidade e com estabilidade genética.
2. Quanto à indução de embriogênese somática de bananeira, o uso de variedades pertencentes a grupos genômicos deferentes requer meios de culturas adequados, pois, cada genótipo responde diferentemente a determinado meio de cultura na fase indução de embriogênese.
3. Os marcadores SSR não identificaram variações genéticas em mudas provenientes da regeneração de suspensão celular de variedade de bananeira.
4. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser de grande ajuda para trabalhos futuros de melhoramento genético não convencional, utilizando suspensão celular de bananeira em transformação genética, hibridação somática e propagação massal.