



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**PARÂMETROS MORFO-FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTO  
AGRONÔMICO EM CAMPO DE BANANEIRAS PRODUZIDAS EM  
BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**

**JANIFFE PERES DE OLIVEIRA**

**MANAUS - AM**

**DEZEMBRO, 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**PARÂMETROS MORFO-FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTO  
AGRONÔMICO EM CAMPO DE BANANEIRAS PRODUZIDAS EM  
BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**

Autora: Janiffe Peres de Oliveira  
Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC, da Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

MANAUS - AM

DEZEMBRO, 2014

## Ficha Catalográfica

O48d OLIVEIRA, Janiffe Peres.  
Parâmetros morfo-fisiológicos e comportamento  
agronômico em campo de bananeiras produzidas em  
biorreator de imersão temporária / Janiffe Peres de  
Oliveira. -- Manaus - AM, 2014.  
179f.

Tese (Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia) –  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

1. *Musa* spp.. 2. Citometria de fluxo. 3. Variação  
somaclonal.

I. Título.

CDD – 371

JANIFFE PERES DE OLIVEIRA

PARÂMETROS MORFO-FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTO  
AGRONÔMICO EM CAMPO DE BANANEIRAS PRODUZIDAS EM  
BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC, da Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

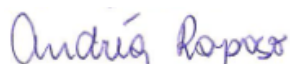
Aprovada em 04 de dezembro de 2014.

**Banca examinadora**



---

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira (Presidente)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia




---

Dra. Andrea Raposo  
Embrapa Acre



---

Dra. Tatiane Loureiro da Silva  
Fundação de Tecnologia do Estado do Acre



---

Dr. Frederico Henrique da Silva Costa  
Universidade Federal do Acre



---

Dr. Romeu de Carvalho Andrade Neto  
Embrapa Acre

## **OFEREÇO**

À minha família que além de ser importante em minha vida, sempre apoiou para que eu conseguisse realizar grandes sonhos. Meus pais João Paes de Oliveira e Marizete Peres da Silva, meus irmãos Johnatan Peres de Oliveira e Maira Peres de Oliveira, os sobrinhos Carlos Eduardo, Vitória Ysah e Jhony Henry.

Essa conquista é nossa!

Aos meus pais João Paes de Oliveira e Marizete Peres da Silva, pessoas simples que jamais deixaram de acreditar no meu potencial e de incentivar nas minhas conquistas. Foram para mim exemplo de caráter e dedicação. Ensinarão-me os valores necessários para ser uma pessoa honesta e solidária. Me apoiaram nas dificuldades, estiveram sempre presentes tornando cada ocasião os melhores momentos da minha vida somente por estarem comigo!

***DEDICO***

## Biografia

JANIFFE PERES DE OLIVEIRA, filha de João Paes de Oliveira e Marizete Peres da Silva, nasceu em 11 de novembro de 1982, no município de Xapuri, estado do Acre, onde morou e estudou até o primeiro ano do segundo grau. Aos dezesseis anos mudou-se para capital Rio Branco, onde se formou Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal do Acre (UFAC), em fevereiro de 2007.

Durante a formação acadêmica foi bolsista do Programa de iniciação científica financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), durante quatro anos desenvolvendo as atividades de pesquisa na Embrapa Acre.

Foi como bolsista do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) que iniciou suas primeiras atividades na área de Cultura de Tecidos Vegetais no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa sob a orientação do Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, já trabalhando com a cultura da banana.

Arovada no mestrado em Agronomia/Produção Vegetal da UFAC, área de conhecimento de Melhoramento Vegetal e Recursos Genéticos dedicou-se a área de atuação em Biotecnologia/Cultura de Tecidos Vegetais dando continuidade aos estudos com bananeiras defendendo sua dissertação em 2009.

Durante o mestrado, desenvolveu parte do projeto de dissertação na Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, onde passou um semestre do curso adquirindo experiência em trabalhos de pesquisa com microrganismos diazotróficos isolados de bananeira.

Atualmente conclui seu doutorado no programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas e tem desenvolvidos trabalhos contando com a parceria da Embrapa Acre, Rio Branco-Acre e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, DF.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, saúde e proteção, por nunca ter me abandonado nos momentos de fraqueza e desânimo, mas, sobretudo, por ter usado minha fé como instrumento de incentivo, coragem e determinação para a realização dos sonhos de uma vida.

Aos meus pais e irmãos, pela paciência, carinho, amor, amizade e compreensão e em especial por nunca terem me deixado só mesmo estando distante.

Ao meu orientador Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira pela compreensão, boa vontade e disposição em me orientar, pelo exemplo de pessoa e profissional que és, pela paciência e desprendimento para ensinar e, principalmente, pela confiança que depositou em mim durante todos esses anos de parceria, sendo não apenas um incentivador do meu trabalho, mas também um amigo que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a crescer.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Acre e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos - CENARGEN e aos seus funcionários, pela oportunidade e apoio durante a realização dos trabalhos.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia bem como todos aqueles que de alguma forma foram para mim, exemplo de grandes profissionais e que contribuíram brilhantemente com a minha formação profissional.

Ao grupo de profissionais da Biofábrica Clones da Amazônia pela ajuda, empenho e dedicação durante as avaliações do material micropropagado, foi uma ótima parceria e uma importante troca de experiências.

Às amigas M.Sc. Simone de Alencar Maciel, Simone Leite e M.Sc. Renata Beltrão T. Yomura pela amizade, companheirismo, alegrias e principalmente pelo apoio, não me deixando perder a fé, as forças e a confiança no meu potencial e pela imensa ajuda, incentivo e parceria nos trabalhos.

A minha mais que amiga, irmã de muitas vidas certamente, Deisy Mara pelos conselhos prestados, pela paciência, puchões de orelha nas horas de desânimo, pelo carinho, companhia e dedicação.

Ao parceiro de todas as horas Luis Felipe, pelo companheirismo, ajuda prestada, compreensão e paciência nos meus momentos difíceis de estresse. Pela

força, apoio moral e incentivo.

Aos amigos e parceiros no trabalho, Dra. Andrea Raposo, Dr. Lauro Saraiva Lessa, Dra. Tatiane Loureiro e Dr. Romeu de Carvalho Andrade Neto pela ajuda prestada na hora das pesquisas e análises e, sobretudo, pela amizade que nasceu nestes anos de convivência e que será preservada sempre.

As amigas que fiz em Brasília durante a minha estada, em especial Kelly Cristinha Venâncio, Marta Nascimento e Patrícia por tudo que compartilhamos durante nosso convívio, amizade verdadeira, alegrias, pela força e apoio que me deram, pela solidariedade e desprendimento e, sobretudo por me ajudarem a superação de todos os obstáculos enfrentados, iluminado meus dias com muita alegria, carinho e respeito que acabou se transformando em uma bela amizade.

Ao colega Dr. Frederico Henrique da Silva Costa pela incontestável contribuição na idealização e montagem de alguns dos experimentos científicos do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos durante o desenvolvimento dos meus trabalhos de tese.

