



YLANA CLÁUDIA MEDEIROS PAULA

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E
CONSERVAÇÃO DE CULTIVARES DE
BANANEIRA *IN VITRO***

LAVRAS - MG

2015

YLANA CLÁUDIA MEDEIROS PAULA

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E CONSERVAÇÃO DE
CULTIVARES DE BANANEIRA *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Coorientadora

Dra. Leila Aparecida Salles Pio

LAVRAS – MG

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Paula, Ylana Cláudia Medeiros.

Duplicação cromossômica e conservação de cultivares de
bananeira *in vitro* / Ylana Cláudia Medeiros Paula. – Lavras :
UFLA, 2015.

119 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Musaceae. 2. Cultura de tecidos. 3. Cromossomos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

YLANA CLÁUDIA MEDEIROS PAULA

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E CONSERVAÇÃO DE
CULTIVARES DE BANANEIRA *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 02 de dezembro de 2013.

Dr. Sebastião de Oliveira e Silva	Embrapa Mandioca e Fruticultura
Dra. Ester Alice Ferreira	EPAMIG
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA
Dra. Cynthia de Oliveira	UFLA

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

LAVRAS – MG

2013

A Deus e a Nossa Senhora Maria Mãe Santíssima.
Aos meus pais, José Cláudio Aires Paula e Ilka Medeiros Leite Paula, por todo
amor e ensinamentos transmitidos.
E a Maria Moraes (*in memoriam*) pela dedicação e amor incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e grandiosamente a Deus e Nossa Senhora, que foram meu alicerce nessa caminhada, fazendo-me suportar e superar todos os percalços.

Aos meus pais, José Cláudio Aires Paula e Ilka Medeiros Leite Paula, que são verdadeiros anjos em minha vida. Mesmo distantes, sempre estiveram comigo, amando-me incondicionalmente, incentivando-me, apoiando-me e acreditando no meu potencial. Pai, sei que jamais conseguirei retribuir tudo que já fizeste por mim, nem expressar o amor que sinto por você, que de tantas coisas boas que me ensinaste, dignidade foi a principal. Mãe, não sei o que seria de mim sem sua presença confortante e carinhosa. Obrigada, por participar de todas as etapas de minha vida, inclusive na avaliação dos experimentos deste trabalho. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Iluska Cláudia Medeiros Paula, Alcides Paula Neto e José Cláudio Aires Paula Júnior, pela torcida, carinho, por tantos momentos de descontração vividos.

Aos meus sobrinhos, Maria Eduarda (Dudinha) e Davi Alcides Paula.

A todos os meus familiares, pelo carinho e incentivo. Em especial, aos que vieram me visitar: José Medeiros Segundo, Fátima Leite, Sônia Vale, Ilza Leite, Janine Medeiros, Ingrid Medeiros, Alice Leite, Ismael Alves, Ildete Leite e Sebastião Almeida. Ao tio Hildemar, pelo esmero na elaboração de um seminário, por ter me acompanhado na viagem para que pudesse aprofundar meus conhecimentos sobre o assunto. E aos demais: avó, tios(as), primos(as) e cunhado(a).

Às amigas de longa data em especial, à Larissa Pires de Amorim e Lidianne Montenegro, pelo carinho e presença em todos os momentos de minha vida. E as amigas, Tais Regina Taffarel e Eloiza Lanferdini, pela amizade

sincera, convívio agradável, por me auxiliarem na avaliação deste trabalho e, principalmente, por me ampararem nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Lavras, em destaque o Departamento de Agricultura e Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao orientador, Prof. Dr. Moacir Pasqual, por ter me acolhido no laboratório desde o mestrado.

À coorientadora, Dr^a Leila Aparecida Salles Pio, pelas contribuições fundamentais durante o mestrado e doutorado.

Ao pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Sebastião de Oliveira e Silva, pelo material cedido, primordial, para a realização deste trabalho e conclusão do doutorado.

Aos participantes da banca examinadora de qualificação e defesa da Tese.

À professora, Clarete Cardoso Ribeiro e ao professor Vander Mendonça, pelo incentivo e ensinamentos, desde a graduação, fundamentais na minha carreira acadêmica.

Aos laboratoristas, Claret e Vantuil, pelos ensinamentos, apoio e amizade. E ao laboratorista Evaldo, pela ajuda fundamental na execução de um experimento da tese.

À Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudo.

A todos os meus amigos (as) da pós-graduação, graduação e a todos os professores da Universidade Federal Rural do Semiárido, pelos ensinamentos, estima, amizade e incentivo permanente e da Universidade Federal de Lavras, em especial à Prof^a. Janice Guedes de Carvalho (*in memoriam*) pela amizade e colaboração que foram fundamentais durante o mestrado.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.”
Saint-Exupéry – O pequeno príncipe

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”
Carl Jung

“Um passo a frente e você não está mais no mesmo lugar.”
Chico Science

“O cientista não estuda a natureza porque isso é útil; ele a estuda porque se deleita com isso, e se deleita com isso porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena conhecê-la, e se a natureza não merecesse ser conhecida, a vida não valeria a penas ser vivida”.

Henry Poincaré.

RESUMO

Objetivou-se, com o presente trabalho avaliar o efeito da colchicina na duplicação de cromossomos em explantes da bananeira 'Ouro' e analisar o efeito de diferentes reguladores osmóticos (sacarose, sorbitol e manitol) na conservação *in vitro* de explantes das bananeiras Grande Naine, Preciosa e Princesa. Foram utilizados como fonte de explantes, cultivares de bananeira pré-estabelecidas *in vitro*, fornecidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. A colchicina foi utilizada nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ em meio MS e as plantas foram mantidas no escuro por 2, 4, 8, 16 e 32 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5 (5 doses de colchicina e 5 períodos de exposição). Por meio de análise em citometria de fluxo, observou-se que 379 (58,3%) explantes sobreviveram à indução da duplicação de cromossomos *in vitro*, especialmente nos tratamentos mais brandos. Foram obtidas 18 plantas tetraploides (4,7%), 72 mixoplóides (19,1%), 5 plantas apresentaram conteúdo de DNA superior aos tetraplóides, (1,3%), 6 aneuplóides (1,6%) e 278 permaneceram diplóides (73,5%). O período de 2 e 4 dias foram os tratamentos que apresentaram maior número de plantas com material genético duplicado, não havendo diferença significativa entre as concentrações de colchicina. Na conservação *in vitro*, os reguladores osmóticos foram utilizados nas concentrações de 20 e 40 g L⁻¹, sendo adicionados no meio de cultura MS e os explantes permaneceram conservados *in vitro* por 160, 260 e 360 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3x2 (3 cultivares de bananeira, 3 fontes e 2 concentrações de carbono). Em seguida, foram inoculados em meio de cultura MS, sendo avaliada a capacidade responsiva das cultivares, após 45 dias. Na presença do sorbitol, os explantes apresentaram resultados favoráveis à paralização do crescimento durante a conservação *in vitro*, sem apresentar maiores perdas na sobrevivência e retomada do crescimento *in vitro*.

Palavras-chave: *Musaceae*. Cultura de tecidos. Cromossomos.

ABSTRACT

With the present work, we aimed at evaluating the effect of colchicine over the duplication of chromosomes in “Ouro” banana explants and analyze the effect of different osmotic regulators (sucrose, sorbitol and mannitol) in the *in vitro* conservation of Grande Naine, Perciosa and Princesa banana explants. We used banana cultivars pre-established *in vitro*, provided from Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, as explant source. Colchicine was used in the concentrations of 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹ in MS medium, and the plants were maintained in the dark for 2, 4, 8, 16 and 32 days. The experimental design was completely randomized, in a 5x5 factorial scheme (5 doses of colchicine and 5 exposition periods). By means of flow cytometry analysis we observed that 379 (58.3%) of the explants survived the induction of the *in vitro* chromosome duplication, especially in the gentler treatments. We obtained 18 tetraploid plants (4.7%), 72 mixoploid (19.1%), 5 plants presented DNA content superior to that of the tetraploid plants (1.3%), 6 aneuploids (1.6%) and 278 remained diploid (73.5%). The period of 2 and 4 days were the treatments that presented higher number of plants with doubled genetic material, having no significant difference between the concentrations of colchicine. In the *in vitro* conservation, the osmotic regulators were used on the concentrations of 20 and 40 g L⁻¹, being added to the MS culture medium, and the explants remained conserved *in vitro* for 160, 260 and 360 days. The experimental design was completely randomized, in a 3x3x2 factorial scheme (3 banana cultivars, 3 sources and 2 concentrations of carbon). Subsequently, we inoculated in MS culture medium, evaluating the responsive capacity of the cultivars after 45 days. In the presence of sorbitol, the explants presented favorable results to the growth suspension during the *in vitro* conservation without presenting greater loss in the survival and resume of growth *in vitro*.

Keywords: *Musaceae*. Tissue culture. Chromosomes.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral.....	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Cenário mundial e nacional	15
2.1.1	A bananicultura no estado de Minas Gerais	16
2.2	Origem e caracterização da bananeira	17
2.3	Micropropagação	19
2.3.1	Conservação <i>in vitro</i>	20
2.3.1.1	Fontes de carbono	21
2.3.2	Subcultivos	22
2.3.3	Variação somaclonal	22
2.4	Melhoramento genético	23
2.4.1	Duplicação de cromossomos	27
2.4.2	Identificação de poliploides	28
2.4.2.1	Citometria de fluxo	29
2.4.2.2	Contagem de cromossomos	30
2.4.2.3	Anatomia foliar	30
	REFERÊNCIAS	32
	CAPÍTULO 2 Duplicação cromossômica de bananeira <i>in vitro</i> com colchicina	39
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	Micropropagação do material vegetal e tratamento com colchicina	43
2.2	Identificação dos poliploides por citometria de fluxo	44
2.3	Análise citogenética	46
2.4	Análise dos explantes em meio MS, após tratamento com colchicina	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1	Citometria de fluxo	48
3.2	Contagem de cromossomos	58
3.3	Sobrevivência e crescimento dos explantes no meio MS	59
4	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	CAPÍTULO 3 Fontes de carbono na conservação <i>in vitro</i> de cultivares de bananeira.....	72
1	INTRODUÇÃO	74
2	MATERIAIS E MÉTODOS	77

2.1	Influências de diferentes concentrações e fontes de carbono na conservação <i>in vitro</i> das cultivares de bananeira, Grande Naine, Preciosa e Princesa.....	77
2.2	Capacidade responsiva das cultivares de bananeira, Grande Naine, Preciosa e Princesa, em meio MS.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1	Resultados obtidos da influência de diferentes concentrações e fontes de carbono na conservação <i>in vitro</i> das cultivares de bananeira Grande Naine, Preciosa e Princesa	81
3.2	Capacidade responsiva das cultivares de bananeira Grande Naine, Preciosa e Princesa, em meio MS.....	95
4	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS.....	110

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

A banana é a fruta mais consumida no mundo. Apresenta uma boa aceitação, em razão da sua palatabilidade e composição nutricional, com casca de fácil remoção, portanto, de consumo prático e higiênico. Está presente na dieta alimentar de diversas camadas da população e, por produzir o ano inteiro, garante emprego e renda para milhares de brasileiros, dessa forma, a cultura exerce papel fundamental na fixação do homem no campo.

A produção brasileira de banana está distribuída por todo o território nacional, sendo a região Nordeste a maior produtora, seguida das regiões Sudeste, Sul, Norte e Centro-Oeste. A alta produtividade da região Nordeste deve-se ao uso da irrigação, que aliada a condições de clima e solo favoráveis ao cultivo da bananeira resulta numa produtividade média acima da nacional.

As cultivares apresentam uma grande diversidade, com relação às características sensoriais e agronômicas. As bananeiras que produzem frutos comestíveis são da espécie *Musa acuminata*, compostas pelo genoma A ou do seu cruzamento com a espécie *Musa balbisiana*, genoma B, formando os grupos genômicos que podem ser AA, AB, AAA, AAB, AAAB, ABB. Os subgrupos são compostos por cultivares de características semelhantes, como Cavendish (AAA), Prata (AAB) e Figo (ABB). No Brasil, a banana mais produzida é do tipo Prata, no entanto, esta é restrita ao mercado nacional. As cultivares que apresentam características adequadas para exportação pertencem ao subgrupo Cavendish.

Esses genótipos apresentam diferentes potenciais agronômicos, tais como, graus de resistência à Sigatoka-negra, Sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá, doenças causadas pelos fungos, *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*,

Mycosphaerella musicola e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, respectivamente, que são responsáveis pelo decréscimo significativo na produção de banana. Essas doenças, no entanto, podem ser controladas pelo uso de cultivares resistentes, obtidas por métodos convencionais (seleção clonal e hibridação) ou pelo uso de biotecnologia (mutação, duplicação de cromossomos e transgenia).

O melhoramento genético da bananeira visa ao desenvolvimento de genótipos resistentes a doenças e mais produtivos, normalmente, por meio do uso de diplóides (AA) melhorados, cruzados com triploides, gerando híbridos tetraploides. No entanto, essa técnica é dificultada, em decorrência da esterilidade de alguns genótipos triploides, como os do subgrupo Cavendish. Empecilho esse que pode ser contornado por métodos de melhoramento não convencionais, a exemplo da duplicação de cromossomos em diplóides, seguido do cruzamento destes autotetraploides com diplóides resistentes a doenças, gerando um triploide secundário. Essa poliplóidização baseia-se na aplicação de substâncias que inibem a divisão celular (antimitóticos) e promovem a duplicação do material genético.

Dessa forma, é possível obter material tetraploide para serem cruzados com um genótipo diplóide elite e, assim, obter uma cultivar triploide com características agrônomicas favoráveis e de boa aceitação para comercialização.

A técnica de duplicação de cromossomos deve ser realizada *in vitro*, pois, assim, as condições de cultivo podem ser controladas, otimizando o processo.

Por meio da cultura de tecidos vegetais é possível obter mudas micropropagadas com características favoráveis, como produção em larga escala de material geneticamente uniforme, sadio e vigoroso.

No entanto, no caso da bananeira, para a propagação massal são necessários muitos subcultivos *in vitro*. Esse fato pode contribuir para

ocorrência de variação somaclonal. Essa variação aparece com frequência a partir do 5º subcultivo para essa cultura. A maioria dos variantes somaclonais apresenta características deletérias, entretanto, essa variação pode ser útil aos melhoristas, ao gerar variabilidade.

Outro segmento da cultura de tecidos vegetais é a conservação *in vitro*, utilizada na manutenção dos bancos ativos de germoplasma para a preservação de genótipos. Esses materiais mantidos *in vitro*, devem se desenvolver de forma lenta, para serem conservados, no entanto é imprescindível que mantenham sua integridade genética.

Tanto para a confirmação dos tetraploides obtidos pela duplicação cromossômica, quanto para verificação da estabilidade genética de plantas subcultivadas por sucessivas gerações de conservação *in vitro*, a estimativa do número de cromossomos pode ser feita por citometria de fluxo, por ser um método rápido e relativamente simples.

Nesse contexto, neste trabalho, objetivou-se: elaborar um protocolo de duplicação cromossômica em plantas de bananeira submetidas a tratamentos com diferentes concentrações do antimitótico colchicina; avaliar o efeito de diferentes concentrações de açúcares (sorbitol, manitol e sacarose) na conservação *in vitro*, visando a uma maior eficiência e estudar a influência do número de subcultivos na ocorrência de variação somaclonal em cultivares de bananeira, avaliando os resultados por citometria de fluxo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cenário mundial e nacional

No mercado mundial, a banana desempenha um papel importante dentre as frutas frescas, pois abrange quase todas as regiões do mundo, é produzida durante todo o ano e apresenta um alto consumo. A cultura da bananeira vem sendo praticada nos cinco continentes, sendo os países detentores da maior produção Índia, China, Filipinas, Equador e o Brasil, em ordem decrescente. A produção mundial de banana, em 2011, foi de 106,5 milhões de toneladas, movimentando cerca de US\$ 28 bilhões. O Brasil teve participação significativa com o montante de 7,3 milhões de toneladas e, aproximadamente, US\$ 2 bilhões (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2013).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, ficando atrás apenas da China e da Índia. Entretanto, é líder quanto à produção de frutas tropicais, sendo a bananeira (*Musa* sp.) a frutífera tropical mais cultivada no território nacional, abrangendo uma área plantada superior a 523 mil hectares e 480 mil hectares de área colhida, com rendimento médio de 14 mil kg.ha⁻¹ em 2012 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013).

A cultura da bananeira diferencia-se dos demais cultivos de frutíferas, em razão do rápido retorno do capital investido, além de apresentar um fluxo contínuo de produção, a partir do primeiro ano de cultivo. Dessa forma, os produtores de diversas regiões são atraídos pelo uso dessa cultura.

Para se escolher uma cultivar para determinada região, deve-se levar em consideração, aspectos agronômicos como potencial produtivo e resistência à seca, a pragas e doenças e as preferências do mercado consumidor ao qual a

produção se destina. Por isso, tanto para consumo *in natura*, beneficiamento industrial, comércio local ou exportação, é imprescindível que seja realizado um estudo de mercado, junto aos agentes da cadeia, a fim de se evitar problemas futuros de comercialização (SENA, 2011).

2.1.1 A bananicultura no estado de Minas Gerais

O norte de Minas Gerais é uma região que apresenta sérias limitações para o cultivo da bananeira, em razão da pequena quantidade de chuva (RIBEIRO et al., 2009), no entanto, destaca-se como uma das principais regiões produtoras de bananas e o maior polo produtor de bananas tipo Prata no Brasil, adotando alta tecnologia de produção e obtendo elevadas produtividades sob irrigação (SOUZA et al., 2010), principalmente nos municípios de Jaíba e Janaúba (IBGE, 2013). A bananicultura irrigada também tem contribuído, significativamente, no desenvolvimento econômico e social das áreas carentes do semiárido brasileiro (FARIA et al., 2010).

Dessa forma, a economia da região está baseada numa cultivar suscetível a vários problemas fitossanitários, com destaque à Sigatoka-amarela e Sigatoka-negra, o que a torna vulnerável por não apresentar resistência a esses fitopatógenos (CASTRO; PEREIRA; GASPAROTTO, 2005).

Dentre os materiais estudados pelo programa de melhoramento da Embrapa, os genótipos que apresentaram potencial de uso na região Nortemineira BRS, foram a Platina (PA42-44), a FHIA-18 (PA94-01) e a Princesa (YB42-07), que apresentam como base de cultivo as cultivares Prata-Anã e Grande Naine, cujos genótipos apresentam características diferenciadas. Esses três genótipos são resistentes à Sigatoka-amarela, com graus diferentes de resistência. O genótipo Princesa é resistente à Sigatoka-negra e tolerante à Fusariose. A ‘BRS Platina’ está em avaliação quanto a sua resistência à

Sigatoka-negra e é resistente à Fusariose. A 'FHIA-18' é resistente à Sigatoka-negra e tolerante à Fusariose (CRUZ, 2012; RODRIGUES et al., 2010).

2.2 Origem e caracterização da bananeira

A bananeira pertence ao gênero *Musa*, família *Musaceae*, sendo esta uma das seis famílias da ordem Zingiberales Grisebach. É originária do continente Asiático, sendo também reconhecidos outros centros de origem secundários na África e nas ilhas do Pacífico. Apesar de não ser autóctone, o cultivo da banana, no Brasil, espalhou-se, de tal maneira, que hoje se destaca como a fruta mais consumida no país (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2008).

Uma das principais características morfológicas da bananeira é a presença do pseudocaule, formado pelas bainhas das folhas superpostas. O caule da bananeira é um rizoma subterrâneo, e os frutos, na verdade, tratam-se de pseudobagas (bananas). A propagação da bananeira é feita de forma assexuada (SENA, 2011). No entanto, algumas cultivares selvagens produzem sementes, o que é útil em programas de melhoramento.

