

**OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO CELULAR  
E REGENERAÇÃO  
DE EMBRIÕES SOMÁTICOS  
DE BANANEIRA CV. PRATA-ANÃ**

**CAROLINA DELFIM FERNANDES LIMA**

**2009**

**CAROLINA DELFIM FERNANDES LIMA**

**OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO CELULAR E REGENERAÇÃO DE  
EMBRIÕES SOMÁTICOS  
DE BANANEIRA CV. PRATA-ANÃ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Lima, Carolina Delfim Fernandes.

Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões somáticos de bananeira cv. *prata-anã* / Carolina Delfim Fernandes Lima. – Lavras : UFLA, 2009.

69 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Cultura de tecidos. 2. Viabilidade celular. 3. Tetrazólio. 4. Embriogênese somática . 5. Banana. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.77289

**CAROLINA DELFIM FERNANDES LIMA**

**OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO CELULAR E REGENERAÇÃO DE  
EMBRIÕES SOMÁTICOS  
DE BANANEIRA CV. PRATA-ANÃ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 31 de julho de 2009

Dr. Marcelo Murad Magalhães

UFLA

Prof. Dr. Sandro Barbosa

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Breno Régis Santos

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Ti Senhor toda honra, toda glória e gratidão por me carregar em Seu colo amoroso de Pai durante toda caminhada.

À minha mãe Tereza, por todo amor, sem a qual jamais teria conseguido chegar até aqui.

***OFEREÇO.***

Ao meu pai Amadeu e minhas avós Dina e Nega, exemplos cujos valores serão eternos, assim como a saudade que sinto.

***DEDICO.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Luciano Vilela Paiva, pela oportunidade e infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Professor Breno, pelos ensinamentos, paciência, crescimento profissional e por sempre acreditar em mim.

Aos demais membros da banca: Professor Sandro e Dr. Marcelo Murad pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

Ao amigo Luciano Coutinho, pelo apoio, paciência e direção dada, sem a qual nada seria possível.

A todos do LCBM, especialmente ao Douglas e ao Leonardo (Grupo da Banana) e também à Marlúcia, por todo apoio, amizade e conselhos.

À amiga Evânia, por toda paciência, ajuda e amizade para sempre.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos do Dep. de Fisiologia Vegetal, especialmente à Tininha, por toda ajuda e ensinamentos.

À Dona Irondina e Rafaela do DBI, pela agradável e eterna amizade.

Ao meu avô João, pela torcida e carinho.

A toda minha família que soube compreender minha ausência sem se esquecer de mim um só segundo mostrando ser a melhor família do mundo.

Aos amigos de São Lourenço, Lavras e Aracruz (especialmente à Ronilda e Quézia Baudson e família GPP), aos amigos da graduação e de república que de alguma forma contribuíram com carinho, orações e apoio.

Ao Lucas, por toda compreensão, companheirismo, orações, amor “love” inexplicável e por fazer do meu sonho também o seu.

**AGRADEÇO.**

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução .....	2
2 Referências Bibliográficas.....	6
CAPÍTULO 2 Características embriogênicas em calos de bananeira cv. <i>prata-anã</i> em diferentes idades.....	10
1 Resumo.....	11
2 Abstract.....	12
3 Introdução.....	13
4 Material e Métodos.....	15
4.1 Local de execução.....	15
4.2 Material botânico.....	15
4.3 Análise da viabilidade celular por tetrazólio e tipificação celular pelo método da contagem celular.....	16
4.4 Delineamento Estatístico.....	17
5 Resultados e Discussão.....	17
6 Conclusões.....	22
7 Referências Bibliográficas .....	22
CAPÍTULO 3 Curva de crescimento de suspensão e viabilidade celular de bananeira cv. <i>prata-anã</i> .....	27
1 Resumo.....	28
2 Abstract.....	29
3 Introdução.....	30

4 Material e Métodos.....	31
4.1 Local de execução.....	31
4.2 Material botânico.....	32
4.3 Análise do crescimento da suspensão celular.....	32
4.4 Análise do potencial embriogênico utilizando a dupla coloração com Carmim-Acético e o Azul-de-Evans.....	33
4.5 Delineamento estatístico.....	34
5 Resultados e Discussão.....	34
5.1 Crescimento da suspensão celular.....	34
5.2 Tipificação dos agregados e estimativa do potencial embriogênico utilizando a dupla coloração com Carmim- Acético e o Azul-de-Evans.....	37
6 Conclusões.....	42
7 Referências Bibliográficas.....	42
CAPÍTULO 4 Embriogênese somática e regeneração de bananeira cv. <i>prata-anã</i> .....	45
1 Resumo.....	46
2 Abstract.....	47
3 Introdução.....	48
4 Material e Métodos.....	49
4.1 Local de execução.....	49
4.2 Material botânico.....	49
4.3 Experimento 1: Influência de diferentes reguladores de crescimento na regeneração de células em suspensão.....	50
4.3.1 Delineamento Estatístico.....	51
4.4 Experimento2: Influência de diferentes meios de cultivo na regeneração de suspensões celulares.....	51

4.4.1 Delineamento estatístico.....	52
5 Resultados e Discussão.....	52
5.1 Experimento 1: Influência de diferentes reguladores de crescimento na regeneração de células em suspensão.....	52
5.2 Experimento2: Influência de diferentes meios de cultivo na regeneração de suspensões celulares.....	56
6 Conclusões.....	60
7 Referências Bibliográficas.....	61
Considerações Finais.....	64
ANEXOS.....	65

## RESUMO GERAL

LIMA, Carolina Delfim Fernandes. **Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões somáticos de bananeira cv. prata-anã**. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A bananeira é uma espécie pertencente à família Musaceae típica de regiões tropicais e subtropicais, apresentando grande importância econômica e social no mundo, uma vez que constitui fonte de renda e alimento para milhões de pessoas. Técnicas de biotecnologia associadas à cultura de tecidos e à biologia molecular auxiliam no melhoramento desta espécie com a obtenção de cultivares resistentes e agronomicamente melhoradas. Com a finalidade de otimizar a produção de plântulas via micropropagação *in vitro* utilizando a técnica de embriogênese somática de bananeira cv. *prata-anã*, o presente trabalho foi dividido em três etapas. Na primeira, o objetivo foi caracterizar calos embriogênicos em diferentes idades, a segunda, foi determinar o crescimento de suspensões celulares em diferentes meios de cultura, tipificar e caracterizar os aglomerados celulares da suspensão utilizando a dupla coloração com Carmim-Acético e Azul-de-Evans e a terceira, otimizar o processo de indução e regeneração de embriões somáticos até a fase de plântula. A caracterização foi realizada utilizando-se calos do terceiro ao décimo mês de cultivo, pelo teste de viabilidade celular com tetrazólio, sendo realizada também a contagem de células isodiamétricas com auxílio da Câmara de Neubauer. Para o teste de viabilidade a maior absorvância foi encontrada aos 7 meses de cultivo e a maior porcentagem de células com características embriogênicas foi encontrada aos 6 meses de cultivo. Com relação à curva de crescimento das células em suspensão, não houve diferença significativa entre os dois meios de cultivo em relação aos dias de subcultivo. Os aglomerados cultivados nesses diferentes meios de cultura foram tipificados com relação ao tamanho e coloração, sendo o Tipo 1 (células dispersas e pequenos aglomerados); o Tipo 2 (agregados de 50 a 1000  $\mu\text{m}$  com a ausência de células alongadas coradas pelo Azul-de-Evans) e o Tipo 3 (agregados de 50 a 1000  $\mu\text{m}$  com células alongadas coradas pelo Azul-de-Evans). Os aglomerados do Tipo 2 foram considerados os mais embriogênicos por apresentar células isodiamétricas, pequenas e coradas somente pelo Carmim-Acético. Com relação ao tamanho médio dos

---

\* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (orientador), Breno Régis Santos UNIFAL – MG, Sandro Barbosa – UNIFAL - MG

aglomerados nos diferentes meios, observou-se a predominância do Tipo 2. O maior potencial embriogênico para aglomerados do Tipo 2 foi encontrado a partir do 6º e 3º subcultivos nos meios MA2 (MS sais, vitaminas MA (1,0 mg/L biotina, 2,0 mg/L glicina, 100 mg/L mio-inositol, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl, 0,1 mg/L tiamina.HCl), 100 mg/L extrato de malte, 100 mg/L de glutamina, 45 g/L sacarose, 1,0 mg/L 2,4-D, pH 5.3) e CNPMF (MS sais e vitaminas, 1mg/L 2,4-D, 100 mg/L glutamina, 10 mg/L ácido ascórbico, 44,5 g/L sacarose, pH 5.3), respectivamente. Para os testes de regeneração de embriões somáticos foram realizados dois experimentos, onde no primeiro utilizou-se o meio MS com 3 combinações de AIA e BAP (2,2 e 2,2; 11,4 e 2,2; 2 e 2  $\mu$ M, respectivamente). Foi observado que no meio de cultura suplementado com 11,4  $\mu$ M de AIA e 2,2  $\mu$ M de BAP encontrou-se o maior número de embriões na fase cotiledonar (65), maior número e tamanho de plântulas (30) e (1,9 cm), respectivamente. No segundo experimento, quando se utilizou os meios de regeneração descrito por Boxtel & Berthouly (1996) (MRB), Teixeira et al. (2004) (MRT), Strosse et al. (2003) (MA3) e Morais-Lino et al. (2008), com as seguintes modificações: 1,33  $\mu$ M de BAP e 2,28  $\mu$ M de AIA (MRM), observou-se que os meios MRT e MRB são os mais indicados para a regeneração de embriões somáticos para a *cv. prata-anã*.

Palavras-chaves: cultura de tecidos; viabilidade celular; tetrazólio; embriogênese somática; banana.

## GENERAL ABSTRACT

LIMA, Carolina Delfim Fernandes. **Obtention of cellular suspension and regeneration of somatic embryos from banana plant cv. *prata-anã***. 2009. 69 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

The banana plant is a specie belonging to Musaceae family, typical of tropical and subtropical regions, showing great economical and social importance in the world, composing the basis for income and nutrition for millions of people. This research aimed to optimize the plantlet production via micropropagation *in vitro* using the somatic embryogenesis of banana plant cv. *prata-anã*. The present work was divided in three parts. The first one, the objective was to characterize different embryogenic callus in different ages. The second was determine the cellular suspension growth in different culture medium. And characterize the cellular agglomerates from suspension by double coloration with Aceto-carmin and Evans-blue. Finally, was to optimize the induction process and somatic embryos regeneration until plantlet phase. The characterization was determined using callus from 3 to 10 month of cultivation by tetrazolium viability test and isodiametric cell number counting in a Neubauer chamber. In the viability test the higher absorbance was found at 7 months of cultivation and the highest percentage of cells with embryogenic characteristics was found at 6 months. In terms of time, the growth curve of suspension cells revealed no differences, when compared the two cultivation medium used. The agglomerates cultivated in these different culture medium were characterized in relation to size and coloration, being classified as type 1: dispersed cells and small agglomerates; type 2: aggregates from 50 to 1000µm with the absence of elongated cells colored by Evans-blue and

---

\* Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva – UFLA (Major Professor), Dr. Breno Régis dos Santos – UNIFAL – MG, Sandro Barbosa – UNIFAL - MG

type 3: aggregates from 50 to 1000 $\mu$ m with elongated cells colored by Evans-blue. The agglomerates from type 2 were considered the most embryogenic because demonstrated small isodiametric cells colored with Aceto-carmin. In relation to the average size of agglomerate in different medium, it was observed the predominance of type 2. The higher embryogenic potential for agglomerates was found in type 2 after 6 subcultivation in MA2 (salts MS, vitamins MA (1,0 mg/L biotine, 2,0 mg/L glycine, 100 mg/L myo-inositol, 0,5 mg/L nicotinic acid, 0,5 mg/L pyridoxine.HCl, 0,1 mg/L thiamine.HCl), 100 mg/L malt extract, 100 mg/L de glutamine, 45 g/L sucrose, 1,0 mg/L 2,4-D, pH 5.3) and 3 subcultivation in CNPMF medium (salts and vitamins MS, 1mg/L 2,4-D, 100 mg/L glutamine, 10 mg/L ascorbic acid, 44,5 g/L sucrose, pH 5.3). For the somatic embryos regeneration test, using MS medium with three combinations of IAA and BAP (2,2 e 2,2; 11,4 e 2,2; 2 e 2  $\mu$ M, respectively), it was observed a higher number of cotyledonar phase (65) and higher number and plantlet size (30 and 1,9cm), respectively, in culture medium supplemented with 11,4 $\mu$ M of AIA and 2,2 $\mu$ M of BAP. Four established different cultivation medium for regeneration were used as followed: MRB (Boxtel and Berthouly, 1996), MRT (Teixeira et al., 2004), MA3 (Strosse et al., 2003) and MRM with the following modifications 1,33  $\mu$ M of BAP and 2,28  $\mu$ M of AAI (Morais-Lino et al., 2008). Were evaluated the size of cellular mass and the number of embryos in cotyledonary phase obtained in each medium. The higher banana plantlet regeneration rate was obtained from cellular suspension established in MS medium using 11.4  $\mu$ M and 2.2  $\mu$ M of BAP. In relation to the established mediuns the MRT and MRB media were the most indicated for the regeneration of somatic embryos cv. *prata-anã*.

Keywords: tissue culture; Cell viability; tetrazolium; somatic embryogenesis; banana.