A analista do Laboratório de Microscópio Eletrônico de Varredura Ana Cristina Meneses M. Gomes e aos colegas Ricardo e João pela ajuda nas análises e por transmitirem seus conhecimentos; aos colegas do Laboratório de cultura de tecidos do CENARGEN pela ajuda durante a execução dos trabalhos, momentos de descontração e amizade. André, Ludmila, Leandro, Renata, Hugo, Tatiana, Luana, Elinea vocês foram grandes parceiros. Em especial à Gabriela e Zanderluce por toda troca de conhecimentos, ajuda e colaboração com os trabalhos realizados.

Às amigas que conquistei durante minha breve passagem por Brasília Kelly Cristina Venâncio e Marta Nascimento, pela preocupação, generosidade e, especialmente, pela sincera e recíproca amizade.

Aos colegas de Manaus, em especial Dra. Aldecinei Siqueira pela amizade, companhia, pelas conversas intermináveis altas horas da noite; à Maria Aparecida, Marelis Reis Ruz, Solange de Araújo e Andreia Amancio pela amizade, ajuda, e pelos conselhos e passeios.

A toda equipe da Gestão do Instituto Federal de Educação do Acre (IFAC) pelo apoio e compreensão, oportunizando todas as condições necessárias para



conclusão do trabalho escrito.

A todos aqueles, que mesmo não citados, contribuíram de forma positiva durante esta etapa de minha vida.

Meus sinceros agradecimentos!

“A dúvida é o princípio da  
sabedoria.”

*Aristóteles*

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo determinar parâmetros morfo-fisiológicos e avaliar a estabilidade genômica de plantas de bananeiras produzidas em Biorreator de Imersão Temporária (BIT), além de analisar o comportamento agrônomico em campo dos genótipos multiplicados. Para tanto, o trabalho foi dividido em três capítulos, como segue: 1- Manutenção, multiplicação e aclimatização de bananeiras produzidas em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*; 2- Comportamento organogênico e caracterização morfo-anatômica de plantas de bananeiras multiplicadas em sistema Semi-Sólido (SS) e Biorreator de Imersão Temporária (BIT) e; 3 – Avaliação citométrica, morfológica e de produção em campo de bananeiras produzidas em Biorreator de Imersão Temporária. Inicialmente genótipos de bananeira foram avaliados quanto a capacidade de serem mantidos *in vitro* sob condições de crescimento mínimo, onde concentrações do meio de cultura (MS pleno e ½ MS) e duas temperaturas da câmara de crescimento (20 e 25 °C) foram testadas. Após sete meses, o material foi avaliado e as brotações multiplicadas em diferentes sistemas de cultivo, aclimatizadas e levadas para plantio e monitoramento em campo. Para a etapa de multiplicação, dois sistemas foram testados. Após replicadas e determinadas as taxas de multiplicação as plantas foram então enraizadas, sendo determinados seus padrões de crescimento e desenvolvimento. Uma vez avaliadas, as plantas foram aclimatizadas e avaliadas quanto ao crescimento e sobrevivência. Em todas as condições, as plantas também foram avaliadas anatomicamente por microscopia de luz e de varredura para melhor caracterizar os efeitos dos diferentes tratamentos e ambientes sobre o desenvolvimento das plantas. Por fim, ao final de todo o processo de propagação *in vitro*, as plantas do sistema BIT foram plantadas em campo e avaliadas durante dois ciclos de produção, quanto ao seu comportamento morfo-agrônomico, com plantas produzidas convencionalmente (divisão de touceiras). Paralelamente a este experimento, também foram realizadas quantificações no conteúdo do DNA nuclear das plantas, por meio de análises por citometria de fluxo, além de avaliações visuais, com vistas a detectar possíveis alterações somaclonais nas plantas em estudos. De maneira geral, verificou-se que a melhor condição de manutenção das plantas foi quando estas foram mantidas sob meio de cultura de MS à 20°C. Sob multiplicação, após o período de conservação, obtiveram-se taxas de multiplicação do material

entre 1,1 e 2,5 brotos/explante, sendo que quando os sistemas SS e BIT foram comparados, verificaram-se que as plantas em BIT apresentam maior crescimento, mas menores taxas de multiplicação do que àquelas do sistema SS. De maneira geral, o índice de enraizamento *in vitro* das plantas foi de 100%, em ambos os sistemas de cultivo e a sobrevivência das plantas em casa de vegetação alcançou índices superiores a 70%, com diferenças quanto ao sistema de cultivo utilizado. Morfo-anatomicamente observaram-se poucas diferenças das plantas quando estas foram avaliadas nos diferentes sistemas de cultivo, embora durante a aclimatização, incrementos na camada de cêra epicuticular, densidade estomática, espessura da epiderme e hipoderme na face adaxial, além de diferenças entre os tecidos parenquimáticos tenham sido característicos para as plantas originadas em ambos os sistemas de cultivo (SS e BIT). Por fim, quando as plantas produzidas em sistema BIT foram avaliadas em campo, verificou-se que, de modo geral, estas apresentaram comportamento agrônômico semelhante àquelas propagadas convencionalmente, sem variações significativas no conteúdo de DNA nuclear, nem anomalias morfológicas visuais que pudessem caracterizar algum tipo de variação somaclonal nas plantas. Conclui-se com este trabalho que: *i*) genótipos de bananeiras podem ser mantidos *in vitro* em condições de crescimento mínimo, antes de serem utilizados para fins de propagação; *ii*) O sistema de cultivo BIT proporciona menores taxas de multiplicação do que sistemas SS e são mais indicados para serem utilizados durante as fases de alongamento/enraizamento de plantas de bananeira *in vitro*; *iii*) Plantas produzidas em sistema BIT apresentam características morfo-anatômicas semelhantes àquelas produzidas em sistemas SS, e; *iv*) Em condições de campo, o uso de plantas produzidas em sistema BIT apresentam comportamento semelhantes à plantas produzidas convencionalmente, incluindo aspectos relacionados à produção e produtividade.