A faixa ótima de temperatura para a exploração comercial da bananeira situa-se em torno de 28°C, com mínimas não inferiores a 15°C e máximas não superiores a 35°C. A precipitação ideal fica entre 1.900 mm/ano e a umidade do ar superior a 80%. Para plantios irrigados, estima-se que uma planta com área foliar ótima, consuma entre 15 e 30 litros de água por dia, dependendo das condições atmosféricas. Como o vento pode causar desde pequenos danos, até a derrubada das bananeiras, é aconselhável a adoção de medidas que diminuam a sua incidência, tais como a utilização de quebra-ventos nas áreas periféricas do bananal, por exemplo, a acácia, a leucena e o bambu. Os prejuízos são proporcionais a sua intensidade. A altitude também deve ser observada, pois é

um agente que influencia os outros fatores, sendo, bananeira, normalmente, cultivada em altitudes que vão até 1.000 metros acima do nível do mar (BORGES; SOUZA, 2004).

As bananeiras que produzem frutos comestíveis são da espécie *Musa acuminata* (genoma A) ou do seu cruzamento com *Musa balbisiana* (genoma B). Apresentam níveis cromossômicos diploides, triploides e tetraploides, com 22, 33 e 44 cromossomos, respectivamente. As combinações variadas de genomas completos, denominados pelas letras A e B, formam grupos varietais compostos por cultivares com características semelhantes. O subgrupo Cavendish, por exemplo, pertence ao grupo genômico AAA e é composto pelas cultivares Nanica, Nanicão e Grande Naine e o Prata ao grupo AAB e é composto pela Prata Comum, Pacovan, Prata São Tomé e outras.

As frutas de cultivares do tipo AA e AAA são mais doces, enquanto as do tipo AAB, são mais ácidas. Existem também bananas do tipo AAB que possuem maior teor de amido, e são consumidas tipicamente, após cozimento ou fritura, como, por exemplo, a cultivar Terra.

Embora exista um número expressivo de cultivares de bananeira no Brasil, quando se considera preferência dos consumidores, porte adequado, resistência a seca, tolerância a doenças e pragas, restam poucas cultivares com potencial agrônomo para utilização comercial (DONATO et al., 2006; SOUZA et al., 2010).

As cultivares de bananeira mais difundidas no Brasil são: Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D'Angola pertencentes ao grupo genômico AAB e utilizadas unicamente para o mercado interno. Já, as do grupo genômico AAA, Nanica, Nanicão e Grande Naine são usadas, principalmente, para exportação e industrialização. Também conhecidas como bananas d'Água ou caturra, apresentam frutos delgados, longos, encurvados, de cor amarelo-esverdeada ao amadurecer, com polpa muito doce. Em menor escala, também

são plantadas a Ouro (AA), Figo Cinza e Figo Vermelho (ABB), Caru Verde e Caru Roxa (AAA). Dentre essas, as cultivares Prata, Prata Anã e Pacovan são responsáveis por mais da metade da área cultivada com bananeira no Brasil (BORGES et al., 2009).

2.3 Micropropagação

A propagação da bananeira é feita de forma assexuada, assim sendo, as mudas podem ser produzidas, convencionalmente, por rizomas ou em laboratório pelo método de micropropagação. A escolha do tipo de muda vai depender do objetivo e disponibilidade de investimento do produtor.

As mudas obtidas por micropropagação são as mais usadas, para a obtenção de uma produção massal de propágulos com alta sanidade, em períodos de tempo e espaço físico reduzidos. Produzem bananeira que se caracterizam por apresentar alto vigor, com maior número de frutos por penca, maior número de pencas por cacho, menor variabilidade no tamanho e forma dos frutos, menor incidência de nematóides em áreas contaminadas e colheita sincronizada nos primeiros ciclos da cultura graças à homogeneidade das mudas e estabelecimento de plantações uniformes (SINGH; SELVARAJAN; KARIHALOO, 2011).

Diferentes protocolos de micropropagação para bananeira foram estabelecidos, envolvendo as seguintes etapas: seleção de plantas matrizes e dos explantes, retirada e desinfestação dos ápices caulinares, estabelecimento dos explantes em meio de cultura *in vitro*, multiplicação das brotações, enraizamento e alongamento das brotações *in vitro* e aclimatização das mudas micropropagadas.

A micropropagação tem aplicações importantes em programas de melhoramento, de plantas de propagação vegetativa, por permitir a rápida

multiplicação dos genótipos selecionados, reduzindo o tempo para a realização de avaliações clonais. Além disso, essa técnica tem sido utilizada em bananeira na conservação e intercâmbio de germoplasma, duplicação de cromossomos, indução de variação somaclonal, dentre outras (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

2.3.1 Conservação *in vitro*

A manutenção de acessos de uma espécie é fundamental para o seu melhoramento genético, uma vez que representa a variabilidade genética disponível a ser explorada. Todavia, a conservação de coleções de germoplasma, em campo, apresenta desvantagem por ser dispendiosa, trabalhosa e estar sujeita à erosão genética, em decorrência de condições ambientais desfavoráveis e da incidência de doenças e pragas. Outro entrave observado na cultura da bananeira é que a maioria das cultivares não produz sementes e, portanto, não pode ser conservada em um banco de sementes convencional.

Outra forma de conservação é por meio da criopreservação (conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196°C , ou, em sua fase de vapor, a -150°C). Essa técnica pode assegurar a conservação de material biológico, por longos períodos de tempo, uma vez que a essas temperaturas ultrabaixas o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é, virtualmente, paralisada. Entretanto, o grande desafio para o criobiologista é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células, pois isso causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando no colapso e morte das células (SANTOS, 2001).

A conservação *in vitro* apresenta-se como alternativa interessante por possibilitar a manutenção de grande número de acessos, em pequeno espaço físico e livres de riscos causados por fatores bióticos e abióticos. Apresenta, no entanto, algumas limitações, como o risco de perda de acessos em decorrência

da contaminação, perda do potencial morfogênico e a possibilidade da ocorrência de variação somaclonal, durante o processo de cultivo, embora a estocagem, em condições de crescimento mínimo, ajude a reduzir a frequência com que as mutações ocorrem. Outro aspecto a ser considerado na condução dessas coleções é o labor intenso para realizar subcultivos, pelo menos uma vez ao ano, de todos os acessos (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

2.3.1.1 Fontes de carbono

Os agentes osmóticos, tais como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993). O potencial osmótico representa o efeito de solutos dissolvidos sobre o potencial hídrico. Os solutos reduzem a energia livre da água por diluição desta (TAIZ; ZEIGER, 2009), influenciando o crescimento das plantas *in vitro*.

A sacarose, uma substância conhecida desde o ano 200 a.C. é o carboidrato de baixa massa molecular mais abundante. É um dissacarídeo não redutor, constituído de dois monossacarídeos, D-glicose e D-frutose, que estão ligados entre si, através dos seus carbonos anoméricos (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009). A sacarose é importante como fonte de carbono, visto que, inicialmente o explante não é suficientemente autotrófico. Este participa da glicólise e do ciclo de Krebs e quando na presença da auxina, pode contribuir para a diferenciação do câmbio em benefício de novas formações de xilema e floema.

O manitol é um carboidrato natural encontrado em diversos vegetais como beterraba, cebola, aipo, figo e azeitonas. Também está presente em alguns exsudatos de árvores e algas marinhas, dos quais pode ser obtido, por meio de

extração com álcool a quente. Por ser um poliol altamente versátil e de baixo custo, é bastante utilizado para os mais diversos fins comerciais e científicos (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009). O sorbitol também ocorre em grandes quantidades na natureza, estando presente em diversas frutas, entretanto, a sua extração, a partir de fontes naturais não é economicamente viável. Portanto, uma alternativa é a obtenção industrial desses álcoois, por meio da hidrogenação catalítica da glicose (sorbitol) e frutose (manitol).

2.3.2 Subcultivos

Existem diferentes fatores que podem causar variação somaclonal em bananeira; a origem do explante (folhas, meristemas, etc), genótipo, tipo e concentração de reguladores de crescimento, método utilizado na micropropagação (regeneração indireta), além da quantidade e duração dos subcultivos. Assim, o controle da ocorrência de variação somaclonal pode ser realizado mediante o cultivo *in vitro*, em condições apropriadas, como a utilização de baixas concentrações de reguladores de crescimento e um limite de até cinco subcultivos para multiplicação (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011; JUNGHANS; SOUZA, 2009).

2.3.3 Variação somaclonal

A variação somaclonal corresponde a uma variação fenotípica de plantas regeneradas por cultura de tecidos, que pode ter origem genética ou epigenética. É denominada genética quando uma variação cromossômica torna-se herdável nas gerações seguintes, e epigenética quando uma variação é transitória, em decorrência do estresse fisiológico que o material sofre, quando submetido ao cultivo *in vitro* (ILLG, 1990; SAHIJRAM; SONEJI; BOLLAMMA, 2003).

A variação somaclonal pode ser útil para os programas de melhoramento, principalmente em se tratando de espécies de propagação assexuada, como na cultura da bananeira. Porém, pode ser considerada como indesejável, para a obtenção da uniformidade genética e manutenção dos caracteres genéticos da planta matriz. Dependendo da cultivar de bananeira, as variações somaclonais podem apresentar sintomas como a supressão de comprimento da parte aérea, alterações nas características foliares, entre outras.

A identificação da variação somaclonal pode ser realizada por meio de marcadores moleculares, ou por citometria de fluxo.

2.4 Melhoramento genético

Uma das estratégias para suprir a falta de cultivares comerciais de bananeira com características desejáveis, isto é, que sejam produtivas, com porte adequado, resistentes às principais pragas e doenças, adaptadas a diferentes ecossistemas e aceita por consumidores é o desenvolvimento de novas cultivares, por meio de programas de melhoramento genético. Esses novos genótipos, em sua maioria, são tetraplóides, oriundos de cruzamentos entre triplóides (cultivares comerciais) e diplóides melhorados ou selvagens (SILVA; MORAIS; SANTOS-SEREJO, 2005).

A baixa variabilidade genética na bananicultura representa grande risco, visto que, as pragas provocam severas perdas na produção de banana, que dependendo das circunstâncias, podem ser de até 100%. A maioria das cultivares de bananeira utilizada pelos agricultores é suscetível às principais pragas da cultura (SILVA et al., 2011). Os fungos constituem os maiores problemas da bananicultura mundial, merecendo destaque o Mal-do-Panamá e as Sigatocas amarela e negra (RODRIGUES; SOUTO; SILVA, 2006). Os fungos podem entrar diretamente através da epiderme da célula vegetal ou estender suas hifas

acima, entre ou através das mesmas (JONES; DANGL, 2006). A infecção de ambos os fungos das Sigatokas ocorre de maneira ativa, através dos estômatos (MORAES, 2008). Os esporos são facilmente transportados pelo vento e depositados nas folhas jovens da bananeira.

Em razão do uso de uma única cultivar, a Gros Michel, suscetível ao mal-do-Panamá, usada na exportação, ocorreu dizimação dos bananais da América Central e do Sul. Em decorrência desse acontecimento, a cultura da bananeira passou a ser cultivada apenas em áreas de abertura da fronteira agrícola, com o objetivo de encontrar solos livres do patógeno. Atualmente, esse agronegócio corre risco semelhante, por usar somente cultivares do subgrupo Cavendish. É um risco iminente em regiões produtoras de qualquer espécie vegetal, quando se usa baixa variabilidade genética (PIMENTEL et al., 2010).

O Mal-do-Panamá é uma doença extremamente séria, pois o patógeno é habitante do solo, e apresenta estruturas, denominadas clamidósporos, que lhe permitem sobreviver no solo por várias décadas, mesmo na ausência de bananeiras suscetíveis. Isso faz com que a medida de controle mais efetiva seja o uso de cultivares resistentes (NOGUEIRA, 2009).

A Sigatoka-amarela, uma das mais importantes doenças da bananeira, apresenta distribuição endêmica no País. É causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola*, Leach, forma teliomórfica, perfeita ou sexuada de *Pseudocercospora musa* (Zimm) Deighton, forma anamórfica, imperfeita ou assexuada. O esporo teliomorfo ou sexuada é denominado ascósporo, e o anamórfico ou assexuada, como conídio. O primeiro evento para que ocorra a doença é a deposição do esporo sobre uma folha suscetível. Se houver presença de umidade, na forma de água livre haverá a germinação do esporo, ocorrendo, a seguir, a infecção através do estômato. A morte precoce das folhas, causada pela doença, reflete, diretamente, na produção. Altos níveis de doença provocam ainda, diminuição do número de pencas e do tamanho dos frutos, maturação precoce dos frutos no

campo, enfraquecimento do rizoma e perfilhamento lento (BORGES; SOUZA, 2004).

A Sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), fase anamórfica *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, já presente em várias regiões brasileiras, é uma doença muito agressiva e a mais temida em todo o mundo, porque o fungo ataca as folhas da bananeira com grande intensidade, causando enormes prejuízos, em razão de seu controle oneroso (SOUZA et al., 2010) e a agressividade do fungo. O esporo assexual de *P. fijiensis* (conídio) está presente durante as fases de estrias ou manchas jovens da doença, onde se observam conidióforos, estrutura de produção dos conídios, saindo sozinhos ou em pequeno número dos estômatos localizados na face inferior da folha. A fase sexuada é considerada mais importante no aumento da doença, uma vez que grande número de ascósporos, esporos sexuados, são produzidos em estruturas denominadas pseudotécios, que se formam principalmente na face superior da folha (BORGES; SOUZA, 2004).

Em todas as regiões úmidas do mundo nas quais ocorre, a Sigatoka-negra pode provocar a redução de até 100% na produção de bananas e aproximadamente 70% na produção de plátanos. Quando comparada com a Sigatoka-amarela, (*M. musicola*), os distúrbios provocados pela doença são similares, embora em maior intensidade e atacando número muito maior de cultivares de bananeira e de plátanos que apresentam resistência completa à Sigatoka-amarela (BORGES; SOUZA, 2004).

Proteínas relacionadas ao Patógeno (PR – *Pathogenesis-related proteins*) são proteínas codificadas pela planta hospedeira, mas que tem a sua expressão induzida por agentes patogênicos, como fungos, bactérias e vírus, ou outros tipos de estresse (BOL; LINTHORST; CORNELISSEN, 1990). A infecção da folha por organismos patogênicos acelera a biossíntese de etileno na folha, que ativa a via de sinalização que leva a expressão de genes relativos a

PR. Embora as proteínas PR estejam envolvidas na defesa de plantas, elas não são necessariamente identificadas por sua situação de patogênese (LOON, 1997).

Com exceção do mal-do-Panamá e das viroses, o controle das principais pragas tem sido feito pelo uso de defensivos agrícolas, porém, estes produtos químicos têm impacto direto no meio ambiente e na saúde. Outra estratégia de controle viável dessas pragas seria o uso de cultivares resistentes, entretanto a maioria das cultivares de bananeira que possuem resistência aos patógenos, não apresentam características favoráveis à sua comercialização, como sabor do fruto, produtividade, porte e resistência ao frio. Então, para contornar esses problemas, diversas técnicas de melhoramento foram desenvolvidas.

O método de melhoramento convencional em bananeira consiste no cruzamento de genótipos diplóides (AA), que apresentam o maior número possível de características favoráveis, com triplóides comerciais (AAB), gerando híbridos tetraploides (AAAB) resistentes a doenças, pragas e nematoides e com frutos de qualidade. Dessa forma, é possível introduzir resistência a pragas nos híbridos gerados, além de induzir aumento de produtividade e acarretar menor custo de produção, em função do reduzido emprego de defensivos agrícolas e redução de gastos com o manejo da cultura, além de proporcionar melhoria na qualidade dos frutos, aumentando, conseqüentemente, a renda do produtor de forma geral.

No entanto, essa estratégia é dificultada, em razão da esterilidade e partenocarpia presentes nos genótipos triplóides usados no comércio, como os do subgrupo Cavendish (FORTESCUE; TURNER, 2005; MATOS, 2009). Uma das alternativas que pode contornar a esterilidade é o uso de métodos não convencionais de melhoramento, como a indução da duplicação de cromossomos *in vitro*, seguida do cruzamento dos autotetraploides férteis com diplóides melhorados, gerando um triplóide secundário.

2.4.1 Duplicação de cromossomos

A duplicação dos cromossomos é resultante da afinidade dos agentes antimitóticos com o fuso, particularmente com a tubulina, impedindo a sua formação e, conseqüentemente, impossibilitando a separação das cromátides irmãs na divisão da célula. Como resultado, tem-se uma duplicação do número de cromossomos por célula em cada processo mitótico, na presença do inibidor (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

A metodologia de duplicação cromossômica consiste em estabelecer os explantes *in vitro* e, em seguida, o antimitótico é adicionado ao meio. Porém, as desvantagens dessa metodologia é que nem todas as espécies apresentam bom estabelecimento nas condições de cultivo *in vitro* e também, com relação a maior exigência no controle do experimento, tais como: temperatura, luminosidade, nutrição, controle de patógenos, entre outros (PEREIRA et al., 2012).

A colchicina é o antimitótico mais usado para a indução da poliploidia. Entretanto, a duplicação de cromossomos também pode ser obtida com a aplicação de outros antimitóticos, Amiprofós-metil (APM), cafeína, trifluralina e orizalina, que apresentam toxicidade menor que a colchicina.

A colchicina ($C_{22}H_{25}O_6N$) caracteriza-se por ser um alcaloide, extraído a partir de plantas de *Colchicum autumnale* (Liliaceae). A colchicina como agente indutor de poliploidia em cultura de plantas *in vitro* tem suas limitações, pois, em elevadas concentrações ou tratamentos muito prolongados, torna-se tóxica para os tecidos vegetais (HAMILL; SMITH; DOOD, 1992). Apresentando como desvantagem o fato de essa substância somente atuar com eficiência em células que estão em divisão, desse modo, a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides

(CARVALHO; CARVALHO; OTONI, 2005; WAN; PETOLINO; WIDHOLM, 1989).

É necessário realizar pelo menos três subcultivos, após aplicação do antimitótico, a fim de reduzir o número de mixoploidia nas plantas regeneradas (ROUX et al., 2004).

Em consequência, surge o problema da reversão parcial ou total à condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, principalmente, em decorrência da proliferação de células diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores àquelas células poliplóides. Além disso, a colchicina as leva à esterilidade e crescimento anormal de plantas regeneradas (WAN; PETOLINO; WIDHOLM, 1989). Por isso, visando à maior eficiência do tratamento, têm-se variado a forma de aplicação, a concentração e o tempo de exposição ao antimitótico.

Um sistema eficiente para indução de poliploidização requer um efetivo método para a verificação de ploidia.

2.4.2 Identificação de poliploides

Após a indução da duplicação, é necessário avaliar o resultado da metodologia estudada. Com a duplicação, tem-se aumento do volume celular, portanto, caracteres como o tamanho e a densidade das células estomáticas podem ser utilizados na identificação de poliploides. Assim como a contagem de cromossomos, os caracteres morfológicos da planta e a determinação do conteúdo de DNA em núcleos de células. O conteúdo de DNA é um método simples e seguro de avaliar a ploidia, mediante análise por citometria de fluxo (DOLEZEL; BARTOS, 2005; DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

2.4.2.1 Citometria de fluxo

A utilização da citometria de fluxo, para a determinação do conteúdo celular em plantas, foi tardia, pela dificuldade de extração de núcleos intactos, a partir de células vegetais, sendo que os primeiros experimentos sugeriam que apenas núcleos extraídos de protoplastos poderiam ser analisados, o que limitava o uso da técnica a um grupo muito pequeno de espécies (DOLEZEL; BARTOS, 2005). A ascensão da citometria de fluxo em plantas nas últimas décadas, só foi possível, em decorrência de uma simples mudança na metodologia, o uso de uma lâmina, ao invés de enzimas para isolamento de núcleos (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

A partir dessa descoberta, começaram a surgir inúmeros trabalhos, envolvendo análise de plantas em citometria de fluxo, inclusive na cultura da bananeira (D'HONT et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2009; JESUS et al., 2013; NSABIMANA; STADEN, 2006; OSELEBE et al., 2006; ROUX et al., 2003).