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

As bananeiras que produzem frutos comestíveis são plantas pertencentes à família Musaceae, e subfamílias Heliconioideae, Strelitzioideae e Musoideae. Esta última inclui os gêneros Ensete e Musa (Cronquist, 1981). A maioria das cultivares de banana tem origem no continente Asiático, embora haja centros secundários de diversidades na África Ocidental (Alves, 1997).

A bananeira é uma planta típica de regiões tropicais, herbácea e apresenta raízes fibrosas, caule subterrâneo denominado rizoma, folhas, flores, frutos e sementes (Moreira, 1987). A bainha das folhas que rodeiam o rizoma forma o pseudocaule e a inflorescência é terminal, que emerge do centro das bainhas foliares protegidas por uma grande bráctea (Su et al., 1986). As primeiras pencas da inflorescência apresentam flores femininas que dão origem aos frutos. O restante do eixo da inflorescência é constituído de flores masculinas, podendo em algumas espécies, nas regiões de transição apresentar flores hermafroditas (Moreira, 1987), que se encontram dentro de um “coração”, inicialmente volumoso, porém após a formação das pencas observam-se somente as flores masculinas (Simão, 1971).

A cultura da banana é uma atividade de grande importância econômica e social no mundo, constituindo fonte de renda e alimento para milhões de pessoas principalmente para muitos países tropicais e subtropicais.

O fruto possui alto teor calórico e vitamínico, sendo rico em carboidrato, proteína, fibra, P, K, Ca, Fe, Cu, Zn, I, Mn e Co além de possuir teores consideráveis de vitamina A e C, riboflavina, tiamina e niacina (Stover & Simmonds, 1987). Devido a estes fatores, a bananeira é uma importante frutífera cujo fruto é incluso na dieta alimentar de diversos países em desenvolvimento.

Segundo o Agriannual (2009), no ano de 2008 o principal país produtor foi a Índia, seguida pela China, Filipinas e Brasil. No Brasil, a bananicultura é

uma importante atividade agrícola, ocupando área cultivada de 516.145 ha e produção de 7.217.824 toneladas. A produção da fruta se distribui por praticamente todo o país, sendo o estado da Bahia o maior produtor, seguido por São Paulo e Santa Catarina.

Como qualquer espécie cultivada em grandes áreas, a bananeira está sujeita a várias doenças e pragas. Dentre as doenças mais importantes temos o mal da Sigatoka (*Mycosphaella musicola*, Leach), o Mal-do-panamá (*Fusarium oxisporium* var. *cubense*, Smith), e outras doenças causadas por nematóides (*Radopholus similis*), vírus (BBTV, BSV e CMV), bactérias (*Pseudomonas solanacearum* EF, Smith) e danos causados pelo coleóptero (*Cosmopolites sordidus*) (Cronauer & Krikorian, 1986).

A cultivar *prata-anã* possui porte médio a alto, coração grande com brácteas resistentes e frutos pequenos. É altamente atacada pelas doenças sigatoka negra, amarela e pelo mal-do-Panamá, com perdas que variam de 70% a 100% da produção. Contudo, mesmo possuindo uma baixa produtividade, esta cultivar tem grande aceitação no mercado (Alves, 1997).

Os programas de melhoramento vêm buscando soluções para os diversos problemas fitossanitários, que exigem um controle químico de custo elevado, e a melhoria de características agronômicas indesejáveis que acabam prejudicando a produção desta frutífera (Cronauer & Krikorian, 1986).

Os trabalhos de melhoramento convencional com bananeira são muito dispendiosos uma vez que a maioria das cultivares que abrangem as espécies comestíveis e conseqüentemente as mais importantes comercialmente possui grande porte, alta poliploidia, pequena variabilidade genética, alta esterilidade (produção de frutos paternocárpicos) e, além disso, necessitam de grandes áreas para a realização dos trabalhos de campo (Dhed'a et al., 1991; May et al., 1995).

A transformação genética pode ser utilizada como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento. Para tal processo na bananeira existe a

dificuldade de obtenção explantes responsivos visto que diversos autores já utilizaram como explante regiões do rizoma e segmentos foliares, obtendo uma baixa eficiência (Novak et al., 1989; Lee et al., 1997).

A cultura de tecidos é indispensável para a regeneração de plantas melhoradas a partir da transformação gênica, e parte do pressuposto de que as células possuem a capacidade de se regenerarem integralmente formando um indivíduo novo (Kerbaui, 1999).

Entre os diversos tipos de propágulos utilizados na cultura de tecidos, um dos mais comuns é o calos, sendo este um conjunto de células que se multiplicam desordenadamente e de maneira irregular (Torres & Caldas, 1990).

A utilização da propagação *in vitro* em grande escala da bananeira no Brasil possibilitou a abertura de novas perspectivas no cenário nacional da bananicultura. As plântulas de bananas obtidas via micropropagação contribuem para o melhoramento vegetal, fornecendo fontes de explantes para protocolos de regeneração *in vitro* (Filippi, 2000), e neste cenário a embriogênese somática vem ganhando espaço por propiciar uma alta taxa de multiplicação.

A embriogênese somática é resultado do desenvolvimento de embriões partindo de células que não sofreram fusão gamética. Este fenômeno é natural em *citrus*, ocorrendo a partir de células nucelares. No entanto, células de qualquer planta podem entrar nesse processo desde que recebam o estímulo e as condições adequadas (Ammirato, 1983). A embriogênese adventícia pode ocorrer de duas formas: direta - quando os embriões originam-se diretamente dos tecidos, e indireta quando ocorre a indução da formação e proliferação de calos antes do desenvolvimento dos embriões (Tisserat et al., 1979). Segundo Guerra et al. (1999), tanto embriões somáticos quanto embriões zigóticos, possuem os mesmos padrões de desenvolvimento ou seja passam pelos estádios globular, codiforme, torpedo e cotiledonar.

Tem sido sugerido que as auxinas principalmente o 2,4-D estão diretamente envolvidas na indução e na iniciação de embriões somáticos, estimulando a totipotência das células competentes e auxiliando na formação de agregados embriogênicos ou também chamados de massas pró-embriogênicas (MPE). Para o desenvolvimento dos embriões nos estádios subsequentes ao globular faz-se necessário a transferência do material para um meio com baixa concentração ou desprovido de auxina. As MPE são caracterizadas por possuírem células pequenas, com citoplasma denso, características semelhantes àquelas encontradas em células meristemáticas (Murashige & Skoog, 1962; Filonova et al., 2000; Féher et al., 2003).

A embriogênese somática pode ser obtida em meio líquido por meio da utilização de suspensões celulares. Geralmente estas suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis em meio líquido e sob agitação. Assim, a cultura de células ou suspensão celular é uma técnica que permite a indução, propagação e manutenção de células em meio líquido, as quais apresentam taxas de divisão muito mais elevadas do que as cultivadas de maneira convencional (Guerra et al., 1999; Matsumoto, 2006; George et al., 2008).

Estas suspensões podem apresentar ou não, características embriogênicas, e alguns testes colorimétricos podem ser utilizados para a determinação da viabilidade celular. Um teste que vem sendo utilizado é o tetrazólio ou 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio, que está ligado à atividade de enzimas desidrogenases as quais estão envolvidas na atividade respiratória dos tecidos vivos, possibilitando a realização de inferências sobre a viabilidade celular (Munhoz et al., 2008).

Outro teste que pode indicar a viabilidade celular é a utilização de corantes como Carmim-Acético e Azul-de-Evans. Estes corantes refletem a integridade das estruturas celulares como o núcleo e membrana plasmática (Báez

et al., 2002; Pline et al., 2002). Células isodiamétricas, pequenas e com citoplasma denso, o que geralmente caracterizam as células potencialmente embriogênicas, formam agregados que são reativos ao Carmim-Acético corando-se de vermelho.

O crescimento de suspensões celulares pode ser observado por meio de várias metodologias como: sedimentação de volume celular (SCV), centrifugação de suspensão celular (PCV), peso seco, peso fresco celular e contagem do número de células utilizando a câmara de Neubauer. Embora seja um método que demanda tempo, a contagem celular é considerada uma das melhores formas de avaliar o crescimento da cultura celular (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

O objetivo do presente trabalho foi obter e caracterizar células em fase de calos e em suspensão, além de buscar a otimização do processo de indução e regeneração de embriões somáticos de bananeira cv. *prata-anã*.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2009. 194p.

ALVES, E.J. (Org.). **A cultura da banana**: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1997. 585p.

AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. v.1, p.82-123.

BAÉZ, P.; RIVEROS, M.; LEHNEBACH, C. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v.40, n.4, p.671-678, Dec. 2002.

CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. Banana (*Musa spp.*). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biothecnology in agriculture and forestry trees**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. v.1, p.233-252.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. 1262p.

DHED'A, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B.; VUYLSTEKE, D.; LANGHE, E. de. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa spp.* ABB group). **Fruits**, Paris, v.46, n.2, p.125-135, Feb. 1991.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.74, n.3, p.201-228, Mar. 2003.

FILIPPI, S.B. **Embriogênese somática da bananeira (*Musa spp*): indução, maturação e análise morfo-anatômica**. 2000. 73p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FILONOVA, L.H.; BOZHKOVA, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v.113, n.24, p.4399-4411, Dec. 2000.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, 2008. v.1, 501p.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.533-568.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.519-532.

LEE, K.S.; ZAPATA-ARIAS, F.J.; BRUNNER, H.; AFZA, A. Histology os somatic embryo initioation and organogenesis from rhizome explantes of *Musa* spp. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.51, n.1, p.1-8, Oct. 1997.

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. 2.ed. Totowa: Humana, 2006. 416p.

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão**: focalizando a bananeira. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 24p. (Boletim de Pesquisa, 126).

MAY, G.D.; AFZA, R.; MASON, H.S.; WIECKO, A.; NOVAK, F.J.; ARNTZEN, C.J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *agrobacterium*-mediated transformation. **Bio/Technology**, New York, v.13, n.5, p.486-492, May 1995.

MOREIRA, R.S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 335p.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER FILHO, P.E.; BARTH, O.M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.31, n.2, p.209-214, mar./abr. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NOVAK, F.J.; AFZA, R.; DUREN, M. van; PEREA-DALLOS, M.; CONGER, B.V.; TANG, X. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). **Bio/Technology**, New York, v.7, n.2, p.154-159, Feb. 1989.

PLINE, W.A.; EDMISTEN, K.L.; OLIVER, T.; WILCUT, J.W.; WELLS, R.; ALLEN, N.S. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, Madison, v.42, n.6, p.2193-2200, Nov./Dec. 2002.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. Piracicaba: Ceres, 1971. 418p.

STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. Bananas. In: \_\_\_\_\_. **Fruit physiology, biochemistry and nutritional values**. 3.ed. New York: J.Wiley, 1987. chap.18, p.386-395.

SU, H.J.; HWANG, S.C.; KO, W.H. Fusarial wilt of cavendish bananas in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, n.9, p.814-818, Sept. 1986.

TISSERAT, B.; ESAN, B.B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Reviews**, New York, v.1, p.1-78, 1979.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1990. 433p.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERÍSTICAS EMBRIOGÊNICAS EM CALOS DE BANANEIRA CV. PRATA-ANÃ EM DIFERENTES IDADES**

## 1 RESUMO

A banana é uma das mais importantes frutas do mundo, sendo o Brasil o quarto maior produtor. As cultivares comerciais apresentam algumas características agronômicas e fitossanitárias que dificultam a propagação e ampliação dessa cultura por meio de métodos tradicionais. As técnicas de cultivo *in vitro* podem ser empregadas para a produção em larga escala de plantas saudáveis, utilizando, por exemplo, a técnica da embriogênese somática. A viabilidade celular dos calos com potencial embriogênico pode ser determinada por meio do uso de tetrazólio. O objetivo desse trabalho foi determinar a viabilidade celular de calos com potencial embriogênico de bananeira cv. *prata-anã* obtidos através de inflorescência imatura masculina, bem como contabilizar as células com características embriogênicas utilizando-se a Câmara de Neubauer. Os calos foram induzidos em meio MA1 (MS sais (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MA (1,0 mg/L biotina, 2,0 mg/L glicina, 100 mg/L mio-inositol, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl, 0,1 mg/L tiamina.HCl), 30 g/L sacarose, 1,0 mg/L ANA, 4,0 mg/L 2,4-D, 1,0 mg/L AIA, 100 mg/L extrato de malte, 100 mg/L de glutamina, 8 g/L ágar, pH 5.7) e amostras foram coletadas do terceiro ao décimo mês de cultivo. Para a análise de viabilidade celular por absorvância, foram utilizados 150 mg de material celular e para contagem do número de células, 50 mg de material, todos submetidos a reação com tetrazólio. A viabilidade máxima foi obtida aos 7 meses de cultivo e a maior porcentagem de células vivas com potencial embriogênico (71,02%) foi obtida aos 6 meses de cultivo.

Palavras-chaves: viabilidade celular; tetrazólio; embriogênese somática; Câmara de Neubauer; cultura de tecidos.