**Palavras-chave:** *Musa* spp., BIT, micropropagação, citometria de fluxo, variação somaclonal, desempenho agrônômico.

## ABSTRACT

The objective of this work was to determine morpho-physiological parameters and to determinate the genomic stability of banana plants produced in Temporary Immersion Bioreactor (TIB), besides analyzing the agronomic behavior of the multiplied plant in the field. Therefore, the work was organized in three chapters, as follows: 1- Maintenance, multiplication and acclimatization of banana plants produced in different *in vitro* cultivation systems; 2- Organogenic behavior and morpho-anatomical characterization of banana plants multiplied in Semi-Solid (SS) and Temporary Immersion Bioreactor (TIB) systems, and; 3 – Cytometric evaluation, morphological and field production of banana plants from plantlets produced in TIB. Initially, banana genotypes were evaluated *in vitro* under minimal growth conditions, where concentrations of culture medium full and half-strength MS medium) and two temperatures (20 e 25 °C) were tested. After seven months, the material was evaluated and the shoots multiplied in different culture systems, acclimatized. For the multiplication, two systems were evaluated and after, the plants were rooted, then, the plants were acclimatized and evaluated for survival and growth. In all conditions, the plants were evaluated anatomically to better characterize the effects of different treatments and environments on plant development. Finally, at the end of the *in vitro* propagation process, the plants from TIB were established in the field and evaluated with conventionally produced plants (clump division) during two production cycles. In parallel determinations of nuclear DNA content of the plants were also performed by flow cytometry, with views to detect possible somaclonal variations of the. It was found that the best maintenance condition of the shoots under *in vitro* conditions was in full strength MS medium at 20 °C. After the storage period, the multiplication rates reached values between 1.1 and 2.5 shoots per explant. When SS and TIB systems were compared, It was observed that plants produced in TIB presented higher growth, but, lower multiplication rates than those of the SS system. In general, the *in vitro* rooting was 100% for both culture systems, and the plant survival in greenhouse reached levels above 70%, with differences between cultivation systems. Morpho-anatomically few differences were observed between plants from TIB or SS systems,, although during acclimatization, increments in the epicuticular wax layer, stomatal density, epidermal thickness and hypodermis in the adaxial face, besides differences between the parenchyma tissues had been characteristic for the plants from both culture systems. Finally, when the plants produced in TIB were evaluated in field, it was found that they presented agronomic behavior similar to those conventionally propagated, without significant changes in nuclear DNA content, neither visual morphological abnormalities that could characterize some type of somaclonal variation. With this work it is possible to conclude that: *i*) banana plants can be maintained under *in vitro* minimal growth conditions, before being used for propagating purposes; *ii*) The TIB provide lower multiplication rates than SS system, although it can be recommended to be used to lengthen or promote the

rooting of shoots in cultivation; *iii*) Plants produced in TIB present morpho-anatomical characteristics similar to the ones produced in SS system, and; *iv*) Under field conditions, plantlets produced from TIB have similar agronomic performance to those produced by conventional propagation.

**Keywords:** *Musa* spp., BTI, micropropagation, flow cytometric, somaclonal variation, agronomic performance.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Modelo de Biorreator de Imersão Temporária – BIT, desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ..... 18

### CAPÍTULO I

---

#### MANUTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE BANANEIRAS PRODUZIDAS EM DOIS DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*

- FIGURA 1** Aspecto de plantas de bananeiras, variedade ‘Pacovan Ken’, conservadas *in vitro* durante 240 dias. A e B. plantas conservadas a 20 °C em meio de cultura de ½MS e MS, respectivamente; C e D. plantas conservadas a 25 °C em meio de cultura de ½MS e MS. Imagem destaca ainda a comparação do consumo de meio de cultura nos tubos.....58
- FIGURA 2** Taxa de multiplicação de variedades de bananeira aos sete meses de conservação *in vitro*. Médias referentes a dois subcultivos sucessivos..... 59
- FIGURA 3** Aspecto de bananeiras em meio de multiplicação, após conservação. A. Aspecto das mudas em meio de cultura MS semi-sólido sob multiplicação; B. Propágulos utilizados como fonte de explantes em sistemas de cultivo: SS e BIT..... 60
- FIGURA 4** Aspecto geral das plantas durante o cultivo em sistema SS e BIT: A. Kit do sistema BIT montado em prateleira, contendo brotações em início de cultivo; B. Detalhe das brotações em início de cultivo em BIT; C. Mudanças de bananeira da variedade ‘Japira’ em BIT durante a fase de troca de meio do primeiro para o segundo subcultivo; D. Plantas da variedade ‘Thap Maeo’ durante a etapa de avaliação após a etapa de enraizamento: a. BIT e b. SS; experimento de comparação de desempenho. .... 65
- FIGURA 5** Aspecto geral de plantas de bananeira das variedades em estudo A. Plantas obtidas em sistema BIT: a. ‘Thap Maeo’, b. ‘Pacovan Ken’, c. ‘D’Angola’, d. ‘Japira’; B. Plantas cultivadas pelo sistema SS: a. ‘Thap Maeo’, b. ‘Pacovan Ken’, c. ‘D’Angola’, d. ‘Japira’; C. Após o transplante para aclimatização em casa de vegetação e D. Aspecto vigoroso da planta após o transplante.....69

## CAPÍTULO II

---

### COMPORTAMENTO ORGANOGÊNICO E CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA DE PLANTAS DE BANANEIRAS MULTIPLICADAS EM SISTEMA SEMI-SÓLIDO E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

**FIGURA 1** Aspecto geral das plantas da variedade ‘Preciosa’ durante a etapa *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo: A. Durante a classificação; B e C. Plantas em sistema SS durante avaliação; D, E e F. Mudanças de bananeira oriundas de biorreator de imersão temporária durante a avaliação e classificação.....90

**FIGURA 2** Aspecto das plantas de bananeira produzidas em sistema de Biorreator de imersão temporária durante a fase inicial da aclimatização em casa de vegetação: A e B. variedade ‘Preciosa’; C e D. variedade ‘Thap Maeo’. .....93

**FIGURA 3** Fotomicrografia de folhas de bananeira variedade ‘Preciosa’. Seções transversais para análise da cutícula: A. Face adaxial de folhas em sistema SS; B. Sistema BIT; C. Face abaxial de folhas em sistema SS; D. Sistema BIT; Epiderme em vista frontal: E. Face adaxial em sistema SS; F. Sistema BIT e abaxial; G. Sistema SS; H. Sistema BIT. Aspecto anatômico de estômatos em detalhe, da face adaxial: I. Sistema SS; J. Sistema BIT e abaxial: K. Sistema SS; L. Sistema BIT. Seções transversais obtidas da região da lâmina foliar para observação do arranjo celular dos tecidos foliares: M e N. face adaxial em Sistema SS; O e R. faces adaxial e abaxial em sistema BIT; P e Q - face abaxial em sistema SS. Legenda: ct – cutícula; ad – adaxial; ab – abaxial; seta – estômato; os – ostíolo; \* - células subsidiárias; ep – epiderme; hp – hipoderme; pp – parênquima paliçádico; pl – parênquima lacunoso; fv – feixe vascular; es – Estômato. (Escala em A, B, C, D, I, J, K, L, M, N, O, P equivalem à 20 µm; e em E, F, G, H, Q, R equivalem a 50 µm). .....98

**FIGURA 4** Fotomicrografia de folhas de bananeira variedade ‘Thap Maeo’. Seções transversais para análise da cutícula: A. Face adaxial de folhas em sistema SS; B. Sistema BIT; C. Face abaxial de folhas em sistema SS; D. Sistema BIT; Epiderme em vista frontal: E. Face adaxial em sistema SS; F. Sistema BIT e abaxial; G. Sistema SS; H. Sistema BIT. Aspecto anatômico de estômatos em detalhe, da face adaxial: I. Sistema SS; J. Sistema BIT e abaxial: K. Sistema SS; L. Sistema BIT. Seções transversais obtidas da região da lâmina foliar para observação do arranjo celular dos tecidos foliares: M e N. face adaxial em Sistema SS; O e R. faces adaxial e abaxial em sistema BIT; P e Q - face abaxial em sistema SS. Legenda: ct – cutícula; ad – adaxial; ab – abaxial; seta – estômato; os – ostíolo; \* - células subsidiárias; ep – epiderme; hp – hipoderme; pp – parênquima paliçádico; pl – parênquima lacunoso; fv – feixe vascular; es –