A determinação do nível de ploidia, por meio da técnica de citometria de fluxo, é obtida pela comparação do conteúdo de DNA de uma planta padrão com nível de ploidia conhecido com o conteúdo de DNA de uma planta que se deseja conhecer o nível de ploidia. Essa técnica é promissora, pois permite a análise de grande número de indivíduos de modo rápido e prático (PIO, 2008).

Dolezel, Greilhuber e Suda (2007), destacam inúmeros usos da citometria de fluxo em plantas como: expressão gênica, detecção de metabólitos secundários, identificação de híbridos somáticos e de transferência de DNA, detecção de aneuploidia, identificação do sexo em plantas dióicas, estudo do ciclo celular e endopoliploidia, composição da cromatina, conteúdo de bases, estudo e detecção de patógenos em plantas, entre outros. No entanto, a maior

aplicação dessa ferramenta em plantas, atualmente, é para análises de ploidia e estimativas do conteúdo de DNA nuclear.

2.4.2.2 Contagem de cromossomos

As análises citogenéticas podem trazer contribuições no sentido de aumentar a eficiência de trabalhos de melhoramento. Essas pesquisas têm contribuído para o estudo da evolução, principalmente porque os cromossomos constituem o próprio material genético, o que os torna significativos para o rumo evolutivo das espécies. Cada cromossomo ou par de cromossomos representa um papel decisivo no desenvolvimento de um indivíduo. Nesse contexto, o número cromossômico é um dos parâmetros utilizados para a caracterização citológica de uma espécie que, aliado a outros caracteres citológicos, fornece informações para o entendimento das alterações genéticas envolvidas (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006).

Quando o objetivo é analisar o número e a morfologia cromossômica, os agentes antimitóticos apresentam vantagens no pré-tratamento do material, pois, bloqueiam o ciclo mitótico em metáfase, acarretando em acúmulo de células nesse estágio. Também provocam maior contração cromossômica, permitindo visualizar melhor as constrições primárias e secundárias, definindo melhor a morfologia cromossômica e produzem maior espalhamento cromossômico, em razão da destruição ou inibição das fibras do fuso acromático (GUERRA; SOUZA, 2002).

2.4.2.3 Anatomia foliar

A distinção entre plantas diplóides e poliplóides pode ser verificada, também, com base na caracterização anatômica e morfológica, como espessura

do limbo foliar, tamanho de células e análise do tamanho e densidade de estômatos. Sendo a análise estomática a mais citada na literatura (LACERDA et al., 2008; PIO, 2008).

Segundo Castro, Pereira e Paiva (2009), o número de estômatos por unidade de área epidérmica é bastante variável entre as espécies e, até mesmo, entre indivíduos da mesma espécie, dependendo das condições ambientais. Portanto, deve-se ter bastante critério durante as análises, já que diversos fatores podem influenciar na estrutura celular.

REFERÊNCIAS

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2006.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. van. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 63, p. 147-173, Dec. 2011.

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 593-609, 1990.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2004. 279 p.

BORGES, A. N. et al. **Sistema de produção de bananeira irrigada**. Petrolina: EMBRAPA Semiárido, 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/index.htm>>. Acesso em: 27 mar. 2012.

CARVALHO, J. F. R.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixaorellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 69-75, Jan. 2005.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CASTRO, M. E. A.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. Primeiro relato de ocorrência da Sigatoka-negra em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 668-672, dez. 2005.

CRUZ, A. J. de S. **Crescimento e produção de genótipos de bananeira sob diferentes lâminas de irrigação**. 2012. 136 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2012.

D'HONT, A. et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, London, v. 488, p. 213-217, Aug. 2012.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: _____. **Flow cytometry with plant cells analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: Wiley, 2007. p. 41-66.

DONATO, S. L. R. et al. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.), em dois ciclos de produção no sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 139-144, abr. 2006.

DUMET, D. et al. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 14, n. 4, p. 243-250, 1993.

FARIA, H. C. de et al. Avaliação fitotécnica de bananeiras tipo terra sob irrigação em condições semi-áridas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 830-836, jul./ago. 2010.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 623-38, abr. 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **World food and agriculture**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D. W. Growth and development of ovules of banana, plantain and enset (*Musaceae*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 104, n. 4, p. 463-478, May 2005.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 191 p.

GUIMARÃES, N. C. C. et al. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras 'Prata Anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 448-454, mar./abr. 2009.

HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DOOD, W. A. *In vitro* induction of banana autotetraploid by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 40, n. 6, p. 887-896, 1992.

ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 287-295.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

JESUS, O. N. de et al. Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in *ex situ* conservation. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, n. 1, p. 41-48, Mar. 2013.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 16, p. 323-329, Nov. 2006.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 385 p.

LACERDA, G. A. et al. Características morfoanatômicas da epiderme foliar de plantas variantes e não variantes somaclonais de bananeiras (*Musa* sp. Colla cv. Prata-anã) cultivadas *in vitro*. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 85-90, jan./mar. 2008.

LOON, L. C. van. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Dec. 1997.

MATOS, L. A. **Caracterização de acessos de bananeira**. 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

MORAES, W. **Curso de identificação, monitoramento e controle da Sigatoka Negra**. Registro: APTA Regional do Vale do Ribeira, 2008.

NOGUEIRA, E. M. de C. **Principais doenças da bananeira**. São Paulo: Instituto Biológico, 2009. 20 p.

NSABIMANA, A.; STADEN, J. van. Ploidy investigation of bananas (*Musa* spp.) from the National Banana Germplasm Collection at Rubona-Rwanda by flow cytometry. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 2, p. 302-305, May 2006.

OSELEBE, H. O. et al. Ploidy and genome segregation in *Musa* breeding populations assessed by flow cytometry and randomly amplified polymorphic DNA markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 6, p. 780-786, Nov. 2006.

PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1278-1285, jul. 2012.

PIMENTEL, R. M. A. et al. Qualidade pós-colheita dos genótipos de banana PA42-44 e Prata-anã cultivados no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 407-413, jun. 2010.

PIO, L. A. S. **Indução e identificação de poliploidia em bananeira (*Musa acuminata*, Colla)**. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

RIBEIRO, R. C. F. et al. Efeito de diferentes lâminas de irrigação sobre a população de *Meloidogyne javanica* e a produtividade de bananeira no norte de minas gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 90-95, mar. 2009.

RODRIGUES, M. G. V. et al. Amostragem foliar da bananeira 'Prata- Anã'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 321-325, mar. 2010.

RODRIGUES, M. G. V.; SOUTO, R. F.; SILVA, S. de O. Avaliação de genótipos de bananeira sob irrigação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 444-448, dez. 2006.

ROUX, N. et al. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 5, p. 483-490, Jan. 2003.

ROUX, N. S. et al. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutant in *Musa* spp. In: JAIN, S. M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular, biology, and induced mutations**. New Hampshire: Science. 2004. p. 33-43.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J. R.; BOLLAMMA, K. T. Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 39, n. 6, p. 551-556, Nov./Dec. 2003.

SANTOS, R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.

SANTOS-SEREJO, J. A. et al. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v. 1, p. 10-23.

SENA, J. V. C. Aspectos da produção e mercado da banana no Nordeste. **Informe Rural Etene**, Fortaleza, ano 5, n. 10, jul. 2011.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Estudo de mercado: banana**. Brasília, 2008. Disponível em: <[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8E2336FF6093AD96832574DC0045023C/\\$File/NT0003904A.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8E2336FF6093AD96832574DC0045023C/$File/NT0003904A.pdf)>. Acesso em: 30 jan. 2013.

SILVA, S. de O. e et al. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do mal-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 137-143, mar. 2011.

SILVA, S. de O. e; MORAIS, L. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. Melhoramento genético de bananeira para resistência a doenças. In: ROMÃO, R. L.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais no Estado da Bahia**. Feira de Santana: UEFS, 2005. p. 49-67.

SINGH, H. P.; SELVARAJAN, S. U.; KARIHALOO, J. L. **Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific**. New Delhi: APCoAB/APAARI, 2011. 94 p.

SOUZA, I. de et al. Plantio irrigado de bananeiras resistentes à Sigatoka-negra consorciado com culturas anuais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 172-180, mar. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 1, p. 889-892, June 1989.

CAPÍTULO 2 Duplicação cromossômica de bananeira *in vitro* com colchicina

RESUMO

O melhoramento genético de bananeira pode ser feito por métodos convencionais ou com o uso de técnicas como a duplicação de cromossomos. Conduziu-se, este trabalho, com objetivo de verificar o efeito da colchicina na duplicação de cromossomos em explantes da bananeira 'Ouro', cultivar diploide (AA) que possui características importantes para o melhoramento genético. A colchicina foi utilizada nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹, sendo adicionadas no meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g de phytigel e pH ajustado para 6. As plantas foram colocadas no escuro por 2, 4, 8, 16 e 32 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5 (5 doses de colchicina e 5 períodos de exposição), perfazendo um total de 25 tratamentos com 26 repetições cada, totalizando 650 explantes. Por meio de análise em citometria de fluxo, observou-se que 379 (58,3%) explantes sobreviveram à indução da duplicação de cromossomos *in vitro*, especialmente nos tratamentos mais brandos. Foram obtidos 18 plantas tetraplóides (4,7%), 72 mixoplóides (19,1%), 5 plantas apresentaram conteúdo de DNA superior aos tetraplóides, (1,3%), 6 aneuplóides (1,6%) e 278 permaneceram diplóides (73,5%). O período de 2 e 4 dias foram os tratamentos que apresentaram maior número de plantas com material genético duplicado, não havendo diferença significativa entre as concentrações de colchicina.

Palavras-chave: Poliploidia. Cromossomos. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

The genetic improvement of banana can be done by conventional methods or with the use of techniques such as chromosome duplication. We conducted this work with the objective of verifying the effect of colchicine over the duplication of chromosomes in “Ouro” banana explants, diploid cultivar (AA) that presents important characteristics for genetic improvement. Colchicine was used in the concentrations of 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹, being added to the MS medium with 30 g L⁻¹ of sucrose, solidifying with 2 g of phytigel and pH adjusted to 6. The plants were placed in the dark for 2, 4, 8, 16 and 32 days. The experimental design was completely randomized, in a 5x5 factorial scheme (5 doses of colchicine and 5 exposure periods), in 25 treatments with 26 replicates each, totalizing 650 explants. By means of a flow cytometry analysis, we observed that 379 (58.3%) of the explants survived the induction of *in vitro* chromosome duplication, especially in the gentler treatments. We obtained 18 tetraploid plants (4.7%), 72 mixoploid (19.1%), 5 plants presented DNA content superior to the tetraploids (1.3%), 6 aneuploids (1.6%) and 278 remained diploids (73.5%). The periods of 2 and 4 days were the treatments that presented the higher number of plants with duplicated genetic material, having no significant difference between the concentrations of colchicine.

Keywords: Polyploidy. Chromosomes. Flow cytometry.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é líder quanto à produção de frutas tropicais, sendo a bananeira (*Musa* sp.) a frutífera tropical mais cultivada no território nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013). Embora exista número expressivo de cultivares de bananeira no Brasil, quando se considera preferência dos consumidores, porte adequado, resistência à seca, tolerância a doenças e pragas, restam poucas cultivares com potencial agrônomo para utilização comercial (DONATO et al., 2006; SOUZA et al., 2010).

A duplicação de cromossomos é uma ferramenta importante no melhoramento de bananeira, pois os tetraplóides gerados são usados para o cruzamento com diplóides elites, obtendo-se plantas triploides, com características superiores. A substância tradicionalmente empregada na indução de poliploidia em plantas é a colchicina. Esse agente antimitótico atua no processo de divisão celular, impedindo a formação da tubulina (que é um dos componentes das fibras do fuso mitótico) e, conseqüentemente, impossibilitando a separação das cromátides irmãs. Como resultado, tem-se uma duplicação do número de cromossomos por célula em cada processo mitótico na presença do inibidor (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

A duplicação cromossômica pode ser empregada *in vivo* e *in vitro*. A metodologia tradicional *in vitro* consiste em estabelecer os explantes, previamente tratados com colchicina, em tubos de ensaio em meio de cultura, sob condições de plena assepsia. Uma metodologia diferenciada pode ser obtida com o agente antimitótico adicionado, diretamente, no meio de cultura, em concentrações mais baixas e períodos de tempo maiores, visando a maior eficiência. A esterilização é um fator importante no processo de indução de poliploidia, portanto o meio de cultura é esterilizado, por meio de autoclavagem

e a substância antimetabólica, que é termolábil, é adicionada, posteriormente, por meio de filtração (PEREIRA et al., 2012; UNEMOTO et al., 2009).

Quanto ao método utilizado para confirmar a ploidia das plantas, têm-se a análise de citometria de fluxo, que possibilita a estimar a ploidia e a contagem do número de cromossomos, utilizada para confirmar a natureza poliploide.

A concentração e o tempo de contato do explante com o antimetabólico no método *in vitro* variam com a espécie estudada, portanto, é importante a elaboração de protocolos. A indução de poliploides com o uso da colchicina é pouco citado para a obtenção de poliploides de bananeira *in vitro* (DIAS; BARRETO, 2011). No entanto, a duplicação de cromossomos com metodologia diferenciada e eficiente poderá ser muito útil no melhoramento genético de bananeira. Objetivou-se, neste trabalho, desenvolver uma metodologia eficiente para a duplicação de cromossomos de bananeira ‘Ouro’ utilizando colchicina como agente antimetabólico, bem como avaliar o posterior desenvolvimento dos explantes tratados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micropropagação do material vegetal e tratamento com colchicina

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados explantes de bananeira ‘Ouro’ fornecidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, pré-estabelecidos *in vitro*

Meristemas apicais foram multiplicados *in vitro* por duas gerações, em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) para proliferação de brotações, as quais foram submetidas aos tratamentos com o antimitótico colchicina.

Na metodologia tradicional, o antimitótico é colocado em água e os explantes são colocados nessa solução concentrada por período curto. No presente trabalho, pretendeu-se obter uma metodologia diferente da tradicional, em que doses de colchicina foram adicionadas em meio de cultura em baixas concentrações por períodos mais longos, para tentar reduzir a mortalidade dos explantes e obter maior número de plantas tetraplóides.

A colchicina foi filtrada em filtro milipore de 45 µm e adicionada nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ em meio de cultura ainda morno, previamente autoclavado. O meio de cultura utilizado foi o MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g de phytigel e pH ajustado para 6,0. As plantas permaneceram nesse meio por 2, 4, 8, 16 e 32 dias no escuro, para não degradar a colchicina. Em seguida, as plantas foram transferidas para o mesmo tipo de meio de cultura, sem o antimitótico, por 30 dias em sala de crescimento com intensidade luminosa de 36 µMol M⁻² S⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Após esse período, foram realizadas as análises de citometria de fluxo e, posteriormente, as análises citogenéticas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5 (5 doses de colchicina e 5 períodos de exposição), num total de 25 tratamentos e 26 repetições, perfazendo um total de 650 explantes.

2.2 Identificação dos poliploides por citometria de fluxo

Para a determinação do conteúdo de DNA, discos foliares de 1cm de diâmetro, aproximadamente 20-30 mg, foram retirados do limbo foliar de plantas de bananeira e de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) e foram triturados em placa de Petri com o auxílio de uma lâmina de aço, contendo 1 mL de tampão Marie gelado para a liberação dos núcleos (DOLEZEL et al., 1998). A suspensão de núcleos foi aspirada, através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 µm (Figura 1).

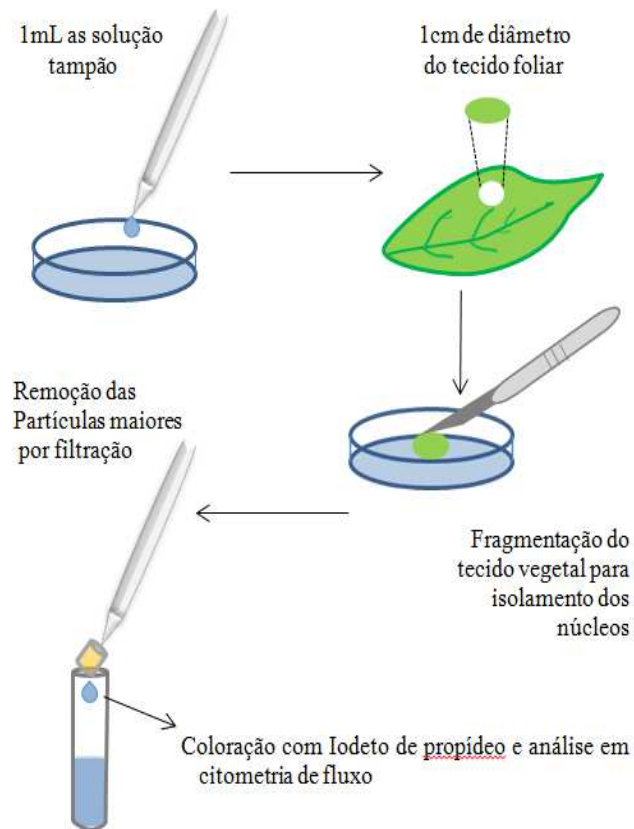


Figura 1 Preparo das amostras para análise do conteúdo de DNA em citometria de fluxo

Os núcleos foram corados pela adição de 25 μL de uma solução de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de iodeto de propídeo, para cada amostra. As amostras foram colocadas em recipiente com gelo e analisadas em um intervalo de 5 a 30 minutos após a preparação. Para cada amostra, 5 mil núcleos foram analisados, utilizando-se escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA) e os histogramas obtidos com o software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, 174 CA, USA) e

analisados, estatisticamente, no software WinMDI 2.8. (Scripps 43 Research Institute, 2011).

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado, utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*P. sativum*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se essa razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg).

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x5 e as médias de intensidade de fluorescência foram analisadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

2.3 Análise citogenética

Para a análise de ploidia, por meio de contagem cromossômica, raízes das plantas tetraploides, mixoplóides e diplóides selecionadas previamente pela análise de citometria foram pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína 500 mg L⁻¹ por 3 horas e fixadas em solução de Carnoy (3:1) por 24 horas. Posteriormente, as raízes foram lavadas três vezes em água deionizada, por períodos de 10 minutos e hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1 N a 60°C por 15 minutos.

A extração e a fragmentação dos meristemas foram feitas sob microscópio estereoscópio e a montagem da lâmina por esmagamento em ácido acético 45%. As lâminas foram secas ao ar e a retirada da lamínula foi feita com nitrogênio líquido. Em seguida, as lâminas foram imersas por 30 segundos em ácido acético 45% e coradas com Giemsa 10% por 5 minutos.

A observação e a análise das lâminas foram feitas com o uso de microscópio com câmera de captura de imagem, utilizando objetiva de aumento de 100 vezes (imersão em óleo).