## 2 ABSTRACT

The banana is one of the most important culture in the world and the Brazil occupies the fourth producer place in the world market. The cultivars available in the market show agricultural and sanitary traits that make difficult the propagation and dispersion of this crop by standard methods. The somatic embryogenesis technique can be used for large scale production of healthy plants. The cellular viability of callus with embryogenic potential can be determined by tetrazolium test. The aims of this chapter were determine the cellular viability of callus with embryogenic potential of banana cv. *prata-anã* obtained from male immature inflorescence as wells as the number of embryogenic cells counted by Neubauer chamber. The callus were induced in MA1 media (MS salts, vitamins MA (1,0 mg/L biotine, 2,0 mg/L glycine, 100 mg/L myo-inositol, 0,5 mg/L nicotinic acid, 0,5 mg/L pyridoxine.HCL, 0,1 mg/L thiamine.HCL, 30 g/L sucrose, 1,0 mg/L NAA, 4,0 mg/L 2,4D, 1,0 mg/L IAA, 100 mg/L malt extract, 100 mg/L of glutamine, 8 g/L agar, pH 5,7) and the samples were collected from the third to the tenth month of cultivation. For the cellular viability measurement, using absorbance assay, was used 150mg of cellular sample and to determine the cell numbers, by tetrazolium test, was used 50mg of cellular tissue. The maximum viability was obtained after 7 months of cultivation and the higher percentage of live cells with embryogenic potential (71.02%) was obtained after 6 months.

Keywords: Cell viability; tetrazolium; somatic embryogenesis; Neubauer Chamber; tissue culture.

### 3 INTRODUÇÃO

A banana é uma das mais importantes frutas do mundo, sendo fonte de renda e alimento para milhares de pessoas principalmente nos países tropicais e subtropicais. No Brasil a produção da fruta tem distribuição em praticamente todo o território nacional, colocando o país entre os 4 maiores produtores mundiais (Agrianual, 2009).

As cultivares comerciais apresentam algumas características agrônomicas e fitossanitárias que dificultam a propagação e ampliação dessa cultura por meio de métodos tradicionais (May et al., 1995).

Assim, a cultura de tecidos vem sendo utilizada como uma importante ferramenta no melhoramento genético dessa cultura. E para que haja uma eficiência desse processo, torna-se essencial a otimização de um protocolo de cultivo *in vitro* (Filippi et al., 2001). Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática tem sido um importante sistema de obtenção de plantas via embriões somáticos, sendo inclusive bem sucedido para algumas cultivares de banana (Lemos, 1994). Nesta técnica ocorre a formação de embriões a partir de tecidos provenientes diretamente do explante (embriogênese direta) ou de calos (embriogênese indireta), sem que haja a fusão gamética (Segura, 1993; George et al., 2008).

Diverso protocolo de micropropagação *in vitro* via embriogênese somática, foram desenvolvidos em bananeira (*Musa spp.*), sendo utilizado como explantes ápices vegetativos (Novak et al., 1989; Lemos, 1994, Lee et al., 1997), embriões zigóticos imaturos (Escalant & Teisson, 1987; Marroquin et al., 1993; Navarro et al., 1997), rizomas e bainhas foliares (Novak et al., 1989); flores imaturas masculinas (Escalant et al., 1994; Côte et al., 1996; Grapin et al., 1996) e flores femininas (Grapin et al., 2000).

Entre os explantes utilizados, as flores imaturas masculinas têm se

mostrado um material muito responsivo para iniciar culturas de calos embriogênicos de cultivares como *dwarf cavendish* (Pérez-Hernández et al., 2009), cultivares do sul da Índia pertencentes ao gênero *Musa acuminata* (Resmi & Ashalatha, 2007), *grande naine* (Côte, et al., 1996) *rasthali*, *basrai*, *shreemanti e trikoni* (Ganapathi et al., 1999).

Durante o período calogênese é possível determinar a viabilidade celular através do uso de corantes específicos, fornecendo importantes informações sobre as condições ideais para a indução de calos embriogênicos.

Entre os corantes utilizados, destaca-se o cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (tetrazólio). Esse método baseia-se no princípio do tetrazólio refletir a atividade de enzimas desidrogenases, relacionadas na atividade respiratória de tecidos vivos (Hoekstra & Bruinsma, 1975). Assim, o tetrazólio reage com o hidrogênio, produto da respiração celular, formando um composto vermelho que pode ser medido por espectrofotometria (Benson, 1994). Essa técnica foi usada inicialmente em cultura de tecidos por Stein e Gerarde (1950) e por Towill & Mazur (1975).

Aliada à técnica do tetrazólio pode-se utilizar a microscopia de luz para se ter como parâmetro a contagem de células. Para a realização dessa contagem pode ser utilizada a Câmara de Neubauer, a qual permite observar a coloração das células e estimar a quantidade destas com características embriogênicas por volume de material analisado (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi determinar a viabilidade celular de calos com potencial embriogênico de bananeira cv. *prata-anã* obtidos através da inoculação de flores imaturas masculinas (dicásio), bem como contabilizar as células com características embriogênicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de execução

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

### 4.2 Material botânico

As plantas matrizes de bananeira (*cv. prata-anã*) das quais se retirou os explantes foram cedidas pela Empresa Pró-Mudas, Lavras - MG.

Para a indução do processo de calogênese foram utilizados como explantes, dicásios imaturos (inflorescência terminal masculina) de bananeira *cv. prata-anã*. Para tal, botões florais (“coração da bananeira”) foram coletados e transportados ao laboratório, reduzido estes até o tamanho de 2,0 cm em condições não estéreis. Após a redução foram mantidos em frasco com tampa contendo aproximadamente 5 mL de água deslitada e selado com parafilme até a próxima etapa para evitar a desidratação.

Em câmara de fluxo laminar o botão floral reduzido foi imerso em solução de álcool etílico 98° GL e flambado por 2 vezes. Os dicásios nas posições 7° e 16° (contando a partir da mais próxima da região meristemática do botão) foram retirados com o auxílio de um estereoscópio, sendo inoculados cinco dicásios por placa de Petri, contendo 30 mL de meio MA1(MS sais (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MA (1,0 mg/L biotina, 2,0 mg/L glicina, 100 mg/L mio-inositol, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl, 0,1 mg/L tiamina.HCl), 30 g/L sacarose, 1,0 mg/L ANA, 4,0 mg/L 2,4-D, 1,0 mg/L AIA, 100 mg/L extrato de malte, 100mg/L de glutamina, 8 g/L ágar, pH 5.7) (Strosse et al., 2003). As culturas foram mantidas no escuro a 27±2 °C por até

10 meses no mesmo meio para a obtenção dos calos utilizados nos testes posteriores.

#### **4.3 Análise da viabilidade celular por tetrazólio e tipificação celular pelo método da contagem celular**

Para determinar a viabilidade celular, calos desde o 3º até o 10º mês de idade, foram coletados em intervalos de 30 dias e utilizados para a realização do teste com tetrazólio.

Para cada mês de cultivo, foram coletadas de forma aleatória de um total de 6 placas, porções de 200mg de calos que foram subdivididas em quatro amostras de 50 mg cada, as quais foram utilizadas nos testes analíticos.

Cada amostra de 50 mg foi homogeneizada em 1,5 mL do reagente de tetrazólio 0,6% (p/v) preparado em solução-tampão fosfato pH 7,4 e colocadas em tubo de ensaio. A mistura foi incubada por 24 horas, na ausência de luz a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Após a homogeneização e incubação das amostras foram adicionados a 3 dos 4 tubos, 3,5 mL de etanol 95% (v/v), os quais permaneceram em “banho maria” à  $100^{\circ}\text{C}$  por um período de 4 minutos, sendo extraído o composto colorido Fomazan. Os tubos foram então centrifugados por duas vezes a 6000 rpm durante 20 minutos para a separação dos sólidos. Nos sobrenadantes foram realizadas leituras espectrofotométricas a 490 nm em um modelo Beckman modelo DU<sup>®</sup>640B. Foram realizadas três leituras mensais. A viabilidade celular foi expressa como absorvância/50mg de peso fresco de acordo com Benson (1994).

O material celular do 4º tubo separado anteriormente foi utilizado para contagem de células em Câmara de Neubauer. Para tanto, a massa de calos foi separada da fase líquida, sendo o reagente tetrazólio retirado e os 50 mg do material biológico macerados com bastão de vidro e homogeneizado em 5 mL

de solução de manitol 0,6M e CaCl<sub>2</sub> 0,03M, pH (5,8) por 1 hora a 100 rpm em temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  na ausência de luz para promover a desagregação celular (Filonova et al., 2000).

A amostra foi filtrada em peneira de 100  $\mu\text{m}$ , e todo o filtrado foi coletado com auxílio de uma pipeta e armazenado em tubos Falcon de 15 mL e mantidos em repouso até a completa decantação da suspensão celular. Foram retirados 4 mL do sobrenadante e o volume restante ressuspensionado. Com o auxílio de uma Câmara de Neubauer foi contabilizado o número de células vivas e destas, foi determinado o número de células isodiamétricas. O microscópio utilizado para as observações foi o modelo Olympus BX 60.

#### **4.4 Delineamento estatístico**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis placas de petri contendo cinco explantes por placa para cada mês de coleta de onde foram retirados porções de 200mg de calos que foram subdivididas em quatro amostras de 50 mg cada.

Para os resultados de absorvância foi realizada uma Anava, verificado a homogeneidade de variância, e em caso de significância ajustado um modelo de regressão do 2º grau.

Foi utilizado o software Bioestat 4.0 para as análises de contagem e tipificação celular por meio da estatística não-paramétrica. Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis a 10% de variância e analisados e validados pelo teste Student-Newman-Keuls no nível de 5% de significância.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Pelos resultados obtidos com o teste do tetrazólio observou-se que houve diferença significativa entre os meses de cultivo dos calos, ressaltando então a

influência do tempo de cultivo na viabilidade celular.

Os dados de absorvância encontrados se ajustaram a um modelo de regressão do 2º grau, que de acordo com a derivada da equação (Figura 1), a absorvância máxima (0,9376) ocorreu aos 203 dias o que corresponde a 7 meses de cultivo. Saber o valor máximo de viabilidade das células pelo teste do tetrazólio dentre os meses de cultivo dos calos auxilia na determinação do período em que se tem a idade ideal para se transferir o calo para o meio líquido iniciando assim uma suspensão celular.

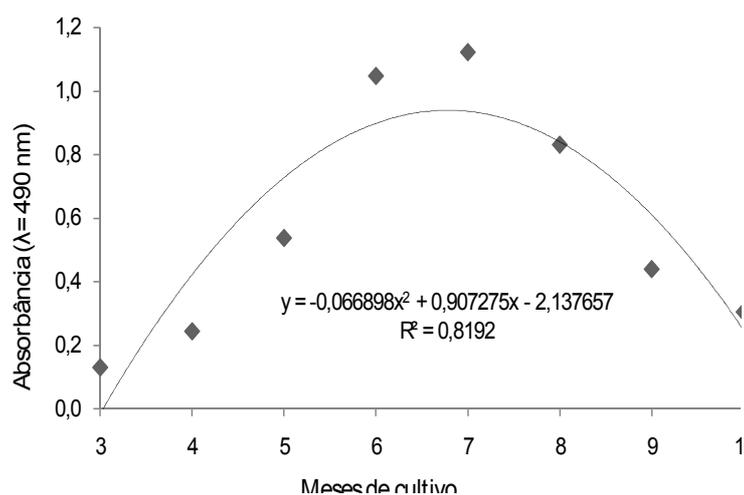


FIGURA 1 Viabilidade celular com CTT para calos de bananeira cv. *prata-anã*.

Morais-Lino et al. (2008) utilizando flores imaturas masculinas de bananeira cv. *Terra Maranhão* obteve calos embriogênicos entre 5 e 6 meses de cultura, resultados este que corroboram com os encontrados neste trabalho. O mesmo foi obtido por Xiao et al. (2007) com a cultivar *mas*, demonstrando assim que 6 meses de cultivo para os calos é tempo suficiente para o aumento de

células viáveis para as cultivares estudadas por estes autores, assim como para a cv. *prata-anã*. Alguns aspectos do desenvolvimento dos calos embriogênicos estão na Figura 2.

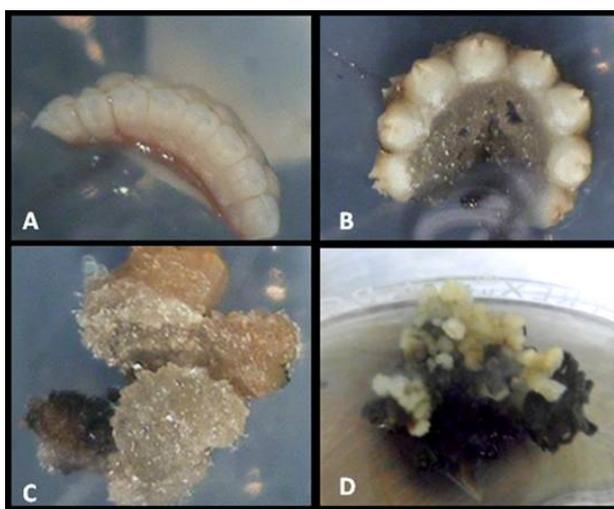


FIGURA 2 Desenvolvimento de calo embriogênico de bananeira cv. *prata-anã*. (A) explante inicial (dicásio); (B) calo com 3 meses; (C) calo com 90 dias e (D) calo com 6 meses.

É importante ressaltar que os resultados obtidos neste trabalho tem relação à utilização da auxina 2,4-D a uma concentração de 18  $\mu\text{M}$ , a qual foi a mesma utilizada por Xiao et al. (2007) e Moraes-Lino et al. (2008), levando a efeitos semelhantes.