Estômato. (Escala em A, B, C, D, I, J, K, L, M, N, O, P equivalem à 20 µm; e em E, F, G, H, Q, R equivalem a 50 µm)..... 99

**FIGURA 5** Eletromicrografia de varredura da epiderme em vista frontal de folhas de bananeira da variedade ‘Preciosa’. Face adaxial: Sistema SS A. após cultivo *in vitro* e B. após 30 dias em casa de vegetação; Sistema BIT C. após cultivo *in vitro* e D. após 30 dias em casa de vegetação. Estômatos em maior de detalhe: Face adaxial do Sistema SS E. após o cultivo *in vitro* e F. após 30 dias em casa de vegetação; Face adaxial do sistema BIT G. após o cultivo *in vitro* e H. após 30 dias em casa de vegetação. Face Abaxial: Sistema SS I. após cultivo *in vitro* e J. após 30 dias em casa de vegetação; Sistema BIT K. após cultivo *in vitro* e L. após 30 dias em casa de vegetação. Estômatos em maior de detalhe: Face abaxial do Sistema SS M. após o cultivo *in vitro* e N. após 30 dias em casa de vegetação; Face abaxial do sistema BIT O. após o cultivo *in vitro* e P. após 30 dias em casa de vegetação. (Escala em A, B, C, D, I, J, K, L equivalem à 50 µm; e em E, F, G, H, M, N, O, P equivalem a 20 µm ). ..... 101

**FIGURA 6** Eletromicrografia de varredura da epiderme em vista frontal de folhas de bananeira da variedade ‘Thap Maeo’. Face adaxial: Sistema SS A. após cultivo *in vitro* e B. após 30 dias em casa de vegetação; Sistema BIT C. após cultivo *in vitro* e D. após 30 dias em casa de vegetação. Estômatos em maior de detalhe: Face adaxial do sistema SS E. após o cultivo *in vitro* e F. após 30 dias em casa de vegetação; Face adaxial do sistema BIT G. após o cultivo *in vitro* e H. após 30 dias em casa de vegetação. Face Abaxial: Sistema SS I. após cultivo *in vitro* e J. após 30 dias em casa de vegetação; Sistema BIT K. após cultivo *in vitro* e L. após 30 dias em casa de vegetação. Estômatos em maior de detalhe: Face abaxial do Sistema SS M. após o cultivo *in vitro* e N. após 30 dias em casa de vegetação; Face abaxial do sistema BIT O. após o cultivo *in vitro* e P. após 30 dias em casa de vegetação. (Escala em A, B, C, D, I, J, K, L equivalem à 50 µm; e em E, F, G, H, M, N, O, P equivalem a 20 µm). ..... 102

### CAPÍTULO III

---

#### COMPORTAMENTO EM CAMPO E CONTEÚDO DE DNA EM PLANTAS DE BANANEIRA PRODUZIDAS EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

**FIGURA 1** Aspecto das plantas de bananeira durante avaliação em campo: A. Com um mês após o plantio; B e C Mudanças de bananeira obtida por meio de propagação convencional e BIT, respectivamente, com dois meses após o plantio; D. Aspecto do bananal aos 6 meses e, E. Após 8 meses; F. Planta produzida em BIT com aspecto vigoroso e apresentando início da produção e G. Planta de bananeira perdida por tombamento. .... 133

- FIGURA 2:** Histogramas relativos à análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA de cinco variedades de bananeiras obtidos usando o tampão Galbraith. O primeiro pico de cada sistema (CON= Convencional e BIT= Biorreator de Imersão Temporária) corresponde ao ciclo G1 das amostras em estudo; o segundo pico corresponde ao padrão de Referência Ervilha (*Pisum sativum*). .....134
- FIGURA 3** Aspecto dos cachos da variedade 'Thap Maeo' ao longo do segundo ciclo de produção. A. Cacho associado a planta, ainda em desenvolvimento após aproximadamente 42 dias de sua emissão; B. Apresentando mesmo cacho ainda não totalmente desenvolvido colhido após 48 dias de sua emissão por tomabamento da planta; C. Cacho com emissão deficiente apresentando-se em posicionamento e tamanho anormal; D.Cacho anormal em detalhe; E. Fruto maduro colhido de cacho com aspecto de desenvolvimento anormal. ....137

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

---

#### MANUTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE BANANEIRAS PRODUZIDAS EM DOIS DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*

- TABELA 1** Características morfológicas de variedades de bananeira durante sete meses, sob condições de crescimento mínimo ..... 57
- TABELA 2** Características morfológicas de brotações produzidas por meio de sistema de cultivo semi-sólido e biorreator de imersão temporária ..... **Erro! Indicador não definido.**64
- TABELA 3** Crescimento das plantas de bananeira das variedades ‘Japira’, ‘D’Angola’, ‘Pacovan Ken’ e ‘Thap Meo’, originadas de sistemas de cultivo Semi-Sólido (SS) e Biorreator de Imersão Temporária (BIT), após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação ..... 68

### CAPÍTULO II

---

#### COMPORTAMENTO ORGANOGÊNICO E CARACTERIZAÇÃO MORFO- ANATÔMICA DE PLANTAS DE BANANEIRAS MULTIPLICADAS EM SISTEMA SEMI-SÓLIDO E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

- TABELA 1** Resposta das brotações de bananeiras das variedades ‘Preciosa’ e ‘Thap Maeo’ produzidas em dois sistemas de cultivos após a fase de multiplicação, alongamento e enraizamento ..... 88
- TABELA 2** Acúmulo de massa fresca e seca de plantas de bananeira, variedades ‘Preciosa’ e ‘Thap Maeo’, produzidas em sistemas de cultivo Semi-Sólido (SS) e em Biorreator de Imersão Temporária (BIT) ..... 89
- TABELA 3** Comportamento de plantas de bananeira, variedades ‘Preciosa’ e ‘Thap Maeo’, cultivadas em sistema de cultivo Semi-Sólido (SS) e em Biorreator de Imersão Temporária (BIT), após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação ..... 92
- TABELA 4** Características morfométricas e anatômicas de folhas de bananeira das variedades ‘Preciosa’ e ‘Thap Maeo’ cultivadas em dois diferentes sistemas de cultivo *in vitro*..... 94
- TABELA 5** Características morfométricas de folhas de bananeira das variedades ‘Preciosa’ e ‘Thap Maeo’ cultivadas em sistemas Semi-Sólido (SS) e Biorreator de Imersão Temporária (BIT) durante diferentes etapas

do processo: <i>in vitro</i> .....	106
<i>in vitro</i> .....	106

### CAPÍTULO III

---

#### COMPORTAMENTO EM CAMPO E CONTEÚDO DE DNA EM PLANTAS DE BANANEIRA PRODUZIDAS EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