2.4 Análise dos explantes em meio MS, após tratamento com colchicina

Após 150 dias, os explantes foram analisados para determinar o percentual de sobrevivência e a quantidade dos explantes que mostraram sinais de oxidação, paralisação e crescimento da parte aérea e senescência.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Citometria de fluxo

No presente trabalho, dos 650 explantes estabelecidos, 379 (58,3%) explantes sobreviveram à indução da duplicação de cromossomos *in vitro*, obtendo-se 18 (4,7%) tetraploides, 72 (19,1%) mixoploides, 5 (1,3%) plantas mixoploides com conteúdo de DNA superior aos tetraploides, 6 (1,6%) aneuplóides e 278 (73,5%) permaneceram com o genoma diploide (Tabela 1).

Os resultados da taxa de mortalidade obtidos revelaram que a colchicina apresentou maior toxicidade nos tratamentos com maior concentração do antimitótico (1,0, 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) (Tabela 2). Costa et al. (2011) também observaram uma redução na sobrevivência com o aumento da concentração da colchicina em ápices caulinares de bananeira *in vitro*, com maior intensidade a partir de 1,25 mmol L⁻¹. De forma semelhante, Duren et al. (1996) e Ganga e Chezhiyan (2002) obtiveram uma redução da sobrevivência em diploides de bananeira nos tratamentos com colchicina nas concentrações de 2,5 a 10 mmol L⁻¹.

Tabela 1 Número total de plantas classificadas como aneuplóides (Ane.), diploides (Dip.), tetraploides (Tet.), mixoplóides com DNA superior ao tetraploide (Sup.) e mixoplóides (Mix.), obtidas do tratamento com colchicina em diferentes doses e período de exposição

Tratamentos		Características avaliadas									
Colch.	Dias	Ane.		Dip.		Tet.		Sup.		Mix.	
		(un)	(%)	(un)	(%)	(un)	(%)	(un)	(%)	(un)	(%)
0	2	0	0,0	26	9,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	4	0	0,0	26	9,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	8	0	0,0	26	9,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	16	0	0,0	25	9,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
	32	3	50,0	13	4,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
0,5	2	0	0,0	4	1,4	2	11,1	1	20,0	16	22,2
	4	0	0,0	4	1,4	5	27,8	0	0,0	12	16,7
	8	0	0,0	1	0,4	0	0,0	0	0,0	7	9,7
	16	0	0,0	17	6,1	1	5,6	0	0,0	2	2,8
	32	0	0,0	8	2,9	0	0,0	1	20,0	1	1,4
1,0	2	0	0,0	11	4,0	2	11,1	0	0,0	4	5,6
	4	0	0,0	5	1,8	1	5,6	0	0,0	1	1,4
	8	0	0,0	6	2,2	0	0,0	1	20,0	0	0,0
	16	0	0,0	8	2,9	1	5,6	0	0,0	3	4,2
	32	0	0,0	15	5,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
1,5	2	0	0,0	7	2,5	2	11,1	0	0,0	8	11,1
	4	0	0,0	5	1,8	0	0,0	0	0,0	4	5,6
	8	0	0,0	2	0,7	0	0,0	0	0,0	6	8,3
	16	1	16,7	18	6,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	32	0	0,0	11	4,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
2,0	2	0	0,0	6	2,2	3	16,7	0	0,0	2	2,8
	4	2	33,3	5	1,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	8	0	0,0	4	1,4	0	0,0	0	0,0	2	2,8
	16	0	0,0	14	5,0	1	5,6	1	20,0	1	1,4
	32	0	0,0	11	4,0	0	0,0	1	20,0	1	1,4
TOTAL		6	100	278	100	18	100	5	100	72	100

Tabela 2 Número total de plantas com desenvolvimento pleno (D.P.) e interrompido (D.I.), oxidadas (Ox.), sobreviventes (Sobrev.) e mortas, submetidas ao tratamento com colchicina em diferentes doses e período de exposição

Tratamentos		Características avaliadas									
Colch.	Dias	D. P.		D. I.		Ox.		Sobrev.		Mortas	
		(un)	(%)	(un)	(%)	(un)	(%)	(un)	(%)	(un)	(%)
0	2	26	11,3	0	0,0	0	0,0	26	14,4	0	0,0
	4	25	10,9	1	0,2	2	0,5	23	12,8	3	0,6
	8	26	11,3	0	0,0	1	0,3	19	10,6	7	1,5
	16	26	11,3	0	0,0	0	0,0	22	12,2	4	0,9
	32	19	8,3	7	1,7	20	5,3	9	5,0	17	3,6
0,5	2	24	10,4	2	0,5	2	0,5	24	13,3	2	0,4
	4	17	7,4	9	2,1	10	2,7	14	7,8	12	2,6
	8	5	2,2	21	5,0	14	3,7	5	2,8	21	4,5
	16	4	1,7	22	5,2	13	3,5	5	2,8	21	4,5
	32	2	0,9	24	5,7	21	5,6	1	0,6	25	5,3
1,0	2	9	3,9	17	4,0	17	4,5	9	5,0	17	3,6
	4	26	11,3	0	0,0	21	5,6	3	1,7	23	4,9
	8	1	0,4	25	6,0	17	4,5	1	0,6	25	5,3
	16	0	0,0	26	6,2	26	6,9	0	0,0	26	5,5
	32	2	0,9	24	5,7	10	2,7	0	0,0	26	5,5
1,5	2	10	4,3	16	3,8	14	3,7	11	6,1	15	3,2
	4	0	0,0	26	6,2	26	6,9	0	0,0	26	5,5
	8	1	0,4	25	6,0	24	6,4	1	0,6	25	5,3
	16	0	0,0	26	6,2	24	6,4	0	0,0	26	5,5
	32	0	0,0	26	6,2	0	0,0	0	0,0	26	5,5
2,0	2	7	3,0	19	4,5	19	5,1	7	3,9	19	4,0
	4	0	0,0	26	6,2	24	6,4	0	0,0	26	5,5
	8	0	0,0	26	6,2	24	6,4	0	0,0	26	5,5
	16	0	0,0	26	6,2	26	6,9	0	0,0	26	5,5
	32	0	0,0	26	6,2	20	5,3	0	0,0	26	5,5
TOTAL		230	100	420	100	375	100	180	100	470	100

A colchicina é um alcalóide que impede a formação das fibras do fuso na metáfase, não ocorrendo a anáfase, assim, a célula não entra no processo de divisão, conseqüentemente, a inibição da separação dos cromossomos resultará em células com complemento cromossômico duplicado no próximo ciclo mitótico.

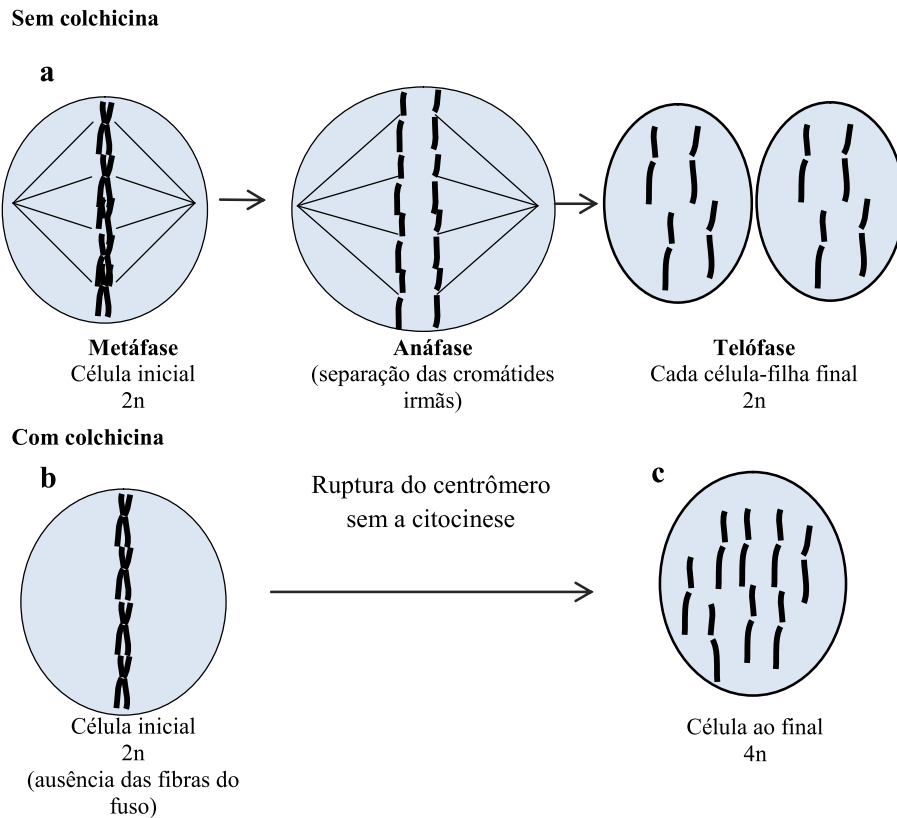


Figura 2 Ação da colchicina na divisão celular: (a) ciclo mitótico normal; (b) indução da duplicação cromossômica; (c) metáfase mitótica após indução de ploidia em bananeira 'Ouro'. Barra=10 μ m

O conhecimento do número de cromossomos, ou do nível de ploidia, além de importantíssimo para a caracterização do germoplasma é de grande utilidade para os trabalhos de melhoramento genético da bananeira. As análises obtidas por citometria de fluxo apresentaram agilidade e precisão suficiente para diferir as plantas tetraplóides das diplóides e para identificar plantas mixoplóides, que continham células tetraplóides e diplóides no mesmo tecido. A quantidade de DNA é expressa em picogramas (pg), 10-12 pg ou em mega pares

de bases de nucleotídeos (Mb= 106 pares de bases), sendo que 1 pg corresponde a 965 Mb (SCHIFINO-WITTMANN, 2001; WU; MOONEY, 2002).

Neste trabalho, por meio das análises de citometria, foram identificadas plantas com vários níveis de ploidia, situados em uma ampla faixa de variação do conteúdo de DNA, sendo observadas plantas aneuplóides, diplóides, mixoplóides, tetraplóides e mixoplóides com quantidade de DNA superior aos tetraplóides. Esses últimos se diferenciam dos outros mixoplóides, porque tiveram conteúdo de DNA muito superior, provavelmente, em decorrência da duplicação do complemento cromossômico por mais de uma vez. (Tabela 3).

Tabela 3 Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo, com diferentes níveis de ploidia

Genoma	Índice de DNA (pg)
Aneuplóides	0,535 – 0,620
Diploides	0,640 – 1,235
Mixoploides	1,240 – 1,655
Tetraploides	1,690 – 2,060
Mixoploides acima dos tetraploides	2,500 – 2,800

Os valores de conteúdo de DNA obtidos no experimento foram divididos conforme sua ploidia, da seguinte forma: a amplitude de variação do conteúdo de DNA dos diplóides foram obtidos com base nas testemunhas (que não sofreram tratamentos com a colchicina). As plantas aneuplóides foram consideradas aquelas cujos conteúdos de DNA foram mais baixos que os diplóides. As plantas mixoplóides, tetraplóides e mixoplóides com conteúdo de DNA acima dos tetraplóides foram separadas com base em contagem cromossômica de amostragens dessas plantas.

Na Figura 3, observam-se os histogramas de cada genoma obtidos por meio da análise em citometria de fluxo.

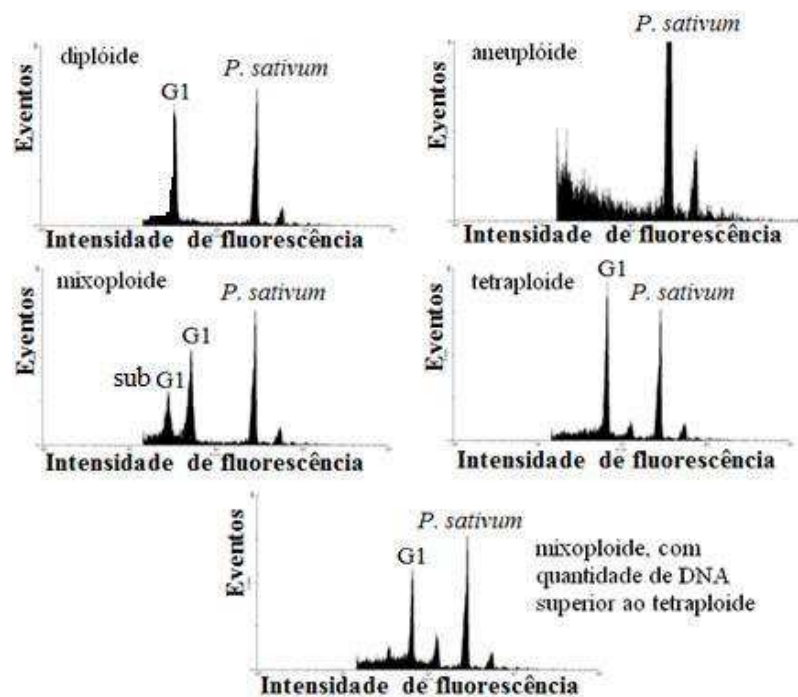


Figura 3 Histogramas de citometria de fluxo para quantificação do conteúdo de DNA de amostras de folhas de plantas de bananeira cultivar Ouro submetidas a tratamentos de duplicação cromossômica

Em todos os histogramas da Figura 3, foi possível observar pico (s) à esquerda, que equivalem à amostra de folhas de bananeira e um pico à direita que equivale ao padrão de referência interno (Ervilha – *Pisum sativum*) que foi utilizado para calcular a quantidade de DNA das amostras analisadas.

No histograma obtido de uma planta diplóide (representando a testemunha) pode ser observado pouco conteúdo de DNA, pois quanto menos DNA, mais o pico tende à esquerda no histograma. Isso se deve ao fato de que o iodeto de propídeo, é um corante intercalante das bases do DNA, sendo assim, quanto menos DNA presente no genoma, menor será a quantidade de iodeto que se intercala nas bases e menor será a intensidade de fluorescência detectada pelo

citômetro de fluxo. Já, no histograma da planta aneuplóides (células com falta ou adição de um ou poucos cromossomos) é possível observar uma série de pequenos picos, o que significa que houve muita variação no conteúdo de DNA. No histograma de uma planta mixoplóides é possível observar 2 picos, o G1 (na posição diplóide) e um outro pequeno pico na posição sub G1 (anterior ao pico G1 do diplóide) representado no histograma, evidenciando duas ploidias distintas. Isso significa que parte das células da planta sofreu duplicação cromossômica e outra parte permaneceu diplóide. Isso se deve ao fato de que o antimitótico só age nas fibras do fuso, ou seja, só em células que estão em divisão. Nesse caso, apenas uma parte das células teve seus cromossomos duplicados e a planta apresentou dois níveis de ploidia (células diploides e tetraploides) em um mesmo tecido. Não é possível dizer que houve sucesso na duplicação, pois a mixoploidia e também a aneuploidia não são úteis para trabalhos de melhoramento genético, visto que a meiose será irregular.

No histograma de uma planta tetraploide, é possível observar um pico fino, considerando que a espessura do pico representa o coeficiente de variação (cv) e quanto mais fino mais baixo é o cv, logo os resultados para tetraploides foram bastante confiáveis, apresentando valores menores que 1%. Por meio da estimativa da quantidade de DNA da amostra, observou-se que esta apresentou aproximadamente o dobro do DNA da planta diplóide. Nesse exemplo, considera-se que houve duplicação cromossômica e a planta apresentou apenas células tetraplóides, sem o aparecimento de mixoploidia.

No último histograma, observa-se que a quantidade de DNA da amostra apresentava-se superior ao da planta tetraplóide. Esse fato pode ser decorrente das anomalias cromossômicas, durante o ciclo celular, em que as algumas células podem ter dobrado seu genoma mais de uma vez, em razão do longo período de exposição ao agente antimitótico.

Não houve diferença significativa entre as médias obtidas nos tratamentos para a obtenção de plantas aneuplóides (Figuras 4 e 5). Os aneuplóides caracterizam-se pela falta ou excesso de cromossomos no mesmo genoma. São classificados como: nulissômicos ($2n - 2$), onde há falta de dois cromossomos não homólogos; monossômicos ($2n - 1$) onde há falta de somente um cromossomo, e polissômicos. Os polissômicos se dividem em trissômicos ($2n + 1$) onde há excesso de um cromossomo presente no genoma; tetrassômicos ($2n + 2$) com dois cromossomos a mais e o duplo-trissômicos ($2n + 2 + 2$) que possuem excesso de dois cromossomos diferentes (ALLARD, 1960; RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008). Em plantas diploides, a falta de homologia de um cromossomo resulta em inviabilidade.

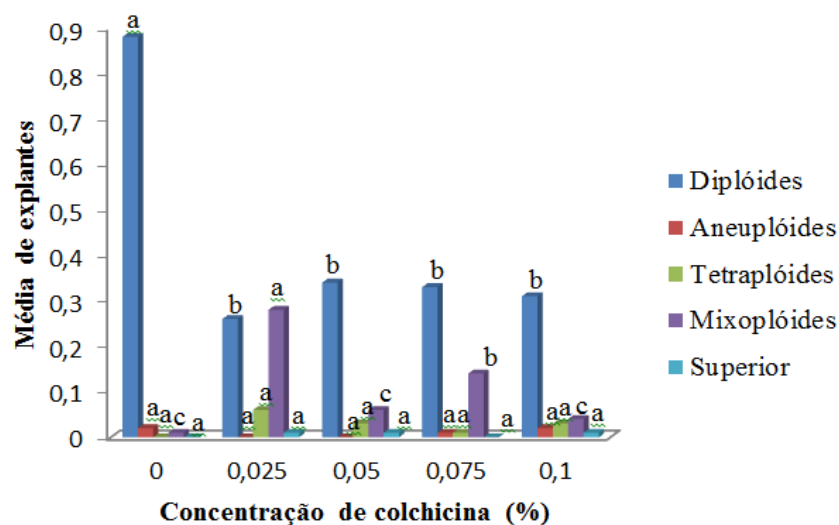


Figura 4 Ploidias distribuídas em diferentes concentrações de colchicina. Médias com mesma letra, em colunas de mesma cor, pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

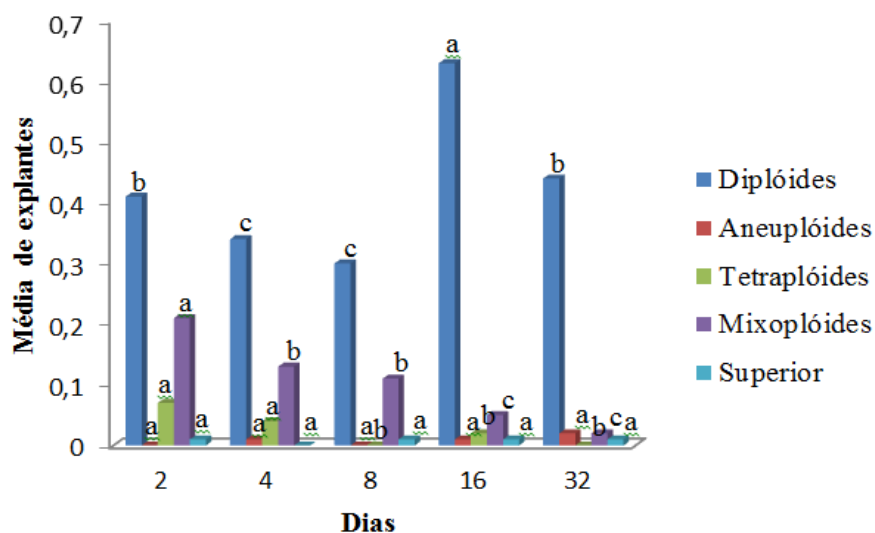


Figura 5 Ploidias distribuídas em diferentes períodos de exposição a colchicina. Médias com mesma letra, em colunas de mesma cor, pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Ocorreu uma relação inversamente proporcional entre o número de plantas mixoplóides e o tempo de exposição do material ao tratamento com o antimitótico (Figura 5). Ascough, Staden e Erwin (2008), ao estudarem o efeito da colchicina na indução de poliploides em *Watsonia lepida* N.E. Brown por 0, 24, 28 e 72 horas, observaram que o tratamento que mais produziu mixoplóides foi o menor tempo de exposição à colchicina (24 h).