As auxinas, principalmente o 2,4-D são responsáveis pelo início do processo de desdiferenciação celular que confere um importante papel na indução de calos com competência embriogênica (Guerra et al., 1999; Daniels et al., 2002), assim como os observados nos resultados. No entanto, diferentes

autores relatam que a embriogênese somática é cultivar dependente (Assani et al., 2002; Gahan & George, 2008).

Existem poucos trabalhos utilizando o tetrazólio em testes de viabilidade em musáceas, porém Panis (1995) menciona que é possível a utilização deste teste em células embriogênicas, relacionando a viabilidade celular com sua capacidade de regeneração, mesmo tendo de levar em consideração outros fatores como por exemplo o tipo de células, como as determinadas no presente estudo.

Apesar de se determinar que para a cultivar *prata-anã* o período de maior viabilidade celular foi aos 7 meses, é importante fazer a correlação com a proporção de células com característica embriogênicas, tais como a forma destas. As células isodiamétricas são as que se remetem a um maior potencial embriogênico.

Para contagem e tipificação celular, houve diferença significativa do número de células isodiamétricas entre os diferentes meses de cultivo dos calos. A maior porcentagem de células isodiamétricas foi encontrada aos 6 meses de cultivo (Figura 3) correspondendo a 71,02 % das células vivas.

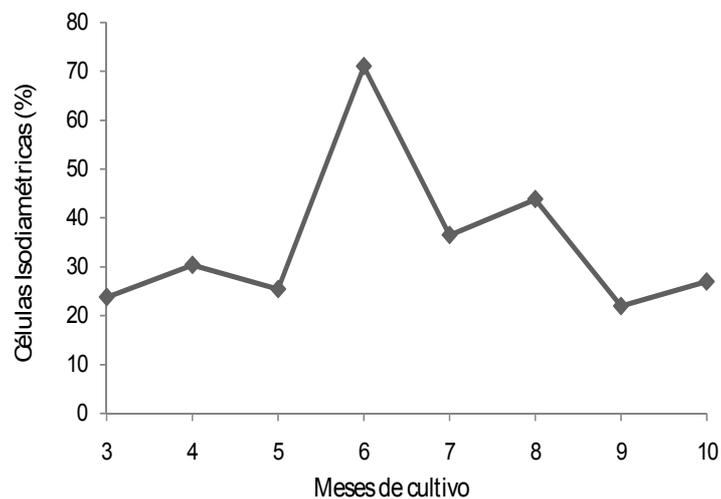


FIGURA 3 Porcentagem de células vivas isodiamétricas por mês de subcultivo.

As células embriogênicas possuem características comuns às células meristemáticas em divisão ativa, ou seja, possuem tamanho pequeno, citoplasma denso, núcleos grandes e nucléolos evidentes, pequenos vacúolos e presença expressiva de grãos de amido (Guerra et al., 1999). Estas características foram observadas aos 6 meses de cultivo pelo presente estudo (Figura 4).



FIGURA 4 Células analisadas na Câmara de Neubauer. (A) Célula isodiamétrica reagindo com o corante tetrazólio (20x); (B) Células inviáveis não coradas (40x). Barra = 50  $\mu$ M.

Os resultados encontrados demonstram que a combinação dessas duas técnicas permite uma eficaz e rápida identificação de material celular com potencial embriogênico.

## 6 CONCLUSÕES

Para a cultivar *prata-anã* a maior viabilidade celular e a maior porcentagem de células viáveis e isodiamétricas ocorreu aos 7 e 6 meses de cultivo de calos, respectivamente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2009. 194p.

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**, Oxford, v.162, n.3, p.355-362, Mar. 2002.

BENSON, E.E. Cryopreservation. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. 2.ed. Oxford: IRL, 1994. p.147-167, 194p.

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**, Copenhagen, v.97, n.2, p.285-290, Aug. 1996.

DANIELS, D.; KOSKY, R.G.; VEGA, M.R. Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar fhia-21 (*Musa* sp. Aaab group). Cuba. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v.38, n.4, p.330-333, July 2002.

ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. Comportements *in vitro* de l'embryon isolé du bananier (*Musa* species). **Fruits**, Paris, v.42, n.6, p.333-342, déc. 1987.

ESCALANT, J.V.; TEISSON, C.; CÔTE, F. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v.30, n.4, p.181-186, Oct. 1994.

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**, Piracicaba, v.58, n.4, p.711-716, out. 2001.

FILONOVA, L.H.; BOZHKO, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v.113, n.24, p.4399-4411, Dec. 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**. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p.355-401.

GANAPATHI, T.R.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A.; KULKARNI, V.M.; RAO, P.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from male flower buds in banana. **Current Science**, Columbus, v.76, n.9, p.1228-1231, Mar. 1999.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, 2008. v.1, 501p.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1999. v.2, p.533-568.

GRAPIN, A.; ORTÍZ, J.L.; LESCOT, T.; FERRIERE, N.; CÔTE, F.X. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain (*Musa* AAB.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, n.3, p.237-244, June 2000.

GRAPIN, A.; SCHWENDIMAN, J.; TEISSON, C. Somatic embryogenesis in plantain banana. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v.32, n.2, p.66-71, Apr. 1996.

HOEKSTRA, F.A.; BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. **Plant Physiology**, Washington, v.34, n.3, p.221-225, 1975.

LEE, K.S.; ZAPATA-ARIAS, F.J.; BRUNNER, H.; AFZA, A. Histology os somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.51, n.1, p.1-8, Oct. 1997.

LEMOS, O.F. **Embriogênese somática em três cultivares de bananeira (Musa spp., grupos AAA e AAB)**. 1994. 159f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. 2.ed. Totowa: Humana, 2006. 416p.

MARROQUIN, C.G.; PADUSCHECK, C.; ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v.29, n.1, p.43-46, Jan. 1993.

MAY, G.D.; AFZA, R.; MASON, H.S.; WIECKO, A.; NOVAK, F.J.; ARNTZEN, C.J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via agrobacterium-mediated transformation. **Bio/Technology**, New York, v.13, n.5, p.486-492, May 1995.

MORAIS-LINO, L.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; ISLVA, S.O.; SANTANA, J.R.F.; KOBAYASHI, A.K. Cell suspension culture and regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.10, p.1325-1330, out. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 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, n.1, p.17-25, Oct. 1997.

NOVAK, F.J.; AFZA, R.; DUREN, M. van; PEREA-DALLOS, M.; CONGER, B.V.; TANG, X. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). **Bio/Technology**, New York, v.7, n.2, p.154-159, Feb. 1989.

PANIS, B. **Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm**. 1995. 201f. Thesis (Ph.D. in Biological Sciences)-Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Catholic University of Leuven, Leuven.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, J.B.; ROSELL-GARCÍA, P. Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. Dwarf Cavendish) male flowers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.27, n.6, p.965-971, June 2008.

RESMI, L.; ASHALATHA, S.N. Plantlet production from the male inflorescence tips of *Musa acuminata* cultivars from South India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New Delhi, v.88, n.3, p.333-338, Mar. 2007.

SEGURA, J. Morfogénesis in vitro. In: BIETO, J.A.; TALON, M. (Ed.). **Fisiología y bioquímica vegetal**. Madrid: Interamericana, 1993. p.381-392, 625p.

STEIN, R. J.; GERARDE, H. W. Triphenyl tetrazolium chloride in tissue culture. **Science**, v.111, n.2895, p.691, Mar. 1950.

STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J.; CÔTE, F.  
**Banana and plantain embryogenic cell suspensions.** Montpellier: IPGRI,  
2003. 31p. (INIBAP Technical Guidelines, 8).

TOWILL, L. E.; MAZUR, P. Studies on the reduction of 2,3,5-  
triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture.  
**Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.53, n.2, p.1097-1102, Feb. 1975.

XIAO, W.; HUANG, X.L.; HUANG, X.; CHEN, Y.P.; DAI, X.M.; ZHAO,  
J.T. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via  
somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht,  
v.90, n.2, p.191-200, Aug. 2007.

### **CAPÍTULO 3**

#### **CURVA DE CRESCIMENTO DE SUSPENSÃO E VIABILIDADE CELULAR DE BANANANEIRA CV. PRATA-ANÃ**

## 1 RESUMO

A embriogênese somática indireta tem sido muito utilizada nos estudos em bananeira visando principalmente a micropropagação em grande escala de plantas saudáveis. A inoculação de um calo friável em meio líquido, geralmente com altas concentrações de auxina (principalmente 2,4-D), permite o estabelecimento de suspensões celulares. O crescimento da suspensão celular pode ser acompanhado pela medição volume do sedimento celular (SCV) e seu potencial embriogênico identificado através de técnicas citoquímicas como a dupla coloração com Carmim-Acético e Azul-de-Evans. O objetivo desse trabalho foi descrever o crescimento de suspensões celulares em volume, tipificar e caracterizar os aglomerados celulares da suspensão da cv. *prata-anã* utilizando a dupla coloração, sendo utilizado dois tipos de meios de estabelecimento de células embriogênicas: o MA2 (MS sais (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MA (1,0 mg/L biotina, 2,0 mg/L glicina, 100 mg/L mio-inositol, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl, 0,1 mg/L tiamina.HCl), 100 mg/L extrato de malte, 100 mg/L de glutamina, 45 g/L sacarose, 1,0 mg/L 2,4-D, pH 5.3) e o CNPMF (MS sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962), 1mg/L 2,4-D, 100 mg/L glutamina, 10 mg/L ácido ascórbico, 44,5 g/L sacarose, pH 5.3). As avaliações foram realizadas a cada 10 dias durante os subcultivos das suspensões por 60 dias. O volume das suspensões apresentou crescimento significativo ao longo dos subcultivos independente do meio utilizado. Foram identificados três tipos de aglomerados celulares de acordo com o tamanho e a coloração, sendo o Tipo 1 (células dispersas e pequenos aglomerados); Tipo 2 (agregados de 50 a 1000 µm com a ausência de células alongadas coradas pelo Azul-de-Evans) e o Tipo 3 (agregados de 50 a 1000 µm com células alongadas coradas pelo Azul-de-Evans). Observou-se a predominância do Tipo 2 em ambos os meios. O maior potencial embriogênico para aglomerados do Tipo 2 é encontrado a partir do 6º e 3º subcultivos nos meios MA2 e CNPMF, respectivamente.

Palavras-chaves: viabilidade celular; embriogênese somática; Carmim-Acético, Azul-de-Evans; cultura de tecidos.

## 2 ABSTRACT

The indirect somatic embryogenesis has been used in research with banana aiming mainly the micropropagation in large scale of healthy plants. The inoculation of friable callus in liquid medium, generally with high auxins concentrations (mainly 2,4-D) permit the establishment of cellular suspension. The cellular suspension growth can be monitored by cellular sediment volume (SCV) and its embryogenic potential identified by citochemical techniques such as double coloration assay using Aceto-carmine and Evans-blue. The aim of this chapter was describe the growth of cellular suspensions in volume, classify and characterize the cellular agglomerates from cellular suspension of cv. *prata-anã* using double coloration, and also test two different media for the establishment of the embryogenic cells: MA2 medium (salts MS, vitamins MA ( 1,0 mg/L biotine, 2,0 mg/L glycine, 100 mg/L myo-inositol, 0,5 mg/L nicotinic acid, 0,5 mg/L pyridoxine.HCl, 0,1 mg/L thiamine.HCl), 100 mg/L malt extract, 100 mg/L de glutamine, 45 g/L sucrose, 1,0 mg/L 2,4-D, pH 5.3) and CNPMF medium (salts and vitamins MS, 1mg/L 2,4-D, 100 mg/L glutamine, 10 mg/L ascorbic acid, 44,5 g/L sucrose, pH 5.3). Assessments were performed every ten days during the suspensions subculture for 60 days. The suspensions volume showed significant growth during the subculture independent of the used medium. Three types of cellular agglomerate were determinated according to the size and coloration: Type 1- dispersed cells and small agglomerates; Type 2 - aggregate from 50 to 1000µm with the absence of elongated cells colored with Evans-blue and Type 3 - aggregate of 50 and 1000µm with elongated cells colored with Evans-blue. There was a predominance of Type 2 in both medium. The highest embryogenic potential for the agglomerate from Type 2 was found from the sixth and third transfers to the MA2 and CNPMF media, respectively.

Keywords: Cell viability; somatic embryogenesis; Aceto-carmine; Evans-blue; tissue culture.

### 3 INTRODUÇÃO

As pesquisas de embriogênese somática em bananeira têm visado principalmente a micropropagação em massa de plantas saudáveis e a regeneração de células para serem utilizadas no melhoramento genético através da introdução de genes exógenos. Uma forma de se obter essas células é o cultivo de calos que dará origem a uma “massa pré-embriônica” (MPE) em meio líquido formando as suspensões celulares (Côte et al., 1996; Santos-Serejo et al., 2006).

A cultura de células em suspensão consiste na obtenção e propagação destas em meio líquido, geralmente em altas concentrações de auxina (principalmente 2,4-D), sendo mantidas geralmente no escuro, ficando sempre em agitação para evitar assim a formação de gases e gradientes nutricionais indesejáveis no meio de cultivo. Para se obter uma suspensão celular onde as células tenham competência para se desenvolver em embriões é necessário que ocorra divisões e multiplicações ativas, formando agregados celulares (Cid, 1999; Guerra et al., 1999; Silveira et al., 2006).