<b>TABELA 1</b> Análise conjunta do efeito da interação entre dois ciclos vegetativos e os diferentes sistemas de obtenção de mudas para cada variedade de bananeira estudada em condições de campo .....	127
<b>TABELA 2</b> Análise conjunta do efeito da interação entre os ciclos e os tratamentos para cada variedade estudada, da emissão do cacho a colheita ..	132
<b>TABELA 3</b> Conteúdo médio relativo de DNA (pg) de variedades de bananeiras ao longo do segundo ciclo de produção em campo .....	135

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 A CULTURA DA BANANA.....	3
2.2 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE A PROPAGAÇÃO DA BANANEIRA .....	5
2.2.1 PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL .....	5
2.2.2 PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	6
2.2.2.1 Etapas da propagação <i>in vitro</i> .....	9
2.2.2.2 Aclimatização .....	10
2.2.2.3 Sistemas de micropropagação: um comparativo entre o convencional e por biorreatores .....	13
2.3 BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA - BIT .....	16
2.4 ESTUDOS ANATÔMICOS DE MUDAS DE BANANEIRA MICROPROPAGADAS .....	18
2.5 DISTURBIOS MORFO-FISIOLÓGICOS E GENÉTICOS QUE PODEM OCORRER DURANTE O CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	21
2.5.1 Hiper-hidricidade .....	21
2.5.2 Variação somaclonal .....	21
2.6 CITOMETRIA DE FLUXO .....	24
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>

## CAPÍTULO I

---

### MANUTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE BANANEIRAS PRODUZIDAS EM DOIS DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*

<b>RESUMO</b> .....	<b>44</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>48</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
2.1 COLETA E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DO MATERIAL VEGETAL .....	50
2.2 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA SOB CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO MÍNIMO.....	51

2.3 MULTIPLICAÇÃO CLONAL <i>IN VITRO</i> DE BANANEIRAS EM SISTEMAS DE CULTIVO SEMI-SÓLIDO E EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA...	52
2.3.1 Enraizamento das brotações produzidas em diferentes sistemas de cultivo .....	53
2.4 ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS PRODUZIDAS NOS DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO.....	54
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	54
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
3.1 MANUTENÇÃO DE GERMOPLASMA SOB REGIME DE CULTIVO MÍNIMO .....	54
3.2 MULTIPLICAÇÃO CLONAL <i>IN VITRO</i> DE BANANEIRAS EM SISTEMAS DE CULTIVO SEMI-SÓLIDO E EM BIORREADORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	61
3.3 ACLIMATIZAÇÃO <i>EX VITRO</i> DAS PLANTAS PRODUZIDAS NOS DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO .....	65
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>

## CAPÍTULO II

---

### COMPORTAMENTO ORGANOGÊNICO E CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA DE PLANTAS DE BANANEIRAS MULTIPLICADAS EM SISTEMA SEMI-SÓLIDO E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

<b>RESUMO .....</b>	<b>76</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>78</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>81</b>
2.1 MULTIPLICAÇÃO EM SISTEMA DE MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	81
2.2.1 Alongamento e enraizamento de plantas produzidas em sistema de micropropagação convencional e biorreator de imersão temporária.....	82
2.2.2 Aclimatização das plantas produzidas <i>in vitro</i> em sistemas de micropropagação convencional e biorreator de imersão temporária.....	83

2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA DE FOLHAS DE BANANEIRAS OBTIDAS EM SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	83
2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA VIA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FOLHAS DE BANANEIRA DURANTE A FASE <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> , APÓS O CULTIVO EM SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	84
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....	85
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
3.1 MULTIPLICAÇÃO EM SISTEMA DE MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	86
3.2 ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS PRODUZIDAS <i>IN VITRO</i> EM SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	90
3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA DE FOLHAS DE PLANTAS DE BANANEIRAS OBTIDAS EM SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	93
3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA VIA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FOLHAS DE BANANEIRA DURANTE A FASE <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> , APÓS O CULTIVO EM SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	100
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>

### CAPÍTULO III

---

#### COMPORTAMENTO EM CAMPO E CONTEÚDO DE DNA EM PLANTAS DE BANANEIRA PRODUZIDAS EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

RESUMO .....	115
ABSTRACT.....	117
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>118</b>

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>121</b>
2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	121
2.1.1 Mudanças obtidas em biorreatores de imersão temporária - BIT.....	121
2.1.2 Mudanças obtidas por sistema de propagação convencional.....	122
2.2 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO EM CAMPO.....	122
2.3 ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÔMICA POR MEIO DA CITOMETRIA DE FLUXO .....	123
2.3.1 COLETA DO MATERIAL.....	123
2.3.2 Determinação do conteúdo de DNA nuclear .....	123
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>124</b>
3.1 COMPORTAMENTO AGRONÔMICO DE MUDAS PRODUZIDAS EM BIT	124
3.2 ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÔMICA POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	133
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>138</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>139</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>146</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A bananeira é uma das espécies frutíferas mais importantes do Brasil, sendo observada, nos últimos anos, uma significativa ampliação do mercado consumidor, com conseqüente elevação do preço do produto (DOMINGUES, 2012). Tal fato tem ocasionado à expansão da cultura em vários estados brasileiros e levado a banana ao *ranking* das frutas de maior produção e comercialização mundial, com mais de 6.902.184 toneladas anuais (IBGE, 2012; FAO, 2014).

Atualmente tem-se observado significativas mudanças no cenário da bananicultura brasileira devido, especialmente, a contribuição de instituições de pesquisa na obtenção de híbridos de bananeira mais produtivos, com porte reduzido e resistência às principais pragas e doenças (JESUS, 2006; OLIVEIRA, 2009).

Nesse contexto, especialistas em produção de mudas por micropropagação e instituições de pesquisa têm utilizado ferramentas biotecnológicas capazes de acelerar o processo de obtenção e produção de mudas, entre as quais, a cultura de tecidos de plantas, também conhecida como micropropagação. Esta técnica, além de permitir a conservação *in vitro* de germoplasma, tem sido a melhor alternativa para se obter material propagativo em quantidade e com qualidade genética e fitossanitária, sendo também rotineiramente utilizada como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento genético da cultura (COSTA et al., 2008; OLIVEIRA, 2009; SOUZA et al., 2009).

Assim, devido a importância para a cultura e a fim de atender a rápida demanda do mercado por mudas, surgiram as biofábricas, estruturas laboratoriais de cunho geralmente privado especializadas na produção industrial de mudas por micropropagação. Estima-se que atualmente no Brasil operem cerca de 30 empresas de pequeno e médio porte, tanto de direito público como privado que utilizam das técnicas de micropropagação para produzir cerca de 30 milhões de mudas de bananeira por ano (DEBIASI, 2011).