Observou-se, também, neste trabalho, a presença de mixoplóides no tratamento sem adição de colchicina no meio (Figura 4). No entanto, esses valores foram muito baixos e apareceram nos últimos períodos de exposição analisados. Mesmo assim, isso demonstra que a cultivar Ouro tem baixa estabilidade genética, sendo que a própria micropropagação pode alterar o DNA das plantas. Por outro lado, a simples propagação *in vitro* também pode ser uma

ferramenta potencial para obtenção de plantas poliploides (SILVA; CALLEGARI-JACQUES; BODANESE-ZANETTINI, 2000).

Os métodos de indução de autotetraplóides pela adição de colchicina, geralmente resultam em plantas quiméricas, contendo setores autotetraplóides instáveis, pelo fato de o tratamento com o agente antimitótico ser eficaz apenas quando aplicado em tecidos que contenham células em divisão. A estabilização desses setores e a obtenção de plantas completamente tetraploides, muitas vezes só é alcançada após a realização de propagações vegetativas ou sexuais, da planta quimérica (GMITTER et al., 1991; WAKANA et al., 2005; WU; MOONEY, 2002).

A maior porcentagem de tetraploides ocorreu na concentração de colchicina 0,025%, em quatro dias de exposição ao antimitótico (27,8%). Contudo, as concentrações de colchicina de 0,025%, 0,05%, 0,075% e 0,1% aos dois dias de tratamento, obtiveram 50% da produção total de tetraploides (Tabela 1). Dessa forma, as maiores médias de obtenção de material duplicado ocorreram em um período reduzido de tempo (Figura 6). Tang et al. (2010), obtiveram um melhor resultado em termos de produção de brotos tetraplóides *in vitro* de *Paulownia tomentosa* no período de tratamento de 48 horas com 0,05% de colchicina.

Alguns experimentos *in vitro* para indução de tetraplóides estão obtendo sucesso com o período de exposição à colchicina cada vez menor. Assim, Gantait et al. (2011) obtiveram maior quantidade de tetraploides, em plantas de *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella, durante o período de exposição de 8 horas, na concentração de 0,1% de colchicina. Outro exemplo pode ser observado no trabalho de Chen et al. (2011), que observaram maior indução de poliplóides com 0,3% de colchicina por 5 horas. A redução no tempo de exposição favorece maior taxa de sobrevivência, em razão do alto teor tóxico da colchicina. Entretanto, algumas espécies apresentam maior exigência de tempo para

duplicação, como relatado por Wang e Lei (2012), que trabalhando com 10, 20 e 30 dias de exposição, obtiveram uma taxa de indução mais eficaz em *Clivia miniata* Regel, durante 20 dias, no tratamento com colchicina a 0,03%.

No presente estudo, não houve diferença significativa entre as concentrações de colchicina utilizadas na obtenção de plantas tetraplóides (Figura 4). Nesse caso, recomenda-se a dosagem de 0,025%, por ser mais branda para o explante e, também, por utilizar pouca quantidade de reagente, há diminuição do custo, já que a colchicina é cara.

3.2 Contagem de cromossomos

As análises citogenéticas podem trazer grandes contribuições no sentido de aumentar a eficiência de trabalhos de melhoramento. Essas pesquisas têm contribuído para o estudo da evolução, principalmente porque os cromossomos constituem o próprio material genético, o que os torna de grande interesse com relação ao processo evolutivo das espécies. Cada cromossomo ou par de cromossomos representa papel decisivo no desenvolvimento de um indivíduo. Nesse contexto, o número cromossômico é um dos parâmetros utilizados para a caracterização citológica de uma espécie que, aliados a outros caracteres citológicos, fornecem informações para o entendimento das alterações genéticas envolvidas (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006).

Foram analisadas células meristemáticas de pontas de raízes de bananeira 'Ouro' tratadas com colchicina *in vitro*. Os resultados comprovaram aqueles obtidos pelas análises realizadas em citômetro de fluxo (Figura 6).

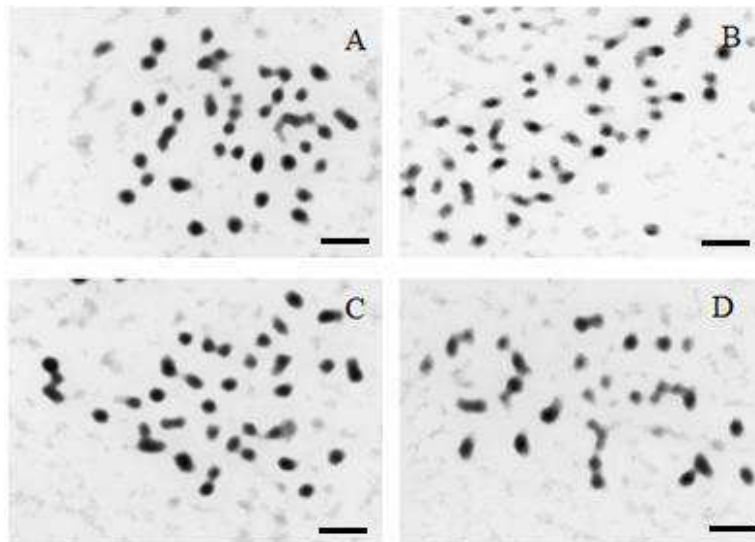


Figura 6 Metáfase de células de bananeiras tetraplóides com 44 cromossomos (A e B) e mixoplóides com 39 (C) e 25 (D) cromossomos. Barra de 50 px

Essas contagens de cromossomos foram importantes para definir os limites de conteúdo de DNA obtidos por citometria de fluxo. Dessa forma, os indivíduos que apresentavam 1,240 – 1,655 pg de DNA foram classificados como mixoplóides, enquanto aqueles que apresentaram de 1,690 – 2,060 pg foram classificados como tetraplóides (Tabela 3).

3.3 Sobrevivência e crescimento dos explantes no meio MS

Após a determinação da concentração de colchicina, a ser utilizada na duplicação, avaliou-se o desenvolvimento dos explantes nos diferentes períodos e concentrações da substância, após 150 dias do início do experimento. As variáveis analisadas foram: desenvolvimento pleno e paralisado da parte aérea, oxidação e mortalidade (Figura 7).



Figura 7 Explantes tratados com colchicina, após 150 dias, em desenvolvimento pleno (1), com o desenvolvimento interrompido (2), sem vida (3) e oxidado (4)

Não houve contaminação nos meios de cultura, assim, os explantes se mantiveram saudáveis. No entanto, apresentaram sintomas de oxidação, principalmente nos meios com as maiores concentrações de colchicina, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (23,4%) e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (30,1%) (Figura 8). Já, os explantes que passaram menor tempo em contato com o antimitótico (dois dias) tiveram menor taxa de oxidação (13,8%) (Tabela 4).

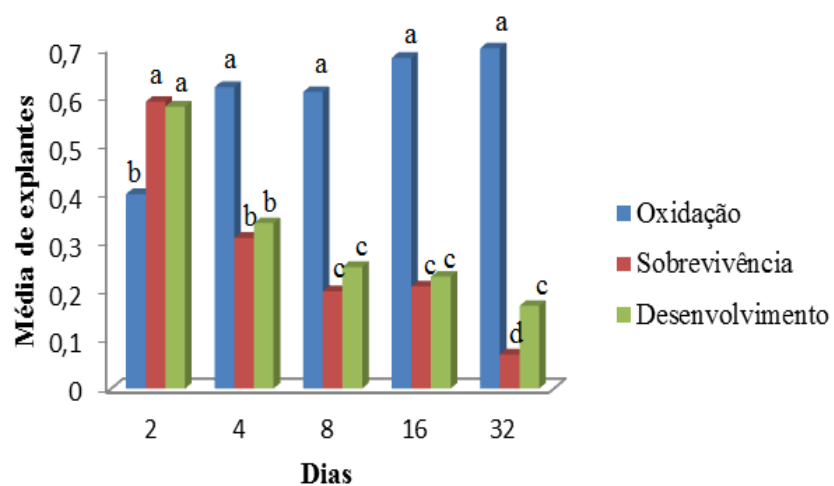


Figura 8 Médias de ocorrência de oxidação, sobrevivência e desenvolvimento dos explantes, distribuídas em diferentes períodos de exposição a colchicina. Médias com mesma letra, em colunas de mesma cor, pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Tabela 4 Média das plantas classificadas como tetraploides, mixoplóides com quantidade de DNA superior ao tetraploide, diploides, mixoploides, aneuplóides e a taxa de mortalidade de bananeira 'Ouro' submetidas a duplicação de cromossomos

	Colchicina %	Tempo (dias)					Média
		2	4	8	16	32	
Tetrap.	0	0,00aA	0,00bA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00A
	0,025	0,08aB	0,19aA	0,00aB	0,04aB	0,00aB	0,06A
	0,05	0,08aA	0,04bA	0,00aA	0,04aA	0,00aA	0,03A
	0,075	0,08aA	0,00bA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,01A
	0,1	0,11aA	0,00bB	0,00aB	0,04aB	0,00aB	0,03A
	Média	0,07A	0,04A	0,00B	0,02B	0,00B	
Sup. ao tetrap.	0	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00A
	0,025	0,04aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,04aA	0,01A
	0,05	0,00aA	0,00aA	0,04aA	0,00aA	0,00aA	0,01A
	0,075	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00A
	0,1	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,04aA	0,04aA	0,01A
	Média	0,01A	0,00A	0,01A	0,01A	0,01A	
Dipl.	0	0,96aA	1,0aA	1,0aA	0,96aA	0,50aB	0,88A
	0,025	0,15bB	0,15bB	0,04bB	0,65bA	0,31aB	0,26B
	0,05	0,42bA	0,19bB	0,23bB	0,31dB	0,58aA	0,34B
	0,075	0,27bA	0,19bA	0,08bA	0,69bA	0,42aB	0,33B
	0,1	0,23bB	0,19bB	0,15bB	0,54cA	0,42aA	0,31B
	Média	0,41B	0,34C	0,30C	0,63A	0,44B	
Mixopl.	0	0,00cA	0,00bA	0,00bA	0,04aA	0,00aA	0,01C
	0,025	0,53aA	0,46aA	0,27aB	0,08aB	0,38aB	0,28A
	0,05	0,15bA	0,04bA	0,00bA	0,11aA	0,00aA	0,06C
	0,075	0,27bA	0,15bA	0,23aA	0,00aB	0,04aB	0,14B
	0,1	0,08cA	0,00bA	0,08bA	0,04aA	0,04aA	0,04C
	Média	0,21A	0,13B	0,11B	0,05C	0,02C	
Aneupl.	0	0,00aB	0,00bB	0,00aB	0,00aB	0,11aA	0,02A
	0,025	0,00aA	0,00bA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00A
	0,05	0,00aA	0,00bA	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00A
	0,075	0,00aA	0,00bA	0,00aA	0,04aA	0,00aA	0,01A
	0,1	0,00aB	0,08aA	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,01A
	Média	0,00A	0,01A	0,00A	0,01A	0,02A	
mortalid.	0	0,00bB	0,00bB	0,00bB	0,00cB	0,38aA	0,08C
	0,025	0,19bB	0,19bB	0,69aA	0,23bB	0,61aA	0,38B
	0,05	0,34aB	0,73aA	0,73aA	0,54aB	0,42aB	0,55A
	0,075	0,34aB	0,65aA	0,69aA	0,27bB	0,54aA	0,50A
	0,1	0,58aB	0,73aA	0,77aA	0,34bB	0,50aB	0,58A
	Média	0,29B	0,46A	0,58A	0,28B	0,49A	

* Médias seguidas pela mesma letra em minúsculo na coluna e em maiúsculo na linha pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

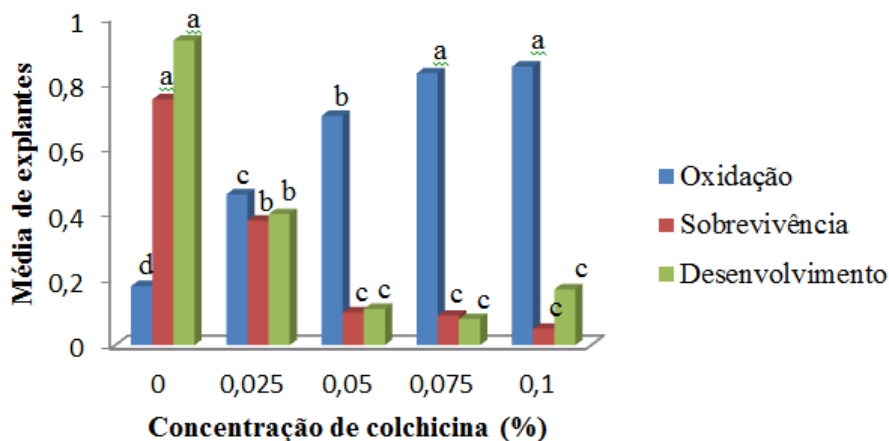


Figura 9 Médias de ocorrência de oxidação, sobrevivência e desenvolvimento dos explantes, distribuídas em diferentes concentrações de colchicina. Médias com mesma letra, em colunas de mesma cor, pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Nas tabelas 4 e 5, observa-se que os explantes que não foram tratados com colchicina apresentaram maior taxa de sobrevivência (55,0%). E, dentre os que foram tratados com o antimetabólito, observou-se que a menor concentração ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) utilizada resultou em maior taxa de sobrevivência (27,3%), comparado às concentrações mais altas de colchicina $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (7,3%), $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (6,7%) e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (3,9%). Com dois dias de tratamento, foram obtidos 42,7% de sobrevivência, 22,3% para período de quatro dias e 14,6; 15,0 e 5,6% para os períodos de 8, 16 e 32 dias de exposição à colchicina, respectivamente, ou seja, houve diminuição da porcentagem de sobrevivência em relação ao aumento do tempo de exposição ao antimetabólito.

Tabela 5 Média das plantas com desenvolvimento pleno e interrompido, oxidadas, sobreviventes e mortas, submetidas ao tratamento com colchicina em diferentes doses e período de exposição

	%	Tempo (dias)					Média
		2	4	8	16	32	
Desenv. pleno	0	1,00aA	0,96aA	1,00aA	1,00aA	0,73aB	0,93A
	0,025	0,92aA	0,65bB	0,19bC	0,15bC	0,08bC	0,40B
	0,05	0,34bA	0,11cB	0,04aB	0,00bB	0,08bB	0,11C
	0,075	0,38bA	0,00cB	0,04aB	0,00bB	0,00bB	0,08C
	0,1	0,27bA	0,00cB	0,00aB	0,00bB	0,00bB	0,05C
	Média	0,58A	0,34B	0,25C	0,23C	0,17C	
Desenv. Inter.	0	0,00bB	0,04cB	0,00cB	0,00bB	0,27bA	0,06C
	0,025	0,08bC	0,34bB	0,81bA	0,84aA	0,92aA	0,60B
	0,05	0,65aB	0,88aA	0,96aA	1,00aA	0,92aA	0,88A
	0,075	0,58aB	1,00aA	0,96aA	1,00aA	1,00aA	0,91A
	0,1	0,73aB	1,00aA	1,00aA	1,00aA	1,00aA	0,94A
	Média	0,41C	0,65B	0,74A	0,77A	0,82A	
Oxidad.	0	0,00bB	0,08cB	0,04cB	0,00cB	0,77aA	0,18D
	0,025	0,08bC	0,38bB	0,53bB	0,50bB	0,81aA	0,46C
	0,05	0,65aB	0,81cA	0,65bB	1,00aA	0,38bC	0,70B
	0,075	0,54aC	1,00cA	0,92aA	0,92aA	0,77aA	0,83A
	0,1	0,73aB	0,84cB	0,92aA	1,00aA	0,77aB	0,85A
	Média	0,40B	0,62A	0,61A	0,68A	0,70A	
	0	1,00aA	0,88aA	0,73aB	0,84aA	0,31aC	0,75A
	0,025	0,92aA	0,54bB	0,19bC	0,19bC	0,04bC	0,38B
	0,05	0,34bA	0,11cB	0,04bB	0,00cB	0,00bB	0,10C
	0,075	0,42bA	0,00cB	0,04bB	0,00cB	0,00bB	0,09C
	0,1	0,27bA	0,00cB	0,00bB	0,00cB	0,00bB	0,05C
	Média	0,59A	0,31B	0,20C	0,21C	0,07D	

* Médias seguidas pela mesma letra em minúsculo na coluna e em maiúsculo na linha pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Diversos autores (ASCOUGH; STADEN; ERWIN, 2008; DHOOGHE et al., 2011; LONE et al., 2010) observaram que a duplicação de cromossomos depende de vários fatores, tais como, tipo de explante, agente, concentração e tempo de exposição ao antimetabólico. A concentração e duração do tratamento que apresenta efeito altamente letal (baixa sobrevivência) pode ser vantajoso, pois reduz o número de plantas diplóides e mixoplóides, quando o alvo é produzir tetraplóides (VÄINÖLA; REPO, 2001). Entretanto, a elevada taxa de mortalidade comumente observada em plantas tratadas com colchicina pode ser entrave para os melhoristas. Vichiato et al. (2007), trabalhando com colchicina a

0,05% e 0,1% por 24, 48, 72 e 96 horas em orquídea *Dendrobium nobile* Lindl, obtiveram uma taxa de sobrevivência de 100%, possivelmente, esse resultado está relacionado à resistência da espécie a atuação do antimetabólito.

Com base nos resultados deste trabalho, observou-se que, com exceção da testemunha, a concentração que obteve maior porcentagem de sobrevivência foi a de 0,5 mg L⁻¹, no período de dois dias de exposição. As menores médias foram obtidas nas concentrações superiores a 0,5 mg L⁻¹ e nos períodos acima de dois dias de exposição ao antimetabólito (Tabela 5). Lone et al. (2010) observaram uma menor taxa de sobrevivência no tratamento com colchicina na concentração de 1 mg L⁻¹ no período de 72 horas de exposição. A colchicina como agente indutor de poliploidia em cultura de plantas *in vitro* tem suas limitações, pois, em elevadas concentrações ou tratamentos muito prolongados, torna-se muito tóxica para os tecidos vegetais (HAMILL; SMITH; DODD, 1992).

Para a variável desenvolvimento pleno, as plantas que não foram tratadas com colchicina apresentaram as maiores médias 0,93 (53,1%). As plantas que passaram por tratamento com colchicina pelos períodos de 8, 16 e 32 dias foram as que apresentaram menores médias de 0,25 (14,3%), 0,23 (13,0%) e 0,17 (10,1%) (Tabelas 4 e 5).

Unemoto et al. (2009) relataram que as plantas de *Oncidium flexuosum* que não foram expostas à ação da colchicina, apresentaram médias superiores de altura da parte aérea, quando comparadas às plantas que foram expostas ao tratamento com o alcaloide. Além disso, os autores observaram que o crescimento da altura das plantas e o número de raízes formadas era inversamente proporcional ao período de exposição à colchicina, demonstrando que o desenvolvimento foi afetado com o aumento do tempo de exposição à colchicina.

No presente trabalho foi obtida uma metodologia eficiente para duplicação cromossômica *in vitro* de bananeira 'Ouro'. Quando o antimetabólito

foi aplicado ao meio de cultura houve maior eficiência do processo, com maior número de tetraplóides e menor índice de mortalidade das plantas na concentração e no período de tempo ideais.