Skoofs (1997) sugere que o contato das células pró-embriônicas de musáceas com o regulador 2,4-D impede o desenvolvimento da protoderme ao redor destas, impedindo assim que ocorra o desenvolvimento total do embrião. Outro fator interessante é que a agitação do meio líquido também corrobora com a desorganização dos pró-embriões.

Uma das formas de estudo da suspensão celular é a realização do acompanhamento de seu crescimento. Alguns dos métodos mais práticos encontrados são: a contagem do número celular, peso seco e fresco, centrifugação de suspensão celular (PCV) e volume do sedimento celular (SCV) (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

Já qualitativamente é possível acompanhar as suspensões celulares utilizando-se técnicas citoquímicas que permitem diferenciar as células que constituem as culturas embriogênicas. A dupla coloração com Carmim-Acético e Azul-de-Evans identificam o potencial embriogênico da suspensão. Células embrionárias são reativas ao Carmim-Acético corando-se de vermelho, apresentam forma isodiamétrica, são pequenas e possuem citoplasma denso, enquanto que as células diferenciadas e permeáveis ao Azul-de-Evans são alongadas e altamente vacuoladas (Steiner et al., 2005).

A embriogênese somática é uma das técnicas mais modernas que podem ser utilizadas para a regeneração de plantas e para o sucesso dessa técnica faz-se necessário a obtenção de culturas embriogênicas em meio líquido com alta qualidade o que refletirá diretamente em uma alta taxa de regeneração. Para a bananeira cv. *prata-anã* esse protocolo ainda não está bem estabelecido.

Neste contexto, o objetivo dessa pesquisa foi determinar o crescimento de suspensões celulares, tipificar e caracterizar os aglomerados celulares da suspensão da cv. *prata-anã* utilizando a dupla coloração com Carmim-Acético e Azul-de-Evans.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local de execução**

O experimento foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

#### **4.2 Material botânico**

Flores imaturas masculinas individualizadas de bananeira cv. *prata-anã* foram utilizadas para formar calos embriogênicos. Após 4 meses, estes foram transferidos para frascos de 125 mL contendo 15 mL de meio de cultura líquido MA2 (MS sais (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MA (1,0 mg/L biotina, 2,0 mg/L glicina, 100 mg/L mio-inositol, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl, 0,1 mg/L tiamina.HCl), 100 mg/L extrato de malte, 100 mg/L de glutamina, 45 g/L sacarose, 1,0 mg/L 2,4-D, pH 5.3) (Strosse et al., 2003). As culturas foram mantidas em agitador orbital a 100 rpm na ausência de luz a  $27\pm 2$  °C.

Após 2,5 meses a suspensão foi filtrada em peneira de 0,5 mm para separação dos agregados maiores. Os agregados menores que 0,5 mm foram inoculados em meio líquido fresco. Os meios de cultura foram renovados a cada 10 dias, em condições assépticas até 9 meses.

Após esse período foi reiniciado novas suspensões utilizando dois tipos de meios de estabelecimento de células embriogênicas: o MA2 e o CNPMF, os quais já são referência para várias cultivares de bananeira (Strosse et al., 2003 e Morais-Lino et al., 2008a, respectivamente). Foram utilizados 0,3 mL de volume celular sedimentado (SCV) em 15 mL de cada meio fresco, sendo 2 frascos de 125ml para cada tipo de meio e as culturas mantidas em agitador orbital a 100 rpm na ausência de luz a  $27\pm 2$  °C.

#### **4.3 Análise do crescimento da suspensão celular**

A cada 10 dias, durante 60 dias, todo o material celular dos frascos foi transferido para tubos Falcon graduados onde as suspensões foram deixadas em repouso por 30 minutos, após este período os volumes celulares foram anotados. O procedimento foi repetido após 30 minutos para a tomada da segunda leitura

de volume. Esse volume das células obtido é conhecido como volume celular sedimentado (SCV) (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

#### **4.4 Análise do potencial embriogênico utilizando a dupla coloração com Carmim-Acético e o Azul-de-Evans.**

Para a avaliação do potencial embriogênico, foi coletado em tubos Eppendorf, 1mL de suspensão de bananeira cv. *prata-anã* de cada meio de cultura. Após a decantação, o sobrenadante foi retirado com uma pipeta e então adicionado 200 µL do corante Carmim-Acético 2%, onde permaneceu em reação por 1 min. Após esse período o material foi lavado com água destilada para a retirada do excesso do corante. Adicionou-se 100 µL de Azul-de-Evans 0,1%, o qual ficou em reação por 30 segundos, com posterior lavagem utilizando água destilada para retirada do excesso do corante (Valente, 2007). Por fim, foram adicionados em cada eppendorf 200 µL de água glicerinada 50%, dos quais foram distribuídos 20 µL / lâmina, sendo 7 lâminas para cada tratamento. As observações foram feitas em objetivas de 10X em microscópio de luz Olympus BX 60 com câmera digital acoplada e os 5 melhores campos de cada lâmina foram digitalizados. Para as medições das áreas dos aglomerados celulares foi utilizado o software ImageTool, mensurando a maior extensão dos aglomerados. A calibração do software foi feita por meio de digitalização de uma lâmina micrometrada, utilizada no mesmo aumento das fotografias (Pereira et al., 2008).

Foi contabilizado o número de aglomerados para cada foto, medido o tamanho e feita a tipificação em: Tipo 1 composto por células dispersas e pequenos aglomerados; Tipo 2, agregados de 50 a 1000 µm com a ausência de células alongadas coradas pelo Azul-de-Evans e Tipo 3, agregados de 50 a 1000 µm com células alongadas coradas pelo Azul-de-Evans.

#### **4.5 Delineamento estatístico**

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida no tempo com 12 tratamentos (2 meios de cultivo x 6 intervalos de coleta).

Para análise do crescimento das suspensões celulares em volume (mL) em diferentes meios de cultivo e tamanho do aglomerado com relação aos subcultivos foi realizada uma análise de regressão.

Para a variável “tipo de aglomerados” foi feito o teste de médias Scott-Knott com nível nominal de significância de 5 %.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Crescimento da suspensão celular**

Para os dois meios de multiplicação de suspensão celulares testados (MA2 e CNPMF), entretanto não houve diferença significativa entre esses tratamentos. De acordo com a análise de regressão foi possível verificar que as suspensões celulares apresentaram crescimento significativo em volume (mL) em função dos subcultivos. A equação da reta para este parâmetro indica um volume máximo de 9,9 ml de SCV aos 60 dias (Figura 1).

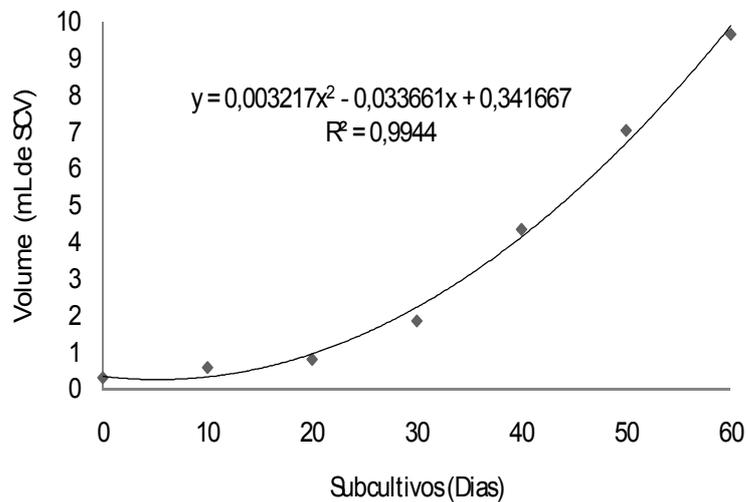


FIGURA 1 Crescimento das suspensões celulares subcultivadas a cada 10 dias nos meios MA2 e CNPMF.

Os subcultivos realizados a cada 10 dias independente do meio de multiplicação utilizado proporcionaram o mesmo padrão de crescimento para as suspensões celulares de bananeira cv. *prata-anã* até o período estudado (60 dias). O crescimento contínuo das suspensões ao longo dos subcultivos reflete a qualidade das mesmas.

Com relação ao tamanho médio dos aglomerados no meio MA2 observou-se que o tamanho mínimo (212  $\mu\text{m}$ ), de acordo com a derivada da equação reta, ocorreu próximo aos 20 dias (segundo subcultivo), indicando que neste período ocorreu a alta taxa de multiplicação celular. O maior tamanho dos aglomerados (373  $\mu\text{m}$ ) ocorre aos 60 dias de cultivo (Figura 2).

Para o meio CNPMF o menor tamanho dos aglomerados (195  $\mu\text{m}$ ) foi obtido aos 15 dias (metade do primeiro subcultivo), de acordo com a derivada da equação da reta. A maior taxa de multiplicação celular neste meio ocorreu 5 dias

antes da obtida no meio MA2, o que demonstra uma resposta mais rápida quanto a multiplicação celular. O maior tamanho dos aglomerados (396  $\mu\text{m}$ ) ocorre aos 60 dias de cultivo (Figura 2).

A alta taxa de multiplicação para ambos os meios pode ser evidenciada pelo crescimento contínuo em volume como demonstrado na Figura 1.

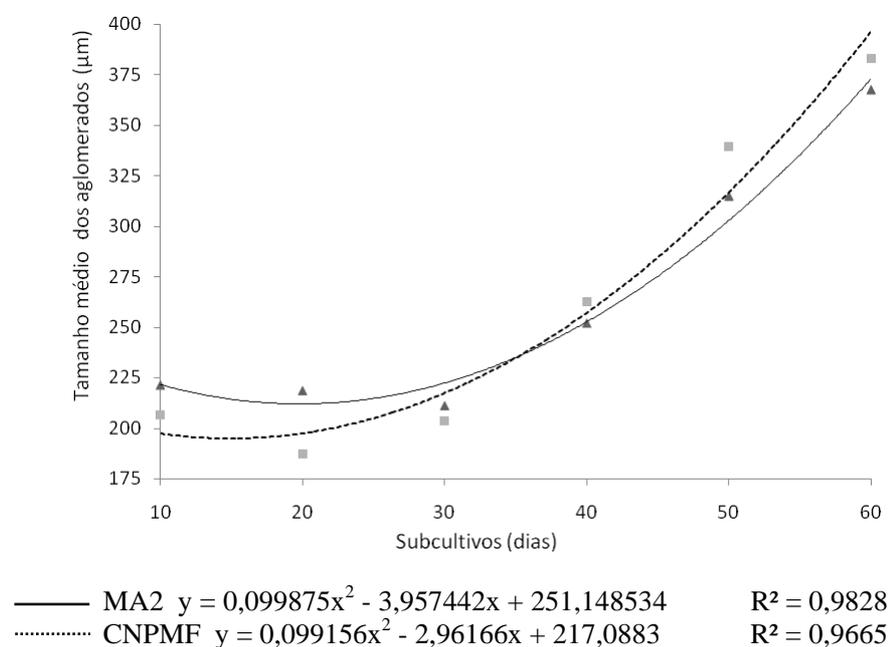


FIGURA 2 Incremento nos valores do tamanho médio dos aglomerados em relação aos subcultivos nos diferentes meios.

Até o terceiro subcultivo o tamanho médio dos aglomerados no meio CNPMF foi inferior aos encontrados no meio MA2, tornando-se superior a este a partir do quarto subcultivo. Assim as suspensões cultivadas no meio CNPMF apresentam melhor resposta ao crescimento do tamanho médio dos aglomerados.

## 5.2 Tipificação dos agregados e estimativa do potencial embriogênico utilizando a dupla coloração com Carmim-Acético e o Azul-de-Evans.

Em suspensões celulares podem ser encontradas diferentes tipos e constituintes celulares. Domergue et al. (2000) estudando morfohistologia de suspensões celulares de bananeira cv. *grande naine*, empregando a metodologia descrita por Fisher (1968), pode identificar cinco tipos de agregados celulares. Sendo que um desses tipos apresentava características altamente embriogênicas, tais como: células pequenas com citoplasma denso, ausência de grandes vacúolos, núcleo grande e nucléolos proeminentes.

Neste presente trabalho, estudando as características das suspensões obtidas da cv. *prata-anã* foi possível, através da metodologia de dupla coloração com Carmim-Acético e Azul-de-Evans, identificar três tipos de aglomerados celulares. O Tipo 1 (Figura 3 A) era compostos por células dispersas e pequenos agregados muito semelhante ao tipo 1 descrito por Domergue et al. (2000). De acordo com este mesmo autor, é provável que o Tipo 1 seja resultado da degeneração dos outros tipos celulares e não fazendo parte da formação dos aglomerados.

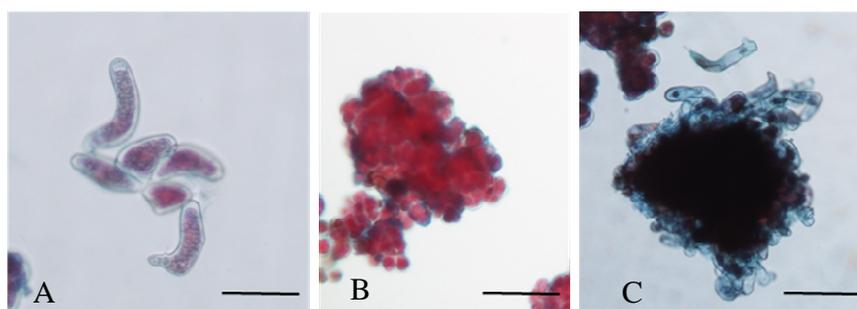


FIGURA 3 Tipos de aglomerados em suspensão celular de bananeira cv. *prata-anã*. (A) TIPO1, barra=100  $\mu\text{m}$  ; (B) TIPO 2, barra= 200  $\mu\text{m}$ ; (C) TIPO 3, barra= 300  $\mu\text{m}$ .