Contudo, estima-se que apenas 36% da demanda nacional por mudas de bananeira por ano têm sido atendidas. Portanto, com uma área cultivada em torno de 520 mil hectares e a necessidade de renovação do bananal na ordem

de pelo menos 10% ao ano, estima-se que a demanda do mercado brasileiro esteja na ordem de 60,0 milhões de mudas por ano (DEBIASI, 2011), sem contar um possível aumento de área plantada.

Várias estratégias na cultura de tecidos têm sido utilizadas visando acelerar a propagação de mudas desta e de outras espécies. Atualmente, o mais recente mecanismo utilizado tem sido os chamados biorreatores. Tais equipamentos, em especial os de imersão temporária, têm se tornado a grande promessa para atender a demanda por mudas micropropagadas, com economia de tempo, mão-de-obra e custos com meio de cultura, já que usa meios de consistência líquida (TEIXEIRA, 2002; DEBIASI, 2011; CABRAL, 2011; RODRIGUES, 2011; BARROS, 2011; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). No que se refere à bananeira, os biorreatores de imersão temporária (BIT) tem apresentado importantes resultados, especialmente aqueles relacionados com as etapas de alongamento e enraizamento das brotações axilares (TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA; CID, 2010).

Entretanto, algumas diferenças entre as mudas propagadas convencionalmente e as micropropagadas por meio do sistema Semi-Sólido têm sido relatada na literatura, que incluem a reduzida deposição de cera epicuticular e diferenciação do mesofilo, feixes vasculares rudimentares e baixo controle de abertura e fechamento dos estômatos, além da ocorrência de variantes somaclonais (ROMANO; MARTINS-LOUÇÃO, 2003; COSTA et al., 2009a). Segundo Kodym e Zapata-Arias (1999) e Arigita et al. (2002), tais alterações são resultado de complexas condições de cultivo formadas na atmosfera dos fracos, incluindo reduzida irradiância, presença de carboidrato prontamente assimilável e reguladores de crescimento exógenos, baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub>, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas com o ambiente *ex vitro*.

No que se refere às modificações morfo-fisiológicas, apesar de existirem relatos de que a maioria delas perdurem somente até os primeiros dias após o transplante *ex vitro* (COSTA et al., 2009a), elas podem interferir no processo de adaptação das mudas às novas condições ambientais, durante o momento de sua aclimatização. Esse fato pode resultar em importantes taxas de perdas por morte de material propagado *in vitro* (ÁLVARES; CALDAS, 2002).

Já plantas que apresentam algum tipo de variação somaclonal podem resultar em indivíduos com desenvolvimento anormal, o que reflete no campo

em modificações, principalmente às relacionadas com altura, cor, forma e arquitetura das folhas, além de má formação dos cachos (ISRAELI et al., 1991), com consequente perda de produtividade.

Logo, em se tratando de cultura de tecidos de plantas para a cultura da bananeira, é consenso que, apesar da eficiência da técnica (OLIVEIRA, 2009), é necessário que se avance nos conhecimentos e domínio da metodologia, pois diferentes respostas podem ser esperadas a depender da estratégia de cultivo e do genótipo utilizado (LACERDA et al., 2008; COSTA et al., 2009). Nesse contexto, é comum verificar que os trabalhos de micropropagação publicados até o momento se limitam às etapas de laboratório até, no máximo, a fase de aclimatização. Portanto, são escassos os trabalhos na literatura que relatam o comportamento de plantas nas diferentes etapas do cultivo, que incluem desde o processo de propagação em laboratório até os seus primeiros ciclos de colheita em campo.

Nesse sentido, o trabalho objetivou determinar parâmetros morfo-fisiológicos de bananeiras multiplicadas em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, bem como avaliar a estabilidade genômica e o comportamento em campo dos genótipos multiplicados.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A CULTURA DA BANANA**

Símbolo dos países tropicais, a bananeira é originária da Ásia Tropical (MARTINS; FURLANETO, 2008). A cultura se difundiu para a Costa Ocidental da África e América, sendo trazida ao Brasil ainda no século XVI (MACHADO, 2006), tornando-se um importante elemento constituinte da alimentação humana, tanto pelo seu valor nutritivo, quanto pelo seu baixo custo, contribuindo fortemente para a fixação da mão-de-obra rural (DONATO, 2003).

Nos últimos anos, tem ocorrido uma ampliação do mercado consumidor e consequente elevação dos preços da banana, o que tem ocasionado a expansão da cultura em vários estados brasileiros (SILVA et al., 2006). Esse fato tem levado a fruta ao *ranking* das frutas de maior produção e comercialização mundial, com exportações anuais de cerca de 6.902.184 toneladas (IBGE, 2012;

FAO, 2014).

Apesar da banana ser responsável por 37% do volume total de frutas transacionadas no mercado internacional, esse valor representa apenas 3% da produção total de banana no Brasil (RANGEL et al., 2002; BARROS et al., 2008). De fato, a comercialização da banana é bastante difusa e, por esse motivo, a bananicultura é considerada como uma das principais culturas no segmento agrícola nacional, sendo o setor da agricultura familiar um dos principais responsáveis pela maior parte dessa produção (IBGE, 2012; FAO, 2014).

A produtividade da bananeira no Brasil, entre 2007 e 2011, passou de pouco mais de 13.000 kg/ha para 14.540 kg/ha, apesar de uma significativa redução de área cultivada neste mesmo período (IBGE, 2012). Esse incremento na produtividade se deu, principalmente, pela introdução de cultivares resistentes ao mal de Sigatoka em meados de 2005 (OLIVEIRA et al., 2007).

No território brasileiro, quando se considera a preferência para o cultivo e consumo, destacam-se as variedades tipo 'Maçã', 'Mysore', 'Prata', 'Plátano', e as do tipo 'Cavendish' e 'Terra', sendo esta última a única variedade nativa do país (SILVA et al., 2003; MACHADO, 2006; OLIVEIRA, et al., 2008b).

A cultura da banana constitui-se como uma das principais fontes de renda para os pequenos produtores e, atualmente, a bananicultura brasileira ocupa uma área de 523.421 mil ha (IBGE, 2012). A produção é distribuída por todo o território nacional, sendo a Região Nordeste a maior produtora (34%), seguida das regiões Norte (26%), Sudeste (24%), Sul (10%) e Centro-Oeste (6%) (GASPAROTTO; PEREIRA, 2010).

Na Região Norte, aproximadamente 92 mil hectares são ocupados com a prática da bananicultura, tendo uma produção estimada em cerca de 1 milhão de toneladas (GASPAROTTO; PEREIRA, 2010). Da área cultivada com bananas na Região Norte do Brasil, o Estado do Acre representa 9,71% deste total, tendo atualmente o município de Acrelândia como o maior produtor do Estado (OLIVEIRA et al., 2008b), com uma área plantada de cerca de 2.000 hectares. Durante a safra de 2011 a produção em todo o Estado chegou a 69.730 mil toneladas (IBGE, 2012).