4 CONCLUSÕES

- a) Recomenda-se, para a duplicação de cromossomos *in vitro* de bananeira 'Ouro' a adição de colchicina, na concentração de 0,025% diretamente no meio de cultura MS por um período de tempo de dois e quatro dias;
- b) A ocorrência de oxidação, mortalidade e comprometimento no desenvolvimento dos explantes é proporcional ao aumento da concentração e exposição do material vegetal ao antimitótico colchicina.

REFERÊNCIAS

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: E. Blücher, 1960. 381 p.

ASCOUGH, G. D.; STADEN, J. van; ERWIN, J. E. Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepidota* NE Brown. **HortScience**, Alexandria, v. 43, n. 7, p. 2248-2251, Dec. 2008.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2006.

CHEN, C. et al. Induction of *Anthurium andraeanum* “Arizona” tetraploid by colchicine *in vitro*. **Euphytica**, Wageningen, v. 181, n. 2, p. 137-145, Sept. 2011.

COSTA, F. H. S. et al. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 805-813, ago. 2011.

DHOOGHE, E. et al. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 104, n. 3, p. 359-373, Mar. 2011.

DIAS, J. do S. A.; BARRETO, M. C. (Ed.). **Aspectos agronômicos, fitopatológicos e socioeconômicos da sigatoka-negra na cultura da bananeira no Estado do Amapá**. Macapá: EMBRAPA Amapá, 2011. 95 p. 1 CD-ROM.

DOLEZEL, J. et al. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, p. 17-26, Sept. 1998.

DONATO, S. L. R. et al. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.), em dois ciclos de produção no sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 139-144, abr. 2006.

DUREN, M. van et al. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. **Euphytica**, Wageningen, v. 88, p. 25-34, Jan. 1996.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GANGA, M.; CHEZHIAN, N. Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 77, n. 5, p. 572-575, 2002.

GANTAIT, S. et al. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 485-493, Sept. 2011.

GMITTER, F. G. et al. Colchicine-induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. **Plant Science**, Shannon, v. 74, n. 1, p. 135-141, 1991.

HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DODD, W. A. In vitro induction of banana autotetraploid by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 40, n. 6, p. 887-896, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

LONE, A. B. et al. Sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya* (Orchidaceae). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 1337-1342, 2010.

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

PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1278-1285, jul. 2012.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. 4. ed. São Paulo: UFLA, 2008. 463 p.

SANTOS-SEREJO, J. A. et al. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v. 1, p. 10-23.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 897-902, set./out. 2001.

SILVA, P. A. K. X. D.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl.(*Orchidaceae*) by in vitro techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 105-111, jan./mar. 2000.

SOUZA, I. de et al. Plantio irrigado de bananeiras resistentes à Sigatoka-negra consorciado com culturas anuais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 172-180, mar. 2010.

TANG, Z. Q. et al. In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 213-220, Aug. 2010.

UNEMOTO, L. K. et al. Sobrevivência e diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum* submetidos a tratamento com ácido peracético e colchicina. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 503-508, 2009.

VÄINÖLÄ, A.; REPO, T. Polyploidisation of *rhododendron* cultivars *in vitro* and how it affects cold hardiness. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 560, p. 319-322, 2001.

VICHIATO, M. R. M. et al. Indução e identificação de tetraploides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 4, p. 385-390, out./dez. 2007.

WAKANA, A. et al. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicines. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, Fukuoka, v. 50, n. 1, p. 93-102, Feb. 2005.

WANG, C.; LEI, J. *In vitro* induction of tetraploids from immature embryos through colchicine treatments in *Clivia miniata* Regel. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 1, n. 5, p. 3712-3718, July 2012.

WU, J. H.; MOONEY, P. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* citrus somatic embryogenic callus treated with colchicines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 99-104, July 2002.

CAPÍTULO 3 Fontes de carbono na conservação *in vitro* de cultivares de bananeira

RESUMO

A conservação de germoplasma de bananeira *in vitro* apresenta vantagens em relação à conservação no campo, em razão da redução de perda desse material relacionado à fatores fitossanitários e climáticos, além da economia financeira na manutenção dos acessos. Neste trabalho, objetivou-se analisar o efeito de diferentes reguladores osmóticos (sacarose, sorbitol e manitol) na conservação *in vitro* de explantes das bananeiras Grande Naine, Preciosa e Princesa. Os reguladores osmóticos foram utilizados nas concentrações de 20 e 40 g L⁻¹, sendo adicionados no meio de cultura MS, solidificado com 2 g de phytigel e pH ajustado para 6. Os explantes permaneceram conservados *in vitro* por 160, 260 e 360 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3x2 (3 cultivares de bananeira, 3 fontes e 2 concentrações de carbono), perfazendo um total de 18 tratamentos com 10 repetições cada, totalizando 180 explantes para cada período de conservação. Em seguida, foram inoculados em meio de cultura MS sendo avaliada a capacidade responsiva das cultivares após 45 dias. Na presença do manitol, a maioria dos parâmetros avaliados apresentaram valores numéricos inferiores em relação às demais fontes de carbono na conservação *in vitro*, indicando eficiência no processo de conservação, já que a redução ou paralização do desenvolvimento do explante *in vitro* contribui no sentido de prolongar o período de tempo necessário na realização dos subcultivos. Entretanto, a capacidade responsiva dos explantes, após a conservação *in vitro* com manitol, foram inferiores aos demais tratamentos na maioria dos parâmetros observados. Sendo, portanto, o tratamento com 20mg/L de sorbitol o mais indicado, por ter apresentado resultados favoráveis, durante e após o processo de conservação. Já, os tratamentos com sacarose foram menos eficientes durante a conservação, embora tenham apresentado elevadas taxas de sobrevivência na retomada do crescimento.

Palavras-chave: Reguladores osmóticos. *Musa* sp. Crescimento mínimo.

ABSTRACT

Banana germoplasm *in vitro* conservation presents advantages in relation to field conservation due to the reduction of loss of this material regarding phytosanitary and climatic factors, in addition to financial economy in maintaining the accesses. In this work, we aimed at analyzing the effect of different osmotic regulators (sucrose, sorbitol and mannitol) in the *in vitro* conservation of Grande Naine, Preciosa and Princesa banana explants. The osmotic regulators were used in the concentrations of 20 and 40 g L⁻¹, being added to the MS culture medium, solidified with 2 g of phytigel and pH adjusted to 6. The explants remained conserved *in vitro* for 160, 260 and 360 days. The experimental design was completely randomized, in a 3x3x2 factorial scheme (3 banana cultivars, 3 sources and 2 concentrations of carbon), in 18 treatments with 10 replicates each, totalizing 180 explants for each conservation period. Subsequently, they were inoculated in MS culture medium evaluating the response capacity of the cultivars after 45 days. In the presence of mannitol, most evaluated parameters presented numeric values inferior in relation to the other sources of carbon in the *in vitro* conservation, indicating efficiency of the conservation process, since the reduction or suspension of explant development *in vitro* contributed in the sense of prolonging the period necessary for performing the sub-cultivations. However, the responsive capacity of the explants after the *in vitro* cultivation with mannitol were inferior to the other treatments in most observed parameters. Therefore, the treatment with 20 mg L⁻¹ of sorbitol was the most indicated for presenting favorable results during and after the conservation process. The treatments with sucrose were less effective during conservation, despite presenting elevated survival rates in resuming the growth.

Keywords: Osmotic regulators. *Musa* sp.. Minimum growth.

1 INTRODUÇÃO

A bananeira pertencente ao gênero *Musa* L., família *Musaceae* L., apesar de não ser de origem natural do Brasil se destaca como a fruta mais consumida no país (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2008). Embora exista um número expressivo de cultivares de banana no Brasil, quando se considera preferência dos consumidores, restam poucas cultivares com potencial agrônomo para utilização comercial (DONATO et al., 2006; SOUZA et al., 2010). Dentre as cultivares de bananeira que apresentam características favoráveis à comercialização, podemos citar a Grande Naine, Preciosa e Princesa.

A Grande Naine é uma cultivar triplóide AAA, pertence ao subgrupo Cavendish. Apresenta pseudocaule verde com manchas escuras, porte médio (2-3m) e cacho ligeiramente cônico. Os frutos são usados para exportação, caracterizando-se como longos, delgados, encurvados, com ápices arredondados, pedicelos curtos e polpa muito doce. Esta apresenta grande capacidade produtiva, obtendo rendimentos superiores às demais cultivares de exportação, além de apresentar resistência ao acamamento provocado pelo vento e ao mal-do-Panamá. Entretanto, é suscetível às Sigatocas amarela e negra, aos nematóides (principalmente *Radopholussimilis*) e à broca-do-rizoma (CORDEIRO, 2003; SILVA, 1995).

A cultivar Preciosa (PV42-85) é um tetraplóide do grupo AAAB, resultante do cruzamento da cultivar Pacovan (AAB) com o diplóide M53 (AA), criada pelo programa de melhoramento genético da bananeira, executado pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. As características agrônomicas foram avaliadas em diferentes ecossistemas, destacando-se o vigor das plantas e a produtividade superior à Pacovan. Os frutos, quando maduros, apresentam casca amarela, polpa de coloração creme e sabor doce, com baixa acidez. Diante de

sua comprovada resistência à Sigatoka amarela e negra e ao Mal-do-Panamá, a cultivar Preciosa constitui-se em excelente alternativa para o produtor, devendo atingir produtividade de até 50% superior à da cultivar Pacovan, da qual é originária. Quando cultivada sob irrigação e condições nutricionais adequadas, a produtividade deverá situar-se entre 35-40 t/ha (CORDEIRO et al., 2005).

O genótipo Princesa é um híbrido tetraplóide do grupo AAAB tipo maçã, resultante de cruzamento da cultivar Yangambi nº 2 com o híbrido diploide (AA) M53. Apresenta características, tanto de desenvolvimento quanto de produtividade, semelhantes ou superiores a cultivar Maçã. Consequentemente, possui uma boa aceitação no mercado, pois a banana maçã é uma das preferidas pelo consumidor, em razão do seu paladar. Outra vantagem é a tolerância ao mal-do-Panamá e resistência a Sigatoka-amarela. Essas doenças foram responsáveis pela diminuição do plantio da banana maçã em todo o país (LÉDO et al., 2008).

A maioria das cultivares de bananeira não produzem sementes, impossibilitando a sua conservação em um banco de sementes convencional, portanto, a manutenção de acessos de bananeira no campo é dispendiosa, além do risco de perda do material genético em decorrência das condições ambientais.

Dessa forma, a cultura de tecidos surge como um paliativo, principalmente para espécies propagadas vegetativamente, visto que esta envolve técnicas de propagação e conservação de germoplasma livre de riscos causados por fatores ambientais, possibilitando a manutenção das coleções *in vitro* (SANTOS et al., 2011).

A conservação de germoplasma *in vitro* consiste na alteração do ambiente de cultivo para desacelerar ou anular, totalmente, o crescimento das células, com o objetivo de aumentar ao máximo o intervalo de subcultivos e manter a integridade genética das espécies.

Dentre as principais técnicas para restringir o crescimento das plantas *in vitro* está na diminuição da temperatura, a redução das concentrações de sais do meio de cultura (MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010) e a utilização de agentes osmóticos. O uso de baixas temperaturas no cultivo *in vitro* reduz velocidade de reações químicas vitais das plantas, além de tornar as membranas mais rígidas, sendo necessária maior quantidade de energia para ativar processos bioquímicos (LARCHER, 2006). Os agentes osmóticos, tais como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993).

Considerando que cada espécie requer um protocolo específico para obtenção de sucesso na conservação *in vitro*, objetivou-se, neste trabalho, aprimorar o conhecimento na conservação *in vitro* de bananeira Grande Naine, Preciosa e Princesa, bem como avaliar o desempenho da cultura na retomada do crescimento, após o contato dos explantes com os reguladores de crescimento, manitol, sorbitol e sacarose, na conservação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados explantes de cultivares de bananeira, Grande Naine, Preciosa e Princesa, fornecidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, pré – estabelecidos *in vitro*.

2.1 Influências de diferentes concentrações e fontes de carbono na conservação *in vitro* das cultivares de bananeira, Grande Naine, Preciosa e Princesa

O material vegetal cedido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura foram transferidos para frascos de vidro (100 x 70mm) com 25mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementados com 30g L⁻¹ de sacarose e 4mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) para a proliferação de brotações, as quais foram submetidas aos tratamentos de conservação. Os explantes foram encubados em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C sob luminosidade de 22 mmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Os explantes de cada cultivar obtidos do subcultivo, anteriormente citado, foram uniformizados com 3cm de comprimento e incubados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 15 mL do meio de cultura MS suplementados com diferentes concentrações (20 e 40 g L⁻¹) de sacarose, sorbitol e manitol. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x3x2 (três cultivares, três fontes de carbono e duas concentrações de reguladores de crescimento), totalizando 18 tratamentos com 10 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um explante.

Os meios de cultura foram solidificados com 2g L⁻¹ de Phytigel® e o pH do meio ajustado para 6,0, utilizando-se KOH ou HCl 0,1N, antes da

autoclavagem à temperatura de 121°C. Os explantes foram incubados em câmara de crescimento (tipo BOD) com temperatura fixada em 17°C, fotoperíodo de 12/12 horas e luminância de 4000 lux fornecidas por lâmpadas brancas fria.

As avaliações foram realizadas aos 160, 260 e 360 dias, após a inoculação, analisando os seguintes parâmetros:

- a) **Comprimento da maior folha:** mensurado com o auxílio de régua graduada em centímetro, considerando-se a medida compreendida entre a extremidade da maior folha e a parte mediana do explante, 3 cm acima da base do caule;
- b) **Número total de folhas:** mensurado pela contagem das folhas individualmente;
- c) **Coloração das folhas:** foi atribuída uma escala de notas (1-folhas totalmente verdes, 2- folhas senescentes e 3 – folhas mortas);

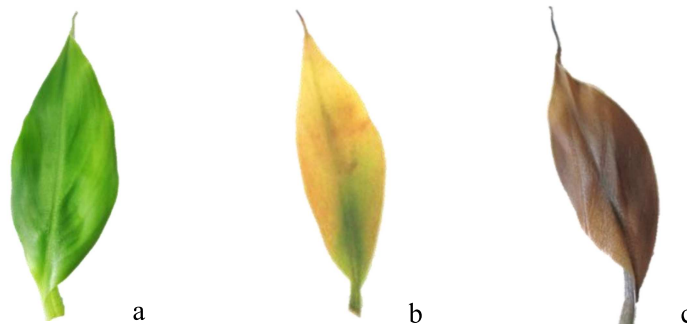


Figura 1 Folha verde (a), folhas senescentes (b) e folha morta (c)

- d) **Comprimento da maior raiz:** mensuradas com o auxílio de uma régua graduada em centímetro, considerando-se a medida

compreendida entre a base do explante e a extremidade da maior raiz;

- e) **Número total de raízes:** mensurado pela contagem de raízes individualmente;
- f) **Peso da matéria fresca das folhas e raízes:** as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio, em seguida foram lavadas em água corrente com o auxílio de uma peneira. Após o enxágue separou-se a parte aérea e sistema radicular, retirando-se o excesso de água com o auxílio de papel toalha, para, assim, fazer a pesagem em balança de precisão;
- g) **Peso da matéria seca das folhas e raízes:** acondicionadas em sacos de papel Kraft, a matéria fresca, foi levada para estufa dotada de sistema de circulação forçada e renovação de ar, na temperatura de 50°C, até atingir massa constante.

Levando-se em consideração que os explantes seriam posteriormente transferidos para o meio de cultura MS, as avaliações foram realizadas em câmara de fluxo, para evitar a contaminação do material vegetal. Portanto, as folhas e as raízes foram retiradas com o auxílio de um bisturi e acondicionadas em placas de Petri identificadas, levando-se em consideração o tamanho do explante (3cm). A padronização do explante foi realizada com o auxílio de uma etiqueta afixada no interior da câmara de fluxo.

As médias foram comparadas pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). Para a análise, os dados foram transformados pela equação $x + 1^{0,5}$ visando ao atendimento das pressuposições da análise de variância.

2.2 Capacidade responsiva das cultivares de bananeira, Grande Naine, Preciosa e Princesa, em meio MS

Explantes com 3 cm de comprimento, provindos das plantas submetidas aos meios de conservação, após 12 meses de cultivo, foram incubadas em meio de cultura MS, com 30 gL⁻¹ de sacarose, solidificado com 2g L⁻¹ de Phytigel[®] sendo o pH ajustado para 6,0 antes da autoclavagem. Foram colocados um explante por tubo de ensaio (25x150mm), em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2°C sob luminosidade de 22 mmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 x 2 (três cultivares x três fontes de carbono x duas concentrações de reguladores de crescimento, utilizadas na etapa da conservação), totalizando 18 tratamentos, sendo cada tratamento constituído de 10 repetições, cada tubo de ensaio com um explante.

Após 45 dias, foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento da maior folha, número total de folhas, coloração das folhas, comprimento da maior raiz, número total de raízes, peso da matéria fresca das folhas e raízes e o peso da matéria seca das folhas e raízes. Considerando-se a metodologia utilizada no item 1.

Para a comparação de médias, foi empregado o teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados obtidos da influência de diferentes concentrações e fontes de carbono na conservação *in vitro* das cultivares de bananeira Grande Naine, Preciosa e Princesa

A apreciação dos dados apresentados nas tabelas 1, 2 e 3 demonstram que as fontes de carbono tiveram influência significativa em todos os parâmetros avaliados.

As maiores médias foram obtidas nos tratamentos com sacarose, independente da espécie estudada. A sacarose no meio de cultura *in vitro* promove um maior desenvolvimento do explante, pois este é uma fonte de carbono prontamente disponível (SANTOS et al., 2011). Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento do explante (NEPOMUCENO et al., 2009).

Quanto às concentrações (20 e 40 g L⁻¹) de sacarose no meio os parâmetros comprimento da parte aérea e da raiz não apresentaram diferenças significativas nas cultivares Grande Naine e Princesa, com exceção da cultivar Preciosa que apresentou um decréscimo no comprimento da parte aérea com o aumento da concentração de sacarose no meio. Resultados equivalentes foram obtidos por Brito et al. (2011) na conservação *in vitro* de sempre viva (*Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *Mucugensis*), onde as plantas mantidas a 18°C não apresentaram diferenças significativas entre 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose para comprimento da parte aérea e raiz, sendo observada uma redução dessas variáveis com o aumento da concentração de sacarose para 45 e 60 g L⁻¹.

Levando-se em consideração que as respostas às condições de cultivo *in vitro* variam entre gêneros, espécies e, até mesmo plantas de mesmo genoma, a cultivar Preciosa apresentou-se mais suscetível ao aumento da concentração de sacarose em relação à comprimento da parte aérea. Esses resultados indicam que a sacarose, quando utilizada em altas concentrações, diminui o potencial hídrico do meio de cultura, o que inibe a absorção de água e nutrientes pelo explante, reduzindo o crescimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998; ENGELMANN, 1991). Silva et al. (2005), obtiveram médias superiores de crescimento de plantas de *Syngonanthus mucugensis* Giul. Sitientibus *in vitro* a 25°C em meio contendo 15g L⁻¹ de sacarose, comparado com às concentrações 20 e 30g L⁻¹.

Em contrapartida, aos resultados dos tratamentos com sacarose, o sorbitol e o manitol foram os reguladores osmóticos que proporcionaram as menores médias, sendo o manitol a fonte de carbono que proporcionou um menor crescimento dos explantes, principalmente para as cultivares Preciosa e Princesa. Brito et al. (2011) ao avaliarem o efeito dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol na conservação *in vitro* de brotos micropropagados de *S. mucugensis* subsp. *Mucugensis* também observaram menores médias nos tratamentos com a presença do carboidrato manitol.