O aglomerados do Tipo 2 (Figura 3B) com diâmetro de 50 a 1000  $\mu\text{m}$ , apresentavam células isodiamétricas, ausência de células alongadas muito semelhante ao tipo 2 relatado por Domergue et al. (2000). Estes autores descrevem este tipo celular como sendo potencialmente embriogênico. Neste presente trabalho o potencial embriogênico foi confirmado pela forte reação desses aglomerados ao Carmim-Acético. Este corante apresenta afinidade ao DNA (Gupta & Durzan, 1987) indicando assim que a reação do Carmim-Acético ocorrido nos aglomerados do Tipo 2 podem estar relacionadas com intensa divisões celulares o que é característico de regiões meristemáticas, mostrando assim o alto potencial embriogênico. Além disso, esse tipo de aglomerado não apresenta qualquer reação ao Azul-de-Evans demonstrando a ausência de células diferenciadas.

O Tipo 3 observado era constituído de aglomerados de 50 a 1000  $\mu\text{m}$  de diâmetro com células alongadas que reagiram fortemente ao AE indicando o início de diferenciações e morte de células na periferia do aglomerado (Figura 3C). Esse tipo de aglomerado celular apresentou características similares ao tipo 5 identificado por Domergue et al. (2000). Com esse tipo, estes autores obtiveram agregados necrosados e não conseguiram regenerar plantas. Este comportamento foi remetido à alta vacuolização das células periféricas que aos poucos vão se soltando do agregado. Na tabela 1 é apresentada a proporção dos tipos de aglomerados encontrados na suspensão celular cultivada no meio MA2.

TABELA 1 Proporção de tipos de aglomerados subcultivados a cada 10 dias em meio “MA2”.

Subcultivos	TIPO 1*	TIPO 2*	TIPO 3*
10	0,04 a	0,90 b	0,06 a
20	0,02 a	0,93 b	0,05 a
30	0,05 a	0,93 b	0,02 b
40	0,01 a	0,93 b	0,06 a
50	0,03 a	0,93 b	0,03 b
60	0,02 a	0,97 a	0,01 b

\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott no nível de nominal de significância de 5%.

Houve uma diferença significativa quanto a proporção de aglomerados do Tipo 2 apenas no 6º subcultivo (60 dias). Entretanto, a proporção de aglomerados deste tipo é muito superior quando comparada aos Tipos 1 e 3. O Tipo 1 não apresentou diferenças significativas ao longo dos subcultivos. Já o Tipo 3, tendeu a diminuir significativamente sua proporção ao longo dos subcultivos.

Na Figura 4 é apresentado o comportamento linear do aumento da proporção de aglomerados do Tipo 2.

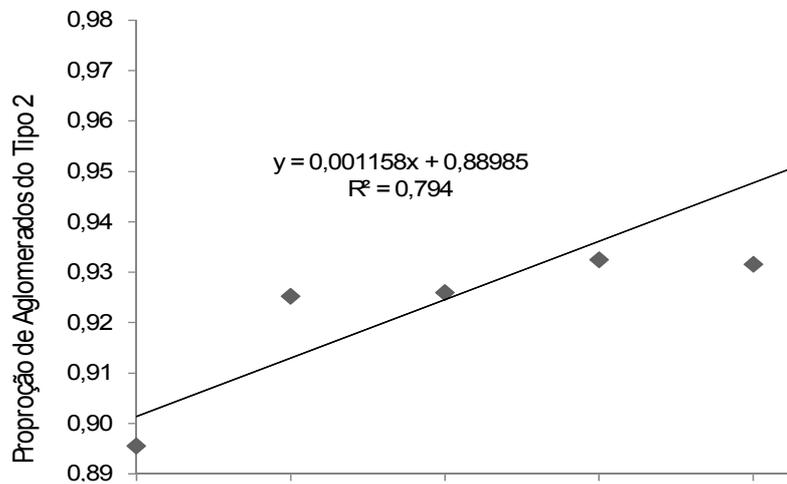


FIGURA 4 Proporção de aglomerados do Tipo 2 em relação aos subcultivos em meio MA2.

A proporção dos tipos de aglomerados encontrados na suspensão celular cultivada no meio CNPMF são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 Proporção de tipos de aglomerados subcultivados a cada 10 dias em meio “CNPMF”.

Subcultivos	TIPO 1*	TIPO 2*	TIPO3*
10	0,07 a	0,89 c	0,04 a
20	0,02 b	0,94 b	0,04 a
30	0,03 b	0,96 a	0,01 a
40	0,01 c	0,97 a	0,02 a
50	0,00 c	0,97 a	0,03 a
60	0,00 c	0,99 a	0,01 a

\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott no nível de nominal de significância de 5%.

Foram encontradas diferenças significativas nos aglomerados do Tipo 1, sendo que a partir do 4º subcultivo (40 dias) a proporção tendeu a zero. Quanto ao Tipo 2, a partir do 3º subcultivo (30 dias) foi encontrada a maior proporção quando comparada com os subcultivos anteriores. Assim como a suspensão cultivada no meio MA2, a proporção de aglomerados deste tipo é muito superior aos demais. O Tipo 3 não apresentou diferenças significativas ao longo dos subcultivos.

Na Figura 5 é apresentado um período de subcultivos de aglomerados do Tipo 2 onde os dados se ajustaram ao modelo quadrático. De acordo com a derivada da equação da reta a máxima proporção de aglomerados do Tipo 2 (0,99) ocorreu no 57º dia.

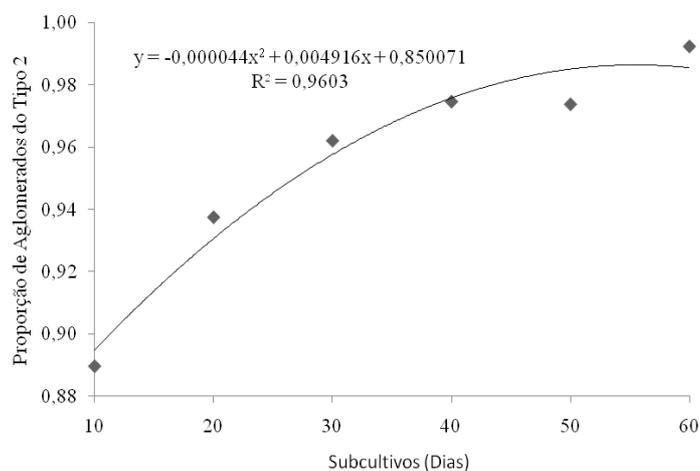


FIGURA 5 Proporção de aglomerados do Tipo 2 em relação aos subcultivos em meio CNPMF.

Morais-Lino et al. (2008a ,b) trabalhando com suspensões celulares de bananeira cv. *Terra* e cv. *maçã*, respectivamente, que eram compostas

predominantemente por aglomerados do Tipo 2, semelhantes aos tipificados neste trabalho, obtiveram resultados satisfatórios na regeneração de embriões somáticos.

As suspensões celulares cultivadas nos meios MA2 e principalmente no CNPMF apresentam predominância, durante todos os subcultivos, de aglomerados altamente embriogênicos. De maneira geral, quanto ao aumento da proporção de aglomerados do Tipo 2, no meio CNPMF é mais precoce que o meio MA2 (Tabelas 1 e 2).

## 6 CONCLUSÕES

O volume das suspensões apresentou crescimento significativo ao longo dos subcultivos independente do meio utilizado.

Ao se relacionar o tamanho médio dos aglomerados, observou-se a predominância do Tipo 2.

O maior potencial embriogênico para aglomerados do Tipo 2 é encontrado a partir do 6º e 3º subcultivos nos meios MA2 e CNPMF respectivamente, de acordo com a dupla coloração com Carmim-Acético e Azul-de-Evans.

## 7 REFERÊNCIAS

CID, L.P.B. Suspensão celular. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.331-354.

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**, Copenhagen, v.97, n.2, p.285-290, Aug. 1996.

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**, Berlin, v.19, n.8, p.748-754, July 2000.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v.16, n.1, p.92-96, Mar. 1968.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. v.2, p.533-568.

GUPTA, P.K.; DURZAN, D.J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. **Bio/technology**, New York, v.5, n.2, p.147-151, Feb. 1987.

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. 2.ed. Totowa: Humana, 2006. 416p.

MORAIS-LINO, L.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; ISLVA, S.O.; SANTANA, J.R.F.; KOBAYASHI, A.K. Cell suspension culture and regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.10, p.1325-1330, Out. 2008a.

MORAIS-LINO, L.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA, S.O.; SOUZA, K.A.; SANTANA, J.R.F. Regeneração de suspensão celular de bananeira 'Maçã' em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e AIA. In: REUNIÓN INTERNACIONAL DE ACORBAT, 18., 2008, Guayaquil. **Memorias...** Guayaquil: Corpei, 2008b. p.1-7.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

PEREIRA, F.J.; CASTRO, E.M.; SOUZA, T.C.; MAGALHÃES, P.C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.12, p.1649-1656, dez. 2008.

SANTOS-SEREJO, J.A.; SOUZA, A.S.; MORAIS, L.S.; SOARES, T.L.; SOUZA, F.V.D.; KOBAYASHI, A.K.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O. Biotechnology other than transgenic plants. In: REUNIÃO INTERNACIONAL DA ASSOCIAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO NAS PESQUISAS SOBRE A BANANA NO CARIBE E NA AMÉRICA LATINA, 17., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2006. p.10-23.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N.N.; SCHERER, G.F.E.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, Oxford, v.171, n.1, p.91-98, July 2006.

SKOOFS, H. **The origin of embryogenic cells in *Musa***. 1997. 258f. Thesis (Ph.D. in Agricultura)-Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Leuven.

STEINER, N.; VIEIRA, F.N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M.P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, n.6, p.895-903, Dec. 2005.

STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J.; CÔTE, F. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. Montpellier: IPGRI, 2003. 31p. (INIBAP Technical Guidelines, 8).

VALENTE, C. **Caracterização de funções mitocondriais em *Araucaria angustifolia***. 2007. 97p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

## **CAPÍTULO 4**

### **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE BANANEIRA CV. PRATA-ANÃ**

## 1 RESUMO

A bananeira é uma frutífera de grande importância social e econômica em todo o mundo, mas apresenta problemas fitossanitários que prejudicam a expansão do seu cultivo. A embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos que permite a obtenção de plantas saudáveis em larga escala. Para que essa técnica seja aplicada é fundamental a otimização de métodos de regeneração de plantas *in vitro* por meio da obtenção de meios de cultivos adequados para gerar um produto final apropriado. O objetivo desse trabalho foi avaliar a regeneração *in vitro* de suspensões celulares de bananeira cv. *prata-anã* em diferentes meios de cultura por meio de dois experimentos. Foram utilizadas suspensões celulares cultivadas em meio MA2 (MS sais (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MA (1,0 mg/L biotina, 2,0 mg/L glicina, 100 mg/L mio-inositol, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl, 0,1 mg/L tiamina.HCl), 100 mg/L extrato de malte, 100 mg/L de glutamina, 45 g/L sacarose, 1,0 mg/L 2,4-D, pH 5.3) para os dois experimentos. No experimento 1, foi utilizado o meio MS com 3 combinações de AIA e BAP (2,2 e 2,2; 11,4 e 2,2; 2 e 2  $\mu$ M, respectivamente) e avaliado o número de embriões em fase cotiledonar, número de plântulas e o tamanho (cm) da maior plântula. No segundo experimento foram utilizados 4 diferentes meios de cultivo: o primeiro meio de regeneração foi descrito por Boxtel & Berthouly (1996) (MRB), o segundo descrito por Teixeira et al. (2004) (MRT), o terceiro descrito por Strosse et al. (2003) (MA3) e o quarto descrito por Morais-Lino et al. (2008), com as seguintes modificações: 1,33  $\mu$ M de BAP e 2,28  $\mu$ M de AIA (MRM); e avaliou-se o crescimento em tamanho da massa celular e o número médio de embriões na fase cotiledonar. A regeneração maior de plântulas de bananeira cv. *prata-anã* a partir de suspensões celulares foi obtida com o meio de cultura MS utilizando 11,4  $\mu$ M de AIA e 2,2  $\mu$ M de BAP. Os meios MRT e MRB são os mais indicados para a regeneração de embriões somáticos para a cv. *prata-anã*.

Palavras-chaves: cultura de tecidos; embriogênese somática; regeneração *in vitro*; embrião; suspensão celular.