Contudo, após a chegada da sigatoka negra no Acre na safra de 2001 ocorreu uma redução de aproximadamente 42% de área cultivada, ocasionando impactos negativos em vários segmentos da cadeia produtiva (OLIVEIRA et al.,

2008b). Esta redução ocorreu, em grande parte, devido à utilização generalizada de cultivares ('Prata', 'Maçã' e 'Terra') suscetíveis às mais importantes doenças da cultura, sendo estas ainda produzidas sem nenhum controle fitossanitário (COSTA et al., 2008), e mantendo-se este cenário em anos subsequentes.

Entretanto, a partir de programas de melhoramento genético da cultura, a Embrapa já lançou no mercado nacional variedades de bananeiras com importantes qualidades agronômicas, tais como: altura reduzida e resistência à doenças. E entre as variedades, destacam-se a 'Caipira', 'Thap Maeo', 'FHIA 18', 'Prata Baby' (Nam), 'Pacovan Ken', 'Prata Graúda', 'Preciosa', 'Maravilha', 'Tropical', entre outras (SILVA, et al., 2003). Devido a isso, a bananicultura brasileira tem passado por mudanças substanciais envolvendo a substituição das antigas variedades por novos plantios com mudas mais resistentes (GASPAROTTO; PEREIRA, 2010).

No Estado do Acre, na última década, pelo menos cinco novas variedades foram testadas e recomendadas para plantios, sendo elas a 'Preciosa', 'Maravilha', 'Thap Maeo', 'Japira' e 'Pacovan Ken' (OLIVEIRA, 2009). Para o fornecimento de tais mudas em velocidade e quantidade adequada foram utilizadas técnicas de cultura de tecidos, o que permitiu a distribuição de aproximadamente 25 mil mudas matrizes de bananeira resistente à sigatoka-nega, aos produtores locais em meados de 2007 (OLIVEIRA, 2009, OLIVEIRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011).

## 2.2 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE A PROPAGAÇÃO DA BANANEIRA

### 2.2.1 Propagação convencional

Por tratar-se de frutos partenocárpicos e efetivamente estéreis, convencionalmente a bananeira é propagada por meio de rizomas (separação de brotos do rizoma-mãe, fracionamento do rizoma, propagação rápida). Teoricamente, uma bananeira pode produzir tantas mudas quanto forem as folhas emitidas até o surgimento do cacho. E embora Oliveira et al. (2008b), em estudos realizados nas condições edafoclimáticas do município de Rio Branco Acre, tenham observado que o número médio de folhas produzidas pelas mudas de bananeira durante três ciclos não foi superior a 12,5, Alves et al. (2004)

revelaram que o número de folhas da bananeira pode chegar à aproximadamente 38. Contudo, o potencial de uma alta produção de mudas não se traduz naturalmente devido à influência da dominância apical da planta mãe e dos rebentos já desenvolvidos (COSTA, 2007).

Além disso, dependendo da cultivar, do porte da bananeira e da idade da planta-mãe, o potencial de produção de rebentos emitidos até o surgimento do cacho pode ser reduzido à aproximadamente 25% (ALVES et al., 2004). Isso, representa cerca de 3 a 10 filhotes por matriz em um período geralmente superior a 12 meses, a depender das condições de manejo do bananal (VUYLSTEKE; DE LANGHE, 1985).

Portanto, o método de propagação convencional da bananeira está entre os principais aspectos que limitam a expansão da cultura, pois além de apresentar baixo rendimento no número de propágulos produzidos (VUYLSTEKE, 1989), pode apresentar um potencial mecanismo de disseminação de pragas e doenças (ROELS et al., 2005), e ocasionar perdas de até 100% na produtividade (SILVA et al., 2003).

Além da baixa taxa de multiplicação e da possibilidade de comportarem-se como vetores na disseminação de doenças, as mudas obtidas pelo processo convencional de propagação apresentam grande desuniformidade, o que dificulta o manejo do bananal. Muito embora tais métodos estejam sendo aperfeiçoados de modo a elevar a taxa de multiplicação e incrementar a produção de mudas de qualidade, estes têm sido considerados como pouco efetivos quanto a sanidade e uniformidade das plantas obtidas (ALVES et al., 2004).

### 2.2.2 Propagação *in vitro*

Os avanços obtidos no campo da fisiologia vegetal nas últimas décadas proporcionaram o desenvolvimento de tecnologias de propagação alternativas aos métodos convencionais, por meio da cultura de tecidos vegetais (FLORES, 2003).

Atualmente, propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos (COSTA et al., 2009). Esta técnica envolve a seleção da fonte de

explante, desinfestação dos tecidos e a introdução dos mesmos em ambiente asséptico em meios de crescimento, enraizamento e aclimatização (VASIL; THORPE, 1994). Tendo em vista que as plantas são obtidas em ambiente asséptico, esta técnica possui grande aplicação e aceitação mundial, possibilitando inclusive, o intercâmbio de material vegetal isento de patógenos entre os países, evitando assim, barreiras fitossanitárias (FLORES, 2003).

A micropropagação, por ser uma técnica que permite a produção massal de plantas a partir de um mínimo de material utilizado como explante primário, é de grande relevância para espécies onde o método de propagação convencional é pouco eficiente. Além disso, pode ser aplicada teoricamente para todas as espécies de plantas, sendo recomendada especialmente para aquelas que se propagam vegetativamente (GERALD; LEE, 2011).

Diante destes fatos, a biofabricação de plantas tem se tornado uma realidade bastante comum na agroindústria. Estima-se que atualmente no Brasil, existam cerca de 20 a 30 biofábricas comerciais e governamentais, em sua maioria de pequeno porte, produzindo para o mercado de mudas micropropagadas de bananeiras aproximadamente 30 milhões de mudas por ano (DEBIASI, 2011).

A consagração desse processo comprovada por sua utilização em escala industrial, além das vantagens quanto a uniformidade, a qualidade e a velocidade de produção das mudas, confere ainda à cultura de tecidos uma vantagem do ponto de vista ecológico na conservação *ex situ* de espécies nativas raras e ameaçadas de extinção, ou ainda, recalcitrantes. Adicionalmente, a técnica evita a retirada de grandes quantidades de exemplares dos habitats naturais para exploração econômica (FLORES, 2003) e/ou mesmo contribuindo para o reflorestamento.

Assim, o cultivo *in vitro* vem se tornando uma técnica cada vez mais comum no mercado visando suprir a demanda de uma produção agrícola cada vez mais tecnificada (MENDES et al., 1996) e já tem sido aplicada com sucesso para muitas espécies, dentre as quais: abacaxi (BARBOZA et al., 2006; COSTA et al., 2006;), mandioca (OLIVEIRA et al., 2000; SATO et al., 2001), cana-de-açúcar (SILVA et al., 2007), espécies ornamentais (SANTOS, 2009; HUANG et al., 2011; LEÃO et al., 2014) além da bananeira (ÁLVARES; CALDAS, 2002; COSTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008, OLIVEIRA, 2009).