Costa et al. (2012), trabalhando com diferentes concentrações (21,85mM, 43,82 mM e 87,64 mM) de sacarose e manitol na conservação de espécies de bromélias, observaram um menor crescimento da parte aérea e redução do teor de matéria seca nos tratamentos com a presença do manitol.

As cultivares estudadas também apresentaram um decréscimo no crescimento em função do aumento da concentração de sorbitol no meio. Igualmente observado no trabalho de Santos et al. (2011) no qual, utilizaram diferentes concentrações de sorbitol (10, 20 e 40 g L⁻¹) na conservação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e observaram uma desaceleração no crescimento com 20 g L⁻¹ de sorbitol e uma regressão linear negativa na

concentração de 40 g L⁻¹, provavelmente, em razão do efeito tóxico da alta concentração de sorbitol.

Faria et al. (2006) também observaram um menor crescimento em brotações de *Passiflora giberti* na utilização do sorbitol em relação à sacarose. E Flores et al. (2013) observaram menores taxas de crescimento na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hickenc com cultivadas somente com sorbitol, tendo a sacarose favorecido o crescimento das plantas mesmo nos tratamentos em combinação com sorbitol. Assim, como Santos et al. (2011) observaram menor crescimento *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira na ausência de sacarose e presença de sorbitol.

O sorbitol, normalmente, não é metabolizado pelas plantas. Este atua no meio, modificando o potencial osmótico, removendo o excesso de água intracelular, por gradiente osmótico e, assim, desacelerando o crescimento vegetal, mas dependendo da concentração ou da espécie em estudo o sorbitol pode ter efeito nocivo (SHIBLI et al., 2006).

Quanto ao número de raízes, observou-se um acréscimo nos tratamentos em que a sacarose estava diluída ao meio de cultura, comparado aos tratamentos com sorbitol e manitol. Os resultados não apresentaram diferença significativa com relação à concentração de sacarose utilizada, com exceção da cultivar Grande Naine que apresentou um decréscimo com o aumento da concentração. A redução da concentração de sacarose no meio vem sendo citada como benéfico na melhoria da qualidade do sistema radicular (NEPOMUCENO et al., 2009).

Em relação às concentrações das fontes estudadas, constata-se que as maiores médias foram obtidas na dosagem de 20 g L⁻¹ em todas as variáveis que apresentaram resultados significativos. Os solutos reduzem a energia livre da água por diluição desta (TAIZ; ZEIGER, 2009), influenciando o crescimento das plantas *in vitro*.

A cultivar Preciosa apresentou uma redução significativa do crescimento da parte aérea com o aumento das concentrações de sacarose, sorbitol e manitol. Shibli et al. (1999) obtiveram o mesmo resultado no crescimento de microbrotos de amêndoa amarga (*Amygdalus communis* L). Segundo Costa et al. (2012), a sacarose e o manitol, quando utilizados em concentrações elevadas, reduz o crescimento do explante *in vitro*, pois esses agentes diminuem o potencial hídrico do meio de cultura, inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante.

Tabela 1 Médias das variáveis comprimento das folhas (CF), comprimento das raízes (CR), número total de raízes (NTR), peso da matéria fresca das folhas (PFF), peso da matéria fresca das raízes (PFR), peso da matéria seca das folhas (PSF), peso da matéria seca das raízes (PSR), peso da matéria seca total (PST) e a relação parte aérea/raíz da cultivar Grande Naine, aos 12 meses de cultivo *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		CF (cm)	CR (cm)	NTR (unidade)	PFF (mg/planta)	PFR (mg/planta)	PSF (mg/planta)	PSR (mg/planta)	PST (mg)	PA/R
Sacarose	20	9,40a	9,63a	15,44a	10,14a	9,58a	2,63a	2,72a	5,35a	0,97
	40	9,67a	9,92a	12,24b	8,84b	9,45a	2,39a	2,72a	5,11a	0,88
Média		9,53A	9,78A	13,84A	9,50A	9,52A	2,51A	2,72A	5,23A	0,92
Sorbitol	20	4,63a	6,22a	6,19a	1,99a	1,74a	1,27a	1,56a	2,83a	0,81
	40	1,73b	3,07b	3,63b	1,00a	1,40a	1,00a	1,36a	2,36b	0,73
Média		3,18B	4,65B	4,91B	1,49B	1,57B	1,13B	1,46B	2,59B	0,77
Manitol	20	2,73a	4,42a	4,33a	1,04a	1,33a	1,00a	1,37a	2,37a	0,73
	40	2,82a	4,03a	4,11a	1,20b	1,04a	1,04a	1,00b	2,04b	1,04
Média		2,77B	4,23B	4,22B	1,12B	1,18B	1,02B	1,18C	2,20C	0,86
cv(%)		26,26	30,84	24,33	29,37	17,01	18,54	13,49	14,72	
Teste F		*	*	*	*	*	*	*	*	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 2 Médias das variáveis comprimento das folhas (CF), comprimento das raízes (CR), número total de raízes (NTR), peso da matéria fresca das folhas (PFF), peso da matéria fresca das raízes (PFR), peso da matéria seca das folhas (PSF), peso da matéria seca das raízes (PSR), peso da matéria seca total (PST) e relação parte aérea/raíz da cultivar Preciosa, aos 12 meses de cultivo *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		CF (cm)	CR (cm)	NTR (unidade)	PFF (mg/planta)	PFR (mg/planta)	PSF (mg/planta)	PSR (mg/planta)	PST (mg)	PA/R
Sacarose	20	11,30a	9,59a	10,03a	10,43a	10,26a	2,80a	2,66a	5,46a	1,05
	40	9,69b	10,60a	9,82a	7,28b	10,05a	2,07b	2,66a	4,73b	0,78
Média		10,49A	10,09A	9,92A	8,86A	10,15A	2,43A	2,66A	5,09A	0,91
Sorbitol	20	8,17a	8,21a	4,82a	6,17a	2,42a	2,02a	1,57a	3,59a	1,28
	40	2,86b	4,11b	2,21b	1,12b	1,84a	1,00b	1,04b	2,04b	0,96
Média		5,51B	6,16B	3,52B	3,65B	2,13B	1,51B	1,30B	2,81B	1,16
Manitol	20	3,98a	5,23a	3,49a	1,69a	1,36a	1,04a	1,00a	2,04a	1,04
	40	1,95b	2,71b	3,97a	1,08a	1,04a	1,00a	1,00a	2,00a	1,00
Média		2,97C	3,97C	3,73B	1,38C	1,20C	1,02C	1,00C	2,02C	1,02
cv(%)		26,26	30,84	24,33	29,37	17,01	18,54	13,49	14,72	
Teste F		*	*	*	*	*	*	*	*	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 3 Médias das variáveis comprimento das folhas (CF), comprimento das raízes (CR), número total de raízes (NTR), peso da matéria fresca das folhas (PFF), peso da matéria fresca das raízes (PFR), peso da matéria seca das folhas (PSF), peso da matéria seca das raízes (PSR), peso da matéria seca total (PST) e relação parte aérea/raíz. da cultivar Princesa, aos 12 meses de cultivo *in vitro*

Tratamentos		CF	CR	NTR	PFF	PFR	PSF	PSR	PST	PA/R
(g L ⁻¹)		(cm)	(cm)	(unidade)	(mg/planta)	(mg/planta)	(mg/planta)	(mg/planta)	(mg)	
Sacarose	20	10,50a	12,42a	11,60a	10,10a	10,63a	2,58a	2,92a	5,50a	0,88
	40	10,93a	10,61a	11,69a	10,50a	9,42b	2,68a	2,71b	5,39a	0,99
Média		10,71A	11,51A	11,65A	10,30A	10,03A	2,63A	2,82A	5,45A	0,93
Sorbitol	20	8,95a	5,88a	5,41a	4,91a	2,08a	1,69a	1,48a	3,17a	1,14
	40	3,53b	3,24b	3,89a	1,59b	1,59a	1,04b	1,32a	2,36b	0,79
Média		6,24B	4,57B	4,65B	3,25B	1,84B	1,36B	1,40B	2,76B	0,97
Manitol	20	3,81a	3,50a	2,86a	1,63a	1,35a	1,11a	1,00a	2,11a	1,11
	40	3,14a	2,02a	2,38a	1,29a	1,04a	1,07a	1,00a	2,07a	1,07
Média		3,48C	2,76C	2,62C	1,46C	1,20C	1,09C	1,00C	2,09C	1,09
cv(%)		26,26	30,84	24,33	29,37	17,01	18,54	13,49	14,72	
Teste F		*	*	*	*	*	*	*	*	*

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

O comprimento foliar variou, segundo a fonte de carbono utilizada, observando-se um decréscimo no comprimento da planta na presença de sorbitol e manitol no meio (Figura 2).

O sorbitol e manitol são açúcares, normalmente, não metabolizados pelas plantas e, por isso, são utilizados na redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (GEORGE, 1993). Portanto, esses agentes osmóticos alteram a disponibilidade de trocas gasosas, protegem as membranas celulares das baixas temperaturas, reduzindo a hipericidade e evitando a vitrificação (ENGELMAN, 1991).

Para as cultivares Preciosa e Princesa, o manitol apresentou-se mais eficiente, com relação à minimização no crescimento do explante, que o sorbitol para todas as variáveis apresentadas nas tabelas 2 e 3, com exceção do número de raízes da cultivar Preciosa.

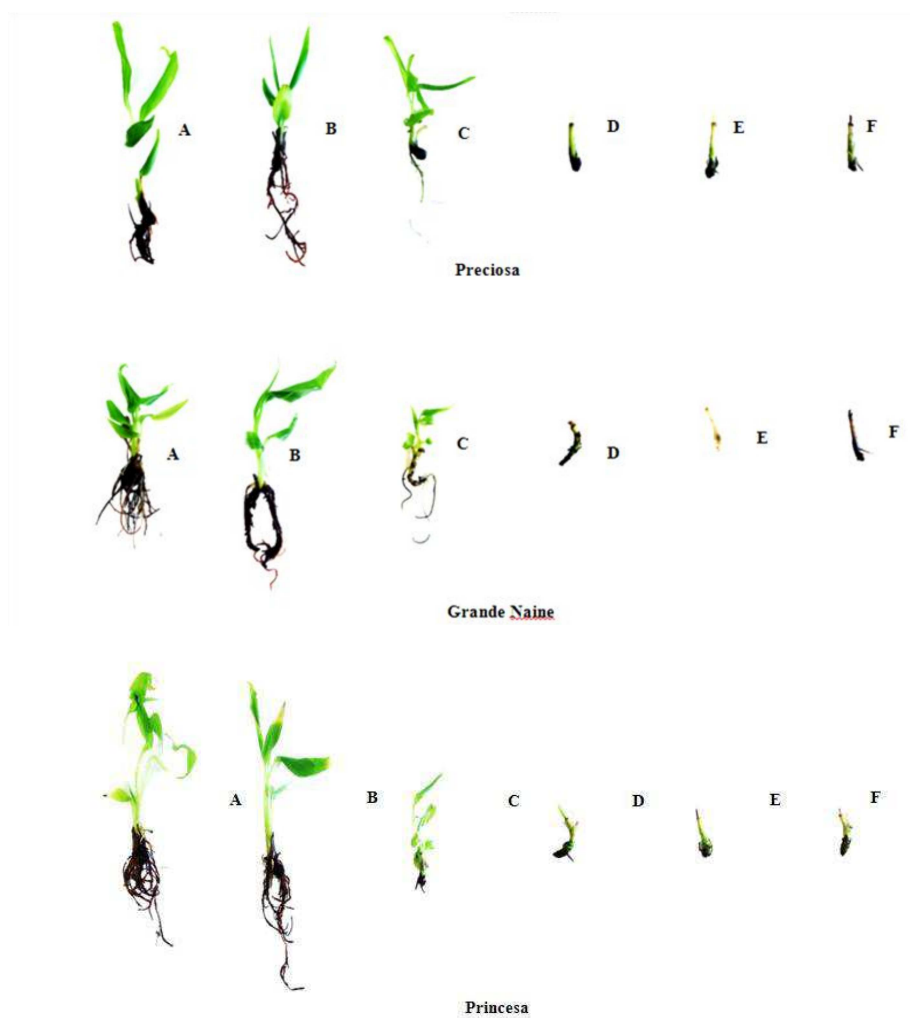


Figura 2 Aspectos morfológicos das cultivares de bananeira Preciosa, Grande Naine e Princesa após 365 dias de desenvolvimento em diferentes tratamentos de conservação *in vitro*

Legenda:

- (A) $\frac{1}{2}$ MS + 20g sacarose
- (B) $\frac{1}{2}$ MS + 40g sacarose
- (C) $\frac{1}{2}$ MS + 20g sorbitol
- (D) $\frac{1}{2}$ MS + 40g sorbitol
- (E) $\frac{1}{2}$ MS + 20g manitol
- (F) $\frac{1}{2}$ MS + 40g manitol

Com relação ao desempenho no crescimento da parte aérea das cultivares, durante os períodos de conservação estudados, também observa-se que houve um incremento mais acentuado com a utilização da sacarose no meio, seguido do sorbitol e manitol, em ordem decrescente (Figura 3).

Segundo Thorpe et al. (2008), o manitol e o sorbitol não são metabolizados pelos tecidos de algumas plantas, tornando-se, portanto, indisponíveis como fonte de carbono. Por essa razão, o manitol e sorbitol têm sido frequentemente empregados como agente modificador do potencial hídrico. Isso pode justificar o fato das maiores médias no crescimento da parte aérea terem sido observadas nos tratamentos com sacarose, fonte de carbono disponível.

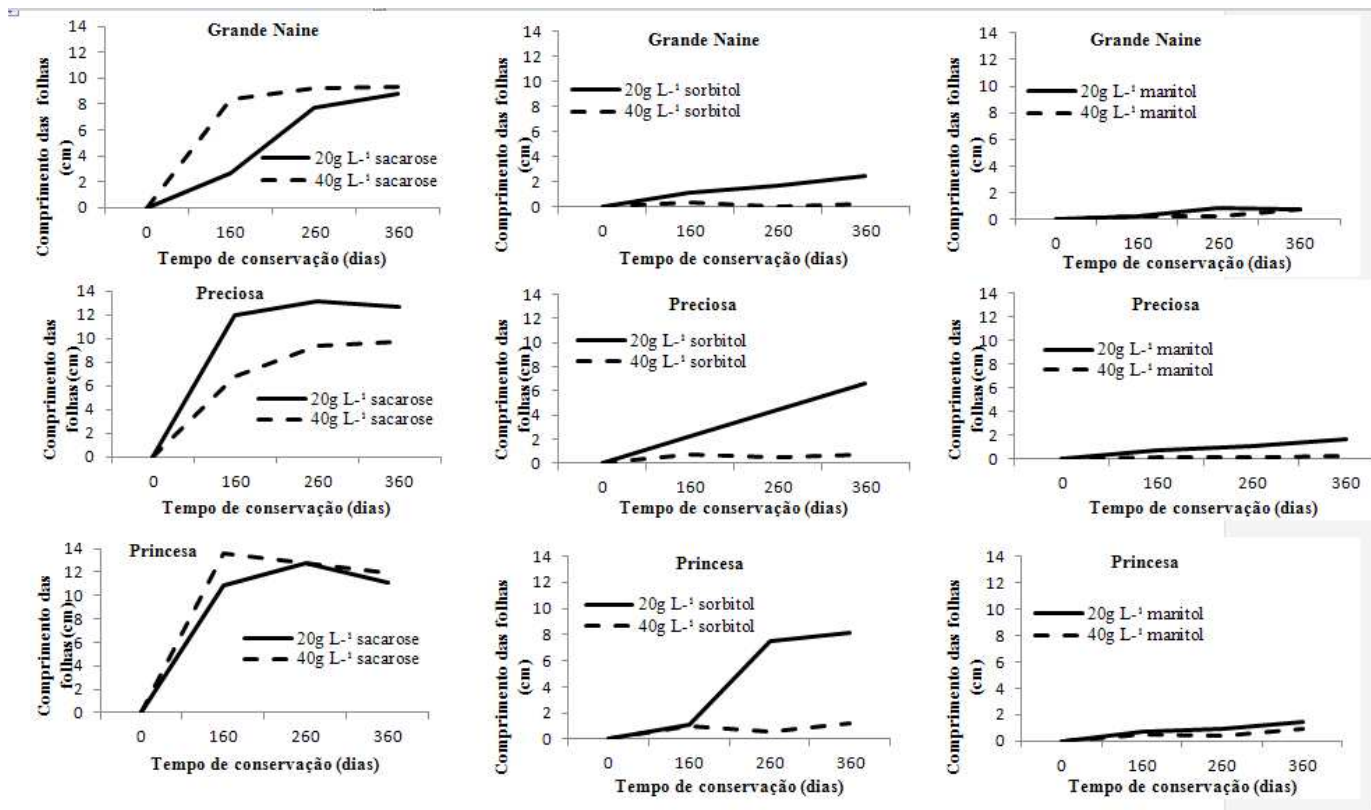


Figura 3 Desenvolvimento da parte aérea durante o período de conservação *in vitro*

As médias correspondentes ao número total de folhas e folhas com coloração verde foram significativas para todas as fontes estudadas, apresentando um incremento nos tratamentos com sacarose (Tabelas 4, 5 e 6). Costa et al. (2012) também obtiveram resultados semelhantes, comparando-se a sacarose com o manitol.

Para o número de folhas senescentes e mortas, não houve influência significativa das fontes de carbono nas cultivares Preciosa e Princesa. Em contrapartida, a sacarose influenciou de forma significativa a cultivar Grande Naine, possibilitando um maior número de folhas senescentes e mortas.

Tabela 4 Médias das variáveis número total de folhas (NTF), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de folhas mortas (NFM) da cultivar Grande Naine, aos 12 meses de cultivo *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		NTF (cm)	NFV (unidade)	NFS (unidade)	NFM (unidade)
Sacarose	20	5,89a	2,53a	1,44a	1,92a
	40	4,89b	2,22a	1,28a	1,39b
Média		5,40A	2,38A	1,36A	1,66A
Sorbitol	20	3,84a	1,55a	1,00a	1,29a
	40	3,37b	1,00b	1,00a	1,37a
Média		3,60B	1,27B	1,00B	1,33B
Manitol	20	3,37a	1,00a	1,00a	1,37a
	40	3,41a	1,00a	1,00a	1,41a
Média		3,39B	1,00C	1,00B	1,39B
cv(%)		23,98	21,86	17,13	26,84
Teste F		*	*	*	*

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 5 Médias das variáveis número total de folhas (NTF), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de folhas mortas (NMF) da cultivar Preciosa, aos 12 meses de cultivo *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		NTF (cm)	NFV (unidade)	NFS (unidade)	NFM (unidade)
Sacarose	20	4,95a	2,34a	1,15a	1,46a
	40	4,03b	1,98b	1,08a	1,24a
Média		4,63A	2,16A	1,12A	1,35A
Sorbitol	20	4,54a	2,19a	1,10a	1,25a
	40	3,40b	1,08b	1,04a	1,28a
Média		3,97B	1,63B	1,07A	1,27A
Manitol	20	3,43a	1,00a	1,00a	1,43a
	40	3,33a	1,00a	1,00a	1,33a
Média		3,38C	1,00C	1,00A	1,38A
cv(%)		23,98	21,86	17,13	26,84
Teste F		*	*	ns	ns

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 6 Médias das variáveis número total de folhas (NTF), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de folhas mortas (NFM) da cultivar Princesa, aos 12 meses de cultivo *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		NTF (cm)	NFV (unidade)	NFS (unidade)	NFM (unidade)
Sacarose	20	5,15a	2,21a	1,11a	1,83a
	40	4,37b	1,87b	1,11a	1,39b
Média		4,76A	2,04A	1,11A	1,61A
Sorbitol	20	4,75a	2,16a	1,08a	1,51a
	40	3,62b	1,11b	1,11a	1,40a
Média		4,20B	1,64B	1,10A	1,46A
Manitol	20	3,46a	1,00a	1,00a	1,46a
	40	3,41a	1,00a	1,00a	1,41a
Média		3,44C	1,00B	1,00A	1,44A
cv(%)		23,98	21,86	17,13	26,84
Teste F		*	*	ns	ns

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Os tratamentos com concentrações de sacarose apresentaram elevadas taxas de sobrevivência (Tabela 7). Santos, Arrigoni-Blank e Blank (2012) ao analisarem o efeito da sacarose, manitol e sorbitol na conservação de vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) observaram as melhores taxas de sobrevivência (75%) nos tratamentos que continham apenas sacarose.