## 2 ABSTRACT

The banana is a culture with a great social and economical importance around of the world, but some phytopathological problems retard its cultivation expansion. The somatic embryogenic is a tissue culture technique that permit the obtention of healthy plants in large scale. For the use of this technique is fundamental the optimization of plant regeneration methods to obtain a correct final product. The aim of this chapter was evaluate *in vitro* cellular suspensions regeneration of banana cv. *prata-anã* in different culture medium divided in two experiments. Cellular suspensions cultivated in MA2 (salts MS, vitamins MA (1,0 mg/L biotine, 2,0 mg/L glycine, 100 mg/L myo-inositol, 0,5 mg/L nicotinic acid, 0,5 mg/L pyridoxine.HCl, 0,1 mg/L thiamine.HCl), 100 mg/L malt extract, 100 mg/L de glutamine, 45 g/L sucrose, 1,0 mg/L 2,4-D, pH 5.3) was used for both experiment. In the first MS medium with 3 combination of AAI and BAP (2,2 and 2,2; 11,4 and 2,2; 2 and 2 $\mu$ M, respectively) was test and the number of embryos in cotyledonary phase, as well as the number and the size of the largest plantlet was evaluated.. In the second, four established cultivation medium for regeneration were used as followed: MRB (Boxtel and Berthouly, 1996), MRT (Teixeira et al., 2004), MA3 (Strosse et al., 2003) and MRM with the following modifications 1,33  $\mu$ M of BAP and 2,28  $\mu$ M of AAI (Morais-Lino et al., 2008). Were evaluated the size of cellular mass and the number of embryos in cotyledonary phase. The higher banana plantlet regeneration rate was obtained from cellular suspension established in MS medium using 11.4  $\mu$ M and 2.2  $\mu$ M of BAP. The MRT and MRB media were the most indicated for the regeneration of somatic embryos for cv. *prata-anã*.

Keywords: tissue culture; somatic embryogenesis; *in vitro* regeneration; embryo; cell suspension.

### 3 INTRODUÇÃO

A bananeira é uma frutífera de grande importância social e econômica em todo o mundo, sendo que o Brasil tem uma produção de cerca de 6.972.408 toneladas e área plantada de 513.460 hectares (Agrianual, 2009). Entretanto graves problemas ameaçam seu cultivo devido à diversas doenças causadas por fungos, vírus e nematóides que levam a uma significativa redução da qualidade do fruto e da produtividade da plantação (Xiao et al., 2007).

A cultura de tecidos tem possibilitado a obtenção de sementes sintéticas e de plantas geneticamente modificadas, sendo uma tentativa de superar os problemas fitossanitários e de produtividade. No entanto para que as técnicas de cultura de tecidos em consonância à biotecnologia sejam aplicadas, é fundamental a otimização de métodos de regeneração de plantas *in vitro* por meio da obtenção de meios de cultivos adequados para gerar um produto final apropriado.

A embriogênese somática é dentre os processos de regeneração a melhor alternativa para propagação *in vitro* de frutíferas, pois apresenta vantagens como alta taxa de multiplicação planta geneticamente superiores, escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido e diminuição dos custos de produção pelo plantio direto da muda obtida (Zimmerman, 1993).

Na literatura encontram-se descrições de meios de regeneração de bananeira a partir de suspensão celular de flores imaturas masculinas, no entanto esta resposta é cultivar dependente, fazendo-se necessário a otimização do protocolo para cada cultivar estudada (Escalant et al., 1994; Côte et al., 1996; Grapin et al., 1996; Matsumoto et al., 2002; Jalil et al., 2003; Strosse et al., 2003; Matsumoto, 2006; Morais-Lino et al., 2008).

Em qualquer técnica de cultivo *in vitro*, certas substâncias são essenciais na composição do meio de cultura. Além de macro e micronutrientes, sacarose e

vitaminas, destacam-se os reguladores de crescimento (como as citocininas e auxinas) e outras substâncias (aminoácidos e compostos nitrogenados) que formam um balanço ideal para controlar o crescimento e desenvolvimento do explante *in vitro* (Carvalho & Vidal, 2003). Estudos dessa natureza em bananeira cv. *prata-anã* são escassos.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a regeneração *in vitro* de suspensões celulares de bananeira cv. *prata-anã* em diferentes meios de cultura.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de execução

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

### 4.2 Material botânico

Flores masculinas imaturas de banana cv. *prata-anã* foram utilizadas para induzir a formação de calos embriogênicos em meio semi-sólido MA1 (Strosse et al., 2003). Os explantes foram transferidos para Erlenmeyer de 125 mL contendo 15 mL de meio de cultura líquido MA2 (MS sais (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MA (1,0 mg/L biotina, 2,0 mg/L glicina, 100 mg/L mio-inositol, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl, 0,1 mg/L tiamina.HCl), 100 mg/L extrato de malte, 100 mg/L de glutamina, 45 g/L sacarose, 1,0 mg/L 2,4-D, pH 5.3) (Strosse et al., 2003). As culturas foram mantidas em agitador orbital a 100 rpm na ausência de luz a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os meios de cultura eram renovados a cada 10 dias. Após 2,5 meses a suspensão foi filtrada em peneira de 0,5 mm para homogeneizar a suspensão.

### 4.3 Experimento 1: Influência de diferentes reguladores de crescimento na regeneração de células em suspensão

Após nove meses do início da suspensão, foram diluídos 1,5 mL de volume celular sedimentado (SCV) em 29 mL de meio de cultura fresco (densidade final da amostra a 5 %). Um volume de 1 mL da solução foi colocado sobre papel filtro em placa de Petri contendo 35 mL de meio de cultura semi-sólido. Foram testados três diferentes meios de regeneração (Tabela 1) (Morais-Lino et al., 2008).

TABELA 1 Composição dos meios de cultura utilizados na regeneração de plântulas *in vitro* de bananeira cv. *prata-anã*.

Regulador	Meio de Cultura <sup>(1)</sup>		
	C1	C2	C3
AIA (µM)	2,2	11,4	2
BAP (µM)	2,2	2,2	2

<sup>(1)</sup> Todos os meios usados nesse estudo eram compostos por sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 g/L de sacarose, solidificados com 5 g/L de ágar, o pH dos meios foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 min.

As placas foram mantidas por 15 dias na ausência de luz a 27±2 °C e depois deste período, transferidas para sala de crescimento sob irradiância de 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> emitida por luz branca fria, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27±2 °C. Foram feitas 10 repetições para cada meio.

Dois meses após o início do experimento os explantes foram transferidos para meios frescos e após 15 dias foi avaliado o número de embriões em fase cotiledonar, número de plântulas e o tamanho (cm) da maior plântula por placa.

#### **4.3.1 Delineamento estatístico**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 3 meios de cultura com diferentes concentrações de AIA e BAP, compostos de 10 repetições.

Para a análise dos dados foi utilizado o software Bioestat 4.0, por meio da estatística não-paramétrica onde os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis a 10% e os dados validados pelo teste Student-Newman-Keuls no nível de 5% de significância.

#### **4.4 Experimento 2: Influência de diferentes meios de cultivo na regeneração de suspensões celulares**

Aos nove meses do início da suspensão celular foram testados diferentes meios para a regeneração de embriões a partir das células em suspensão de bananeira cv. *prata-anã*. O primeiro meio de regeneração utilizado foi descrito por Boxtel & Berthouly (1996) (MRB), o segundo descrito por Teixeira et al. (2004) (MRT), o terceiro descrito por Strosse et al. (2003) (MA3) e o quarto descrito por Morais-Lino et al. (2008), com as seguintes modificações: 1,33  $\mu$ M de BAP e 2,28  $\mu$ M de AIA (MRM) (Anexos).

Para cada meio de cultura foram preparadas três placas de Petri contendo 30 mL de meio. Em cada uma das placas foi inoculado o equivalente a 150 mg de material celular distribuído em cinco subparcelas.

Após 2 meses de cultivo o material celular foi transferido para meio fresco e 25 dias após, foi avaliado o crescimento do material celular através da área de expansão de cada subparcela e contabilizado o número de embriões germinados em fase cotiledonar.

#### 4.4.1 Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 3 repetições contendo cinco subparcelas para cada meio de cultura.

Para a análise de variância do parâmetro área de crescimento das subparcelas foi realizada uma Anava, em esquema de parcela subdividida com teste de médias Scott-Knott (5 %).

Para número médio de embriões germinados foi realizado um teste de Kruskal-Wallis, utilizando o software Bioestat 4.0, que por meio da estatística não-paramétrica os dados foram submetidos ao teste de médias Student-Newman-Keuls (SNK-5%).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento 1: Influência de diferentes reguladores de crescimento na regeneração de células em suspensão.

Foi observado que um mês após o plaqueamento houve a formação de embriões globulares independente do meio de cultivo (Figura 1).

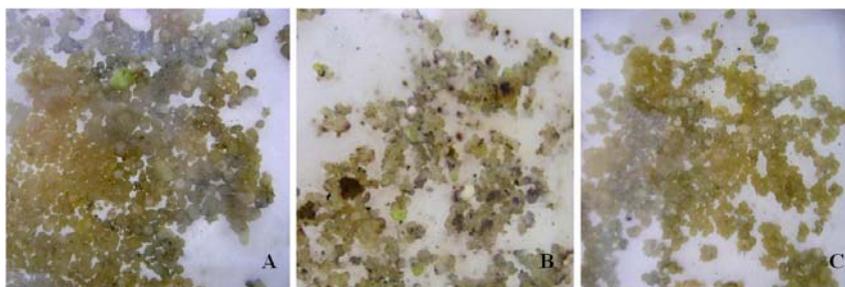


FIGURA 1 Formação de embriões globulares nos diferentes meios de cultivo. (A) Meio C1; (B) Meio C2 e (C) Meio C3.

O teste de Kruskal-Wallis revelou a existência de diferença significativa entre o número de embriões em fase cotiledonar, número de plântulas e o tamanho (cm) da maior plântula nos diferentes meios de cultura.

De acordo com o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) houve diferença significativa entre os meios C1 e C2 e entre os meios C2 e C3 no nível de 5% de significância, ou seja, C1 e C3 foram iguais para as três variáveis de resposta, indicando que o melhor meio para todos os parâmetros avaliados foi o meio C2 (Tabela 2).

TABELA 2 Desenvolvimento de embriões somáticos de bananeira cv. *prata-anã* em diferentes meios por mL de SCV 5%.

Tratamento	Número médio de embriões cotiledonares	Número médio de plântulas	Tamanho médio da maior plântula (cm)
C1	14,4 b	2,8 b	1,0 b
C2	64,8 a	29,9 a	1,9 a
C3	17,4 b	5,1 b	1,4 b

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste no nível de 5% de significância.

Morais-Lino et al. (2008) trabalhando com a cv. *Terra* e com meios de regeneração com os mesmos reguladores e concentrações destes, obtiveram melhores resultados regenerando 558 plântulas por mL de SCV 5% com o meio de regeneração suplementado com 11,4  $\mu$ M de AIA e 2,2  $\mu$ M de BAP. Neste trabalho o melhor resultado encontrado foi de 30 plântulas. Embora o número de plântulas regeneradas por estes autores seja superior, vale ressaltar que o fator tempo de regeneração é relevante, uma vez que para cv. *Terra*, Morais-Lino et al. (2008) levaram 5 meses para obter plântulas enquanto que neste trabalho este tempo foi reduzido para 3 meses (Figura 2), embora as cultivares sejam diferentes. Sendo assim a melhoria do protocolo de regeneração para a cv. *prata-*

*anã* pode conduzir a uma propagação clonal em massa com uma maior eficiência.



FIGURA 2 Plântulas de bananeira cv. *prata-anã* regeneradas após 3 meses de cultivo.

Como mostrado na Tabela 2, o meio de cultura C2 suplementado com  $11,4 \mu\text{M}$  de AIA e  $2,2 \mu\text{M}$  de BAP, apresentou os melhores resultados, possivelmente devido à maior concentração da auxina (Figura 3).

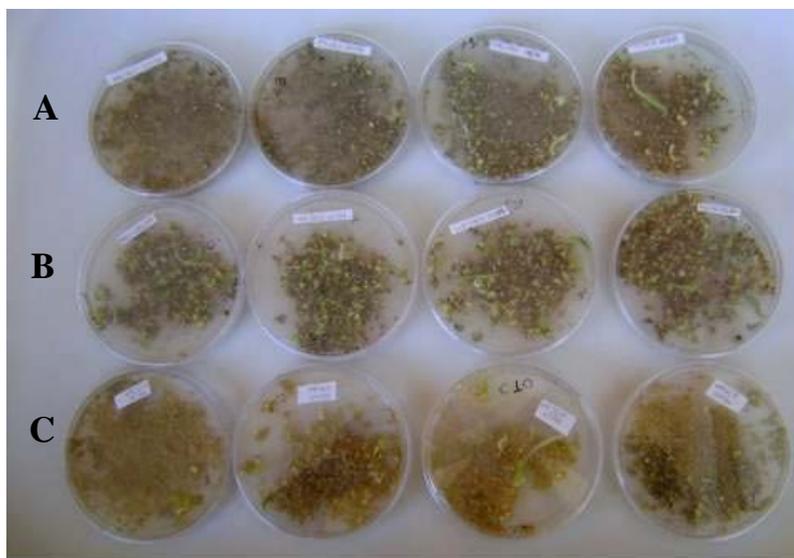


FIGURA 3 Aspecto visual das células em regeneração de bananeira cv. *prata-anã* em diferentes meios de cultivo. (A) MS + 2,2  $\mu$ M de AIA e 2,2  $\mu$ M de BAP; (B) MS + 11,4  $\mu$ M de AIA e 2,2  $\mu$ M de BAP; (C) MS + 2  $\mu$ M DE AIA e 2  $\mu$ M de BAP.

Como observado neste trabalho, foram utilizadas diferentes concentrações de auxina (AIA) e citocinina (BAP) nos meios de regeneração. As auxinas são muito utilizadas na cultura de tecidos em combinação com citocininas promovendo o crescimento de calos, suspensões celulares além de regular o sentido da morfogênese (George et al., 2008).

No início da cultura embriogênica é necessário que o meio de cultura seja suplementado com altos níveis de auxinas principalmente o 2,4-D podendo ou não utilizar a citocininas. Quando a embriogênese somática é indireta, o calo sofre diferenciação em regiões “pré-determinadas” formando as massas pró-embriogênicas que se dividem formando pró-embriões somáticos. Essas massas pró-embriogênicas podem ser transferidas para um meio líquido que fornece condições ideais para que as células sofram divisão em ciclos repetitivos e a

cultura em suspensão poderá apresentar em sua maioria embriões somáticos no estágio globular de desenvolvimento. Para a continuação do processo de desenvolvimento dos embriões somáticos até a regeneração em plântulas, é necessária a redução ou a retirada da auxina do meio (Guerra et al., 1999). Entretanto existe cultivares que necessitam de outra auxina combinada ou não com uma citocinina para estimular a regeneração. As citocininas controlam e promovem processos mitóticos, enquanto que as auxinas induzem as divisões celulares uma vez que atuam sobre a replicação do DNA (George et al., 2008). Estas características afetam o desenvolvimento dos embriões e a regeneração destes em plântulas, o que pode ser observado nos diferentes resultados obtidos neste presente experimento utilizando AIA e BAP.

## **5.2 Experimento 2: Influência de diferentes meios de cultivo na regeneração de suspensões celulares**

Na tabela 3 é apresentada a área média de crescimento das massas celulares ( $\text{cm}^2$ ) para os diferentes meios. De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ), onde os meios MRB e MRM não diferiram entre si porém foram melhores que os meios MRT e MA3, sabendo que a cultura foi iniciada com uma área de  $0,21 \text{ cm}^2$  a qual foi padronizada para todos os tratamentos.

TABELA 3 Área média (cm<sup>2</sup>) de crescimento de massas celulares de bananeira cv. *prata-anã* em diferentes meios de cultura.

Tratamentos	Médias
MA3	1.0 b
MRT	2.3 b
MRB	3.5 a
MRM	4.5 a

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott no nível de 5% de significância.

O teste de Kruskal-Wallis revelou a existência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o número médio de embriões germinados nos diferentes meios de cultura. De acordo com o teste de Student-Newman-Keuls (SNK 5%) houve diferença significativa entre os meios MA3 e MRB, MA3 e MRT, MRM e MRB. A maior regeneração de embriões foi obtida nos meios MRT e MRB que não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 4).

TABELA 4 Médias de embriões regenerados de bananeira cv. *prata-anã* por cm<sup>2</sup> obtidas em diferentes meios de cultivo.

Meios	Médias*
MA3	0,00 b
MRM	1,93 b
MRB	8,13 a
MRT	11,73 a

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste SNK no nível de 5% de significância.

O meio de cultura MA3 não proporcionou nenhum resultado positivo na regeneração da suspensão uma vez que as células oxidaram, necrosaram e culminado com a morte das células (Figura 3).

O meio MRM apresentou grande volume de massa celular friável, nenhuma oxidação, porém não foi observada uma germinação expressiva. Provavelmente este meio de cultivo exigirá mais uma repicagem para atingir níveis satisfatórios de embriões germinados (Figura 3).

É interessante ressaltar que para trabalhos de regeneração massal, tanto o número de embriões formados quanto o tempo em que estes levam para serem produzidos tem que ser levado em consideração. O ideal é obter um protocolo que viabilize uma regeneração de embriões somáticos em um curto período de tempo e com menor custo.

O meio MRT apresentou crescimento da massa celular satisfatório destacando-se pela quantidade de embriões germinados e uma maior uniformidade no tempo de germinação, ou seja, a maioria dos embriões encontrava-se no mesmo estágio de desenvolvimento (Figura 3).

O meio MRB mostrou qualitativamente um bom aspecto de massa celular, e ainda havendo um escurecimento das células que estavam em contato com o meio, apresentou uma média satisfatória de embriões regenerados (Figura 4).

Os meios de cultura MRM e MA3 são meios estabelecidos para regeneração de embriões somáticos de bananeira com resultados satisfatórios para diversas cultivares (Strosse et al. 2003; Morais-Lino et al., 2008a,b). No entanto para a cultivar *prata-anã* não foram eficientes, demonstrando que além da composição do meio de cultura interferir na embriogênese somática em bananeira este resultado também é cultivar dependente.

Os meios MRB e MRT são meios de cultura estabelecidos em trabalhos de regeneração de embriões somáticos de café (Boxtel & Berthouly, 1996;

Teixeira et al., 2004). Os resultados obtidos neste trabalho com os meios supracitados podem estar relacionado com suas diferentes composições, uma vez que o meio MRT possui metade das concentrações do sais do MS e uma concentração maior de citocinina (BAP) em relação à auxina (ANA) e o meio MRB possui também metade dos sais do MS e é suplementado somente com citocinina (BAP).

Outro fator relevante é a adição de compostos orgânicos que são fontes de nitrogênio como a caseína hidrolizada, adenina e extrato de malte. O meio MRB tem concentrações maiores destes compostos orgânicos do que o meio MRT. A quantidade de nitrogênio na composição dos meios de cultura utilizados durante o processo embriogênico é um fator importante, uma vez que este é indispensável para a formação de ácidos nucleicos, proteínas e síntese de substâncias de reserva. Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho podem estar ligados às concentrações diferentes dos reguladores de crescimento como também nas diferentes quantidades de nitrogênio uma vez que trabalhos encontrados na literatura com embriogênese somática demonstram haver uma interação entre esses dois componentes do meio de cultura. (Merkle et al., 1995).

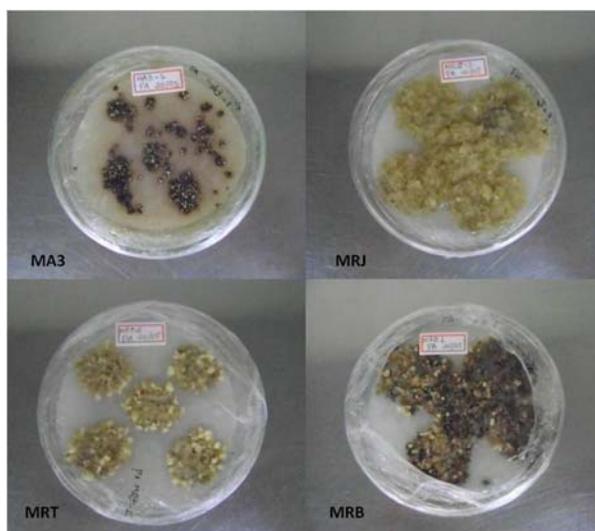


FIGURA 4 Aspecto visual do desenvolvimento celular da bananeira em diferentes meios de regeneração.

Os resultados apresentados podem indicar um direcionamento para futuros trabalhos que utilizem a cultivar *prata-anã* visando, por exemplo, transformação genética e regeneração de plantas saudias em larga escala.

## 6 CONCLUSÕES

O meio de cultura MS utilizando 11,4  $\mu$ M de AIA e 2,2  $\mu$ M de BAP foi eficiente para a regeneração de plântulas de bananeira cv. *prata-anã* a partir de suspensões celulares.

O meio MA3 é o menos indicado para a regeneração embriões a partir de células em suspensão de bananeira da cv. *prata-anã*.

Dentre os meios estudados, os meios MRT e MRB são os mais indicados para a regeneração de embriões somáticos para a cv. *prata-anã*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2009. 194p.

BOXTEL, J.; BERTHOLY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves: factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.44, n.1, p.7-17, Jan. 1996.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2003. 39p. (Documentos, 116).

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**, Copenhagen, v.97, n.2, p.285-290, Aug. 1996.

ESCALANT, J.V.; TEISSON, C.; CÔTE, F. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v.30, n.6, p.181-186, Dec. 1994.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, 2008. v.1, 501p.

GRAPIN, A.; SCHWENDIMAN, J.; TEISSON, C. Somatic embryogenesis in plantain banana. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v.32, n.2, p.66-71, Apr. 1996.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.533-568.

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, n.3, p.209-214, Dec. 2003.

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão**: focalizando a bananeira. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 24p. (Boletim de Pesquisa, 126).

MATSUMOTO, K.; MORAIS, L.S.; VIANNA, G.R. ARAGÃO, F.J.L.; REICH, E.L. Genetic transformation of banana embryogenic cells through particle bombardment, using a herbicide resistance gene as selectable marker. **Acta Horticulturae**, The Hague, Holanda, v.575, n. 2, p.61-67, Oct. 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 Academic, 1995. p.155-203. 558p.

MORAIS-LINO, L.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA, S.O.; SANTANA, J.R.F.; KOBAYASHI, A.K. Cell suspension culture and regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.10, p.1325-1330, out. 2008a.

MORAIS-LINO, L.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA, S.O.; SOUZA, K.A.; SANTANA, J.R.F. Regeneração de suspensão celular de bananeira 'Maçã' em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e AIA. In: REUNIÃO INTERNACIONAL DE ACORBAT, 18., 2008, Guayaquil. **Memórias...** Guayaquil: Corpei, 2008b. p.1-7.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J.; CÔTE, F. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. Montpellier: IPGRI, 2003. 31p. (INIBAP Technical Guidelines, 8).

TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P.C.; MELLO, R.I.S.; SILVA, A.P.D.; MUNDIM, D.A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (EMBRAPA. Documentos, 121).

XIAO, W.; HUANG, X.L.; HUANG, X.; CHEN, Y.P.; DAI, X.M.; ZHAO, J.T. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.90, n.2, p.191-200, Aug. 2007.

ZIMMERMANN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Oxford, v.5, n.10, p.1411-1423, Oct. 1993.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi observado que o período em que se tem maior viabilidade celular e a maior porcentagem de células com características embriogênicas em calos de bananeira cv. *prata-anã*, ocorrem aos 7 e 6 meses de cultivo dos calos, respectivamente.

As suspensões celulares apresentam predominantemente aglomerados com alto potencial embriogênico até 60 dias de subcultivo.

O meio de cultura MS suplementado com 11,4  $\mu\text{M}$  de AIA e 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP e os meios MRT e MRB foram eficientes para a regeneração de embriões somáticos a partir de células em suspensão.

Foi possível estabelecer um protocolo de obtenção de suspensão celular e a regeneração de embriões somáticos bananeira cv. *prata-anã*, tendo como fonte de explante inflorescência imatura masculina. Este trabalho serve de parâmetro para trabalhos futuros, principalmente com transformação genética, e como consulta bibliográfica uma vez que estudos com esta cultivar são escassos na literatura.

## ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Composição do meio de regeneração MRB (Boxtel & Berthouly, 1996).....	70
TABELA 2A Composição do meio de regeneração MRT (Teixeira et al., 2004).....	71
TABELA 3A Composição do meio de regeneração MA3 (Strosse et al., 2003).....	72
TABELA 4A Composição do meio de regeneração MRM (Morais-Lino et al., 2008 - com modificações)...	73

## ANEXO A

TABELA 1A Composição do meio de regeneração MRB (Boxtel &amp; Berthouly, 1996).

<b>Constituinte</b>	<b>Concentração final (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
KNO <sub>3</sub>	950
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
<b>Micronutrientes</b>	
KI	0,415
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	11,15
<b>Fonte de ferro</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13,9
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	18,65
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	200
Ác. Nicotínico	1
Piridoxina (HCl)	1
Tiamina (HCl)	10
Glicina	2,0
Sulfato de adenina	40
Caseína hidrolisada	400
Extrato de Malte	400
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
BAP (µM)	8,88
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	40
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,6

TABELA 2A Composição do meio de regeneração MRT (Teixeira et al., 2004)

Constituinte	Concentração final (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
KNO <sub>3</sub>	950
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
<b>Micronutrientes</b>	
KI	0,415
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	11,15
<b>Fonte de ferro</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13,9
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	18,65
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	100
Ác. Nicotínico	1
Piridoxina (HCl)	1
Tiamina (HCl)	10
Glicina	1
Caseína hidrolisada	100
Extrato de Malte	400
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
BAP (μM)	8,88
ANA (μM)	1,34
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	30
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,7 – 5,8

TABELA 3A Composição do meio de regeneração MA3 (Strosse et al., 2003)

Constituinte	Concentração final (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300
KNO <sub>3</sub>	2500
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	200
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	400
<b>Micronutrientes</b>	
KI	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,29
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1
<b>Fonte de ferro</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	20
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	100
Ác. Nicotínico	0,5
Piridoxina (HCl)	0,5
Tiamina (HCl)	0,1
Glicina	2,0
Biotina	1
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
ANA (µM)	1,07
Zeatina (µM)	0,14
2iP (µM)	0,98
Cinetina (µM)	0,46
<b>Aminoácidos</b>	
glutamina	100
prolina	230
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	45
Lactose (g. L <sup>-1</sup> )	10
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,8

TABELA 4A Composição do meio de regeneração MRM (Morais-Lino et al., 2008 - com modificações).

<b>Constituinte</b>	<b>Concentração final (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Micronutrientes</b>	
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22,3
<b>Fonte de ferro</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,25
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	100
Ác. Nicotínico	0,5
Piridoxina (HCl)	0,5
Tiamina (HCl)	0,5
Glicina	2,0
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
AIA (µM)	2,28
BAP (µM)	1,33
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	30
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,8