Observa-se, também, que a percentagem de explantes viáveis nos tratamentos com 20 g L⁻¹ de sorbitol foram iguais aos meios com 20 g L⁻¹ de sacarose. E na dosagem de 40 g L⁻¹ de sorbitol houve um decréscimo na taxa de sobrevivência.

Tabela 7 Porcentagem de explantes viáveis (PEV), média de explantes viáveis (MEV), aos 12 meses de conservação *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)	Grande Naine		Preciosa		Princesa		
	PEV (%)	MEV (unidade)	PEV (%)	MEV (unidade)	PEV (%)	MEV (unidade)	
Sacarose	20	90	0,90a	100	1,00a	100	1,00a
	40	100	1,00a	70	0,70a	100	1,00a
Média			0,95A		0,85A		1,00A
Sorbitol	20	90	0,90a	100	1,00a	100	1,00a
	40	20	0,20b	60	0,60b	80	0,80a
Média			0,55B		0,80A		0,90A
Manitol	20	60	0,60a	80	0,80a	90	0,90a
	40	80	0,80a	20	0,20b	90	0,90a
Média			0,70A		0,50B		0,90A
Teste F			*		*		ns

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

3.2 Capacidade responsiva das cultivares de bananeira Grande Naine, Preciosa e Princesa, em meio MS

Em relação à retomada do crescimento dos explantes em meio MS após a conservação, observou-se que as fontes apresentaram influência significativa em todas as variáveis analisadas, independentemente da cultivar.

Os explantes provindos do meio de conservação com sacarose apresentaram uma capacidade responsiva superior às demais fontes de carbono, com exceção ao número total de raízes da cultivar Princesa que não apresentou diferença significativa.

O manitol apresentou as maiores médias na concentração 20g L⁻¹ em todas as variáveis analisadas dos explantes da cultivar Preciosa.

Tabela 8 Médias das variáveis comprimento das folhas (CF), comprimento das raízes (CR), número total de raízes (NTR), peso da matéria fresca das folhas (PFF), peso da matéria fresca das raízes (PFR), peso da matéria seca das folhas (PSF), peso da matéria seca das raízes (PSR), peso da matéria seca total (PST) e a relação parte aérea/raíz da cultivar Grande Naine, em meio MS após 12 meses de conservação *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		CF (cm)	CR (cm)	NTR (unidade)	PFF (mg/planta)	PFR (mg/planta)	PSF (mg/planta)	PSR (mg/planta)	PST (mg)	PA/R
Sacarose	20	3,60a	2,82b	2,83a	10,47b	4,15b	2,66b	1,94b	4,6b	1,37
	40	3,93a	3,42a	3,09a	13,79a	6,09a	3,11a	2,21a	5,32a	1,41
Média		3,77A	3,12A	2,96A	12,13A	5,12A	2,89A	2,07A	4,96A	1,39
Sorbitol	20	2,97a	3,17a	2,18a	6,82a	2,50a	1,98a	1,68a	3,66a	1,18
	40	1,97b	2,45b	1,99a	2,21b	1,73a	1,37b	1,41b	2,78b	0,97
Média		2,47B	2,81B	2,09B	4,52B	2,11B	1,68B	1,55B	3,23B	1,08
Manitol	20	1,00b	2,83a	2,00a	1,00b	3,00a	1,00b	1,73a	2,73a	0,58
	40	2,83a	2,65a	2,22a	3,74a	1,97a	1,41a	1,41b	2,82a	1,00
Média		1,91C	2,74B	2,11B	2,37C	2,48B	1,20C	1,57B	2,77B	0,76
cv(%)		14,56	14,14	13,38	24,86	33,95	14,51	15,85	15,59	
Teste F		*	*	*	*	*	*	*	*	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 9 Médias das variáveis comprimento das folhas (CF), comprimento das raízes (CR), número total de raízes (NTR), peso da matéria fresca das folhas (PFF), peso da matéria fresca das raízes (PFR), peso da matéria seca das folhas (PSF), peso da matéria seca das raízes (PSR), peso da matéria seca total (PST) e relação parte aérea/raíz da cultivar Preciosa, em meio MS após 12 meses de conservação *in vitro*.

Tratamentos (g L ⁻¹)		CF (cm)	CR (cm)	NTR (unidade)	PFF (mg/planta)	PFR (mg/planta)	PSF (mg/planta)	PSR (mg/planta)	PST (mg)	PA/R
Sacarose	20	4,44a	3,51a	2,80a	13,12a	5,52b	3,09a	2,16a	5,25a	1,43
	40	4,25a	3,50a	3,07a	13,12a	6,81a	3,01a	2,29a	5,30a	1,31
Média		4,34A	3,50A	2,93A	13,12A	6,17A	3,05A	2,22A	5,27A	1,37
Sorbitol	20	4,01a	2,94b	2,19a	9,16a	3,70a	2,39a	1,71a	4,10a	1,40
	40	3,57b	3,48a	2,45a	8,06a	3,87a	2,28a	1,74a	4,02a	1,31
Média		3,79B	3,21B	2,32B	8,61B	3,78B	2,34B	1,72B	4,06B	1,36
Manitol	20	3,61a	3,30a	2,63a	7,48a	4,34a	2,27a	1,70a	3,97a	1,33
	40	2,67b	2,66b	2,21b	3,98b	1,97b	1,72b	1,37b	3,09b	1,25
Média		3,14C	2,98B	2,42B	5,73C	3,15B	1,99C	1,53C	3,52C	1,30
cv(%)		14,56	14,14	13,38	24,86	33,95	14,51	15,85	15,59	
Teste F		*	*	*	*	*	*	*	*	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 10 Médias das variáveis comprimento das folhas (CF), comprimento das raízes (CR), número total de raízes (NTR), peso da matéria fresca das folhas (PFF), peso da matéria fresca das raízes (PFR), peso da matéria seca das folhas (PSF), peso da matéria seca das raízes (PSR), peso da matéria seca total (PST) e relação parte aérea/raíz. da cultivar Princesa, em meio MS após 12 meses de conservação *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		CF (cm)	CR (cm)	NTR (unidade)	PFF (mg/planta)	PFR (mg/planta)	PSF (mg/planta)	PSR (mg/planta)	PST (mg)	PA/R
Sacarose	20	4,16a	2,99a	2,87a	12,27a	5,26a	2,93a	1,90b	4,83a	1,54
	40	4,34a	2,73a	3,11a	13,66a	6,18a	3,01a	2,23a	5,24a	1,35
Média		4,24A	2,86A	2,99A	12,97A	5,72A	2,98A	2,07A	5,05A	1,44
Sorbitol	20	3,67a	2,49a	2,61b	8,31a	2,97b	2,12a	1,54b	3,66a	1,37
	40	3,57a	2,70a	3,00a	8,01a	4,22a	2,23a	1,84a	4,07a	1,21
Média		3,62B	2,60B	2,80A	8,16B	3,60B	2,18B	1,69B	3,87B	1,29
Manitol	20	3,31a	2,84a	2,44a	5,37a	3,05a	1,76a	1,44a	3,20a	1,22
	40	2,86b	2,31b	2,20a	4,31a	2,03a	1,59a	1,33a	2,92a	1,19
Média		3,09C	2,57B	2,32B	4,84C	2,54C	1,67C	1,39C	3,06C	1,20
cv(%)		14,56	14,14	13,38	24,86	33,95	14,51	15,85	15,59	
Teste F		*	*	*	*	*	*	*	*	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Nos explantes oriundos de tratamentos com a sacarose, a coloração das folhas apresentaram maiores médias na coloração verde, mantendo o mesmo aspecto apresentado durante a conservação. Entretanto, para as cultivares Princesa e Preciosa a variável número de folhas verdes também apresentou maiores médias com a utilização do sorbitol no meio, não diferindo estatisticamente da sacarose. Sendo o manitol a fonte de carbono que apresentou as menores médias nas cultivares estudadas.

Levando-se em consideração a importância da retomada no crescimento do explante, após o processo de conservação, podemos concluir que o manitol foi o agente osmótico que mais apresentou características desfavoráveis, apresentando, também, um menor comprimento e número de folhas nos explantes estudados.

O sorbitol, por sua vez, foi o agente osmótico que apresentou resultados superiores ao manitol nas características favoráveis à retomada do crescimento, entretanto, esses mesmos resultados foram inferiores, comparados aos explantes submetidos ao meio com sacarose na maioria dos resultados apresentados. Porém, com relação à resposta dos explantes aos tratamentos, durante o processo de paralisação do crescimento na conservação, pode-se observar que o sorbitol foi mais eficiente comparado à sacarose. A restrição do crescimento é fundamental na redução dos riscos de alteração genética e contaminação, tendo em vista que esse método se baseia no crescimento mínimo para aumentar o intervalo entre os subcultivos.

Em relação às respostas da cultivar a Grande Naine, a atuação do sorbitol, durante a conservação, observou-se que as médias foram semelhantes às obtidas com a utilização do manitol, portanto, o sorbitol apresentou a mesma eficiência na paralisação do explante, já que, essas fontes de carbono apresentaram as menores médias comparadas à sacarose. Posteriormente, na retomada do crescimento, os tratamentos com sorbitol apresentaram resultados

mais satisfatórios em relação ao manitol, tais como, no crescimento e desenvolvimento da parte aérea. Assim, podemos concluir que o sorbitol foi o agente osmótico mais eficiente na conservação da cultivar Grande Naine. Sendo a concentração de 20 g L^{-1} a que obteve as maiores médias, na maioria dos resultados, durante a etapa de retomada do crescimento.

Para as cultivares Preciosa e Princesa, o manitol apresentou-se mais eficiente, seguido do sorbitol e da sacarose, na maioria das variáveis analisadas durante a conservação, apresentando as menores médias. Entretanto, durante a retomada do crescimento, este apresentou as menores médias relacionadas ao desenvolvimento da parte aérea, tais como, equivalentes ao sorbitol, em relação ao comprimento foliar, número total de folhas, número de folhas verdes, matéria fresca e seca das folhas, matéria seca das raízes e matéria seca total. Já, o sorbitol, apesar de ter apresentado durante a conservação resultados intermediários, médias inferiores à sacarose e superiores ao manitol, na retomada do crescimento este apresentou resultados satisfatórios. Tais como a obtenção de médias superiores no número de folhas verdes, assim como observado para a sacarose. Já, o manitol apresentou as menores médias em relação ao número total de folhas e folhas verdes, comprimento foliar, peso da matéria fresca e seca das folhas, peso da matéria seca das raízes e o peso da matéria seca total do explante.

Portanto, ao analisar os resultados em conjunto, concluímos que o sorbitol apresentou influência na redução do metabolismo normal das plantas cultivadas *in vitro*, em condições padrões de cultivo as plantas crescem rapidamente e consomem a maior parte dos nutrientes, havendo a necessidade repicagem e renovação do meio. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o período de conservação foi ampliado e, após esse período, os explantes apresentaram-se viáveis e disponíveis para retornar às condições normais de multiplicação *in vitro* ou ser aclimatados *in vivo*. Sendo a dosagem de 20 g L^{-1} a

que obteve os melhores resultados para a maioria das variáveis analisadas durante e após a conservação..

Tabela 11 Médias das variáveis número total de folhas (NTF), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de folhas mortas (NFM) da cultivar Grande Naine em meio MS, após 12 meses de conservação *in vitro*.

Tratamentos (g L ⁻¹)		NTF (cm)	NFV (unidade)	NFS (unidade)	NFM (unidade)
Sacarose	20	4,50a	2,03b	1,43a	1,04a
	40	4,44a	2,44a	1,00b	1,00b
Média		4,47A	2,24A	1,21A	1,02A
Sorbitol	20	4,01a	2,01a	1,00a	1,00a
	40	3,72b	1,72b	1,00a	1,00a
Média		3,87B	1,87B	1,00B	1,00B
Manitol	20	3,00b	1,00b	1,00b	1,00a
	40	3,82a	1,41a	1,41a	1,00a
Média		3,42C	1,21C	1,21A	1,00B
cv(%)		10,54	11,54	20,41	3,08
Teste F		*	*	*	*

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 12 Médias das variáveis número total de folhas (NTF), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de folhas mortas (NFM) da cultivar Preciosa, em meio MS após 12 meses de conservação *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		NTF (cm)	NFV (unidade)	NFS (unidade)	NFM (unidade)
Sacarose	20	4,14a	2,14a	1,00a	1,00a
	40	4,25a	2,18a	1,07a	1,00a
Média		4,19A	2,16A	1,03A	1,00A
Sorbitol	20	3,91b	1,91b	1,00a	1,00a
	40	4,14a	2,14a	1,00a	1,00a
Média		4,03B	2,03A	1,00A	1,00A
Manitol	20	3,97a	1,97a	1,00a	1,00a
	40	3,76b	1,76a	1,00a	1,00a
Média		3,86C	1,86B	1,00A	1,00A
cv(%)		10,54	11,54	20,41	3,08
Teste F		*	*	ns	ns

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 13 Médias das variáveis número total de folhas (NTF), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de folhas mortas (NFM) da cultivar Princesa, em meio MS após 12 meses de conservação *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)		NTF (cm)	NFV (unidade)	NFS (unidade)	NFM (unidade)
Sacarose	20	4,36a	1,74b	1,62a	1,00a
	40	4,23a	2,16a	1,07b	1,00a
Média		4,29A	1,95A	1,34A	1,00A
Sorbitol	20	3,99a	1,99a	1,00b	1,00a
	40	4,11a	1,81a	1,30a	1,00a
Média		4,05B	1,90A	1,15B	1,00A
Manitol	20	4,06a	1,73a	1,33a	1,00a
	40	3,73b	1,73a	1,00b	1,00a
Média		3,89C	1,73B	1,16B	1,00A
cv(%)		10,54	11,54	20,41	3,08
Teste F		*	*	*	ns

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

O manitol apresentou um efeito tóxico na conservação *in vitro* das cultivares Grande Naine e Preciosa. Resultados similares foram encontrados na conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (SÁ; LÉDO; LÉDO, 2011).

Tabela 14 Porcentagem de explantes viáveis (PEV), média de explantes viáveis (MEV), após 12 meses sob conservação *in vitro*

Tratamentos (g L ⁻¹)	Grande Naine		Preciosa		Princesa		
	PEV (%)	MEV (unidade)	PEV (%)	MEV (unidade)	PEV (%)	MEV (unidade)	
Sacarose	20	90	0,90a	100	1,00a	90	0,90a
	40	100	1,00a	80	0,80a	100	1,00a
Média			0,95A		0,90A		0,95A
Sorbitol	20	60	0,60a	70	0,70a	90	0,90a
	40	30	0,30a	100	1,00a	100	1,00a
Média			0,45B		0,85A		0,95A
Manitol	20	10	0,10a	50	0,50a	50	0,50b
	40	20	0,20a	50	0,50a	90	0,90a
Média			0,15C		0,50B		0,70A
Teste F			*		*		ns

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúsculas entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

4 CONCLUSÕES

- a) Os açúcares influenciam, significativamente, no desenvolvimento dos explantes das cultivares estudadas durante a conservação *in vitro*;
- b) A sacarose promove maior crescimento da planta *in vitro*, durante a conservação e na retomada do crescimento;
- c) Na presença do manitol, a maioria dos parâmetros apresentam valores numéricos inferiores às demais fontes de carbono;
- d) É possível conservar, sob crescimento lento, microplantas de bananeira em meio de cultura MS enriquecido com 20mg/L de sorbitol, onde, também, observa-se uma taxa de sobrevivência favorável.

REFERÊNCIAS

BRITO, A. L. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, ago. 2011.

CALDAS, L. S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 87-132.

CORDEIRO, Z. J. M. **Cultivo da banana para o estado de Rondônia**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cultura de Tecidos e Transformação, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaRondonia/>>. Acesso em: 12 out. 2011.

CORDEIRO, Z. J. M. et al. 'Preciosa': variedade de banana resistente à Sigatoka-negra, Sigatoka-amarela e ao mal do-Panamá. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 30, n. 3, p. 316-320, maio/jun. 2005.

COSTA, M. A. P. de C. et al. Conservação *in vitro* de *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker e *Aechmea miniata* Beer ex Baker (Bromeliaceae-Bromelioideae). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 4, p. 293-303, out./dez. 2012.

DONATO, S. L. R. et al. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.), em dois ciclos de produção no sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 139-144, abr. 2006.

DUMET, D. et al. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 14, n. 4, p. 243-250, 1993.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasma: a review. **Euphytica**, Wageningen, v. 57, p. 227-243, Sept. 1991.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora Giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 267-270, ago. 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FLORES, R. et al. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 192-199, Aug. 2013.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1, the technology**. 2nd ed. Edington: Wilts; London: Exegetics, 1993. 1574 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: RiMa, 2006. 398 p.

LÉDO, A. S. et al. **Banana princesa**: variedade tipo maçã resistente à Sigatoka-amarela e tolerante ao mal-do-Panamá. Aracaju: EMBRAPA Tabuleiros Costeiros/INFOTECA-E, 2008. Folder.

MOOSIKAPALA, L.; TE-CHATOL, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 6, n. 2, p. 401-407, 2010.

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

NEPOMUCENO, C. F. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 3, p. 481-490, maio/jun. 2009.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região 286 nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SANTOS, M. da C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira1. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, jul./set. 2011.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; BLANK, A. F. Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, n. 3, set. 2012.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Estudo de mercado: banana**. Brasília, 2008. Disponível em: <[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8E2336FF6093AD96832574DC0045023C/\\$File/NT0003904A.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8E2336FF6093AD96832574DC0045023C/$File/NT0003904A.pdf)>. Acesso em: 30 jan. 2013.

SHIBLI, R. A. et al. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, v. 2, n. 4, p. 372-382, 2006.

SHIBLI, R. A. et al. Slow growth *in vitro* conservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.). **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v. 13, n. 2, p. 133-134, 1999.

SILVA, J. R. S. et al. Efeito da sacarose sobre o enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 5, n. 2, p. 56-59, 2005.

SILVA, S. O. Cultivares de banana para exportação. In: ALVES, E. J. et al. (Ed.). **Banana para exportação: aspectos técnicos da produção**. Cruz das Almas: MAARA-SDR-BA/EMBRAPA-SPI, 1995. p. 13-18. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 18).

SOUZA, I. de et al. Plantio irrigado de bananeiras resistentes à Sigatoka-negra consorciado com culturas anuais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 172-180, mar. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

THORPE, T. et al. The components of plant culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. New York: Springer, 2008. v. 1, p. 115-173.

ANEXOS

ANEXO A - Comprimento das raízes, número de raízes, peso fresco das folhas, peso fresco das raízes, peso seco das folhas, peso seco das raízes, número total de folhas, coloração das folhas (verdes, amarelas e marrons) em função das concentrações de sacarose, sorbitol e manitol, ao longo dos períodos de avaliação, em dias