Os primeiros relatos da micropropagação em espécies do gênero *Musa* datam da década de 1960 (COX et al., 1960; STOTZKY et al., 1962). Desde então tem ocorrido uma grande intensificação dos trabalhos de pesquisa, a fim de tornar a técnica cada vez mais eficiente, produtiva e menos onerosa (ROCHA, 2005; COSTA et al., 2007; COSTA, 2007; COSTA et al., 2009b). Atualmente, a literatura dispõe de inúmeros trabalhos que podem confirmar o sucesso da produção de mudas de bananeira *in vitro* (OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; PEREIRA, 2014), e ainda alguns que relatam sobre a micropropagação de bananeira e a qualidade genética e fitossanitária das mudas produzidas (OLIVEIRA; SILVA, 1997; YOKOTA et al., 2007).

Assim, no que se refere à cultura da bananeira, a propagação *in vitro* constitui uma importante ferramenta para obtenção clonal de genótipos selecionados (KOZAI et al., 1997). A técnica facilita a distribuição, a conservação e o intercâmbio de germoplasma, além de proporcionar a rápida propagação e validação de variedades recentemente lançadas pelos programas de melhoramento genético da bananeira (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004; ROCHA, 2005).

Estudos realizados por Oliveira (2009), comprovam a eficiência da técnica na multiplicação e adaptação de genótipos de bananeira resistentes à doenças e recomendados para Região Norte. De acordo com o autor, a produção anual de mudas por micropropagação pode ser superior a 3.000 plantas por explante, podendo variar de acordo com a cultivar utilizada.

Entretanto, apesar de seus benefícios para a produção de mudas, o cultivo *in vitro*, sob as condições heterotróficas convencionais, levam às plantas a apresentarem certas características morfofisiológicas, tais como reduzida deposição de cera epicuticular, reduzida diferenciação do mesofilo, feixes vasculares rudimentares e baixo controle de abertura e fechamento dos estômatos (ROMANO; MARTINS-LOUÇÃO, 2003; COSTA et al., 2009a). Segundo Kodym e Zapata-Arias (1999) e Arigita et al. (2002), tais alterações são resultado de complexas condições formadas na atmosfera dos fracos de cultivo, incluindo reduzida irradiância, presença de carboidrato exógeno, baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub>, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas com o ambiente *ex vitro*.



Apesar de existirem relatos de que tais modificações perdurem apenas até os primeiros dias, após o transplante *ex vitro*, já que novas folhas mais adaptadas são formadas no novo ambiente, elas podem interferir no processo de adaptação das mudas às novas condições durante o momento da aclimatização (COSTA et al., 2009a).

Assim, o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de fatores que vão desde a coleta e manipulação da planta matriz até a aclimatização e plantio no campo das novas plantas, bem como a avaliação de características morfofisiológicas (BOMFIM, 2006).

#### 2.2.2.1 Etapas da propagação *in vitro*

De acordo com Pasqual et al. (2001), um trabalho de micropropagação geralmente envolve seis etapas: preparativa, estabelecimento, multiplicação, alongamento, enraizamento e, por fim, a aclimatização.

Considera-se a fase inicial do cultivo *in vitro*, a preparação das plantas matrizes destinadas ao fornecimento dos explantes primários para o cultivo *in vitro* (WILLADINO; CAMARA, 2005). Esta etapa requer atenção especial, pois é neste momento que se escolhe os melhores materiais para o cultivo, sendo determinante a seleção de plantas matrizes saudáveis, vigorosas, isentas de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento vegetativo (PASQUAL et al., 2001).

A segunda etapa que envolve o processo de micropropagação é a fase de estabelecimento. Segundo Torres et al. (1998) a fase é composta pelos seguintes procedimentos: coleta, desinfestação, isolamento e cultivo dos explantes em meio de cultura e sob condições assépticas.

Um fator determinante da sobrevivência dos explantes durante os estágios iniciais é o meio de cultura no qual estes são estabelecidos. Este deve conter em sua composição sais e vitaminas necessárias ao desenvolvimento da planta durante essa fase. Apesar de serem encontrados na literatura vários tipos de meios propostos para o cultivo de diversas espécies (BOMFIM, 2006), para a bananeira é comum o uso do meio de cultura de MS descrito por Murashige e Skoog (1962).

A terceira etapa envolve o processo de multiplicação, onde os propágulos

são multiplicados em escala durante sucessivos subcultivos em meio próprio de multiplicação, de modo que as partes formadas ou são subdivididas em partes menores ou são individualizadas para formação de novos explantes (BOMFIM, 2006). No caso da bananeira o meio de multiplicação mais indicado é o meio de cultura de MS acrescido de reguladores de crescimento que possuem efeito na quebra da dominância apical e na proliferação de gemas axilares.

Segundo Tombolato e Costa (1998), a concentração e o tipo de citocinina são os fatores que mais influenciam na taxa de multiplicação dos explantes, sendo que para a bananeira é geralmente acrescido ao meio, a citocinina N<sup>6</sup>-Benzilaminopurina (BAP), em concentrações variando de 0,5 a 7,5 mg.L<sup>-1</sup> (LIMA; MORAES, 2006). Para esta fase, Pasqual et al. (2001), atentam ainda para a importância das condições ambientais da sala de crescimento (local de armazenamento dos frascos, contendo as plantas durante o cultivo) serem favoráveis, principalmente no que diz respeito a luminosidade e temperatura, tendo em vista que a fase de multiplicação é considerada a mais longa de todo o processo.

Uma vez multiplicados em número suficiente, dependendo da espécie, o material geralmente é transferido para meios de alongamento e/ou enraizamento para formação de raízes adventícias, sendo que esta fase pode durar de 30 a 45 dias. Posteriormente, as mudas são transferidas para substrato ou solo apropriado visando a aclimatização, finalizando, assim, o processo.

#### 2.2.2.2 Aclimatização

Considerada uma das etapas mais críticas da micropropagação, e requer bastante atenção, pois durante o período de aclimatização pode ocorrer morte das plantas (TORRES et al., 1998).

Segundo Bomfim (2006), é comum confundir o termo aclimatização com aclimação. Para George (1993), a aclimação é um processo realizado pela natureza, enquanto que a aclimatização é um processo controlado pelo homem. Assim, aclimação pode ser definida como sendo um termo que se refere ao processo no qual as plantas ou outros organismos vivos tornam-se ajustados a um novo clima ou situação, como resultado de um processo essencialmente natural (PREECE; SUTTER, 1991), enquanto que aclimatização é definida como

sendo a transferência de um organismo, especialmente uma planta, para novo ambiente, sendo todo o processo realizado artificialmente (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

Wardle et al. (1983), já relatavam que o período de aclimatização, compreendido entre o transplante das plantas produzidas *in vitro* e o total estabelecimento em casa de vegetação, é complexo e, freqüentemente, ocorrem perdas significativas por morte. Trabalhos mais recentes (HAZRIKA, 2003; COSTA et al., 2009) têm confirmado tais perdas durante essa fase, especialmente se todo o procedimento (irrigação e controle de incidência solar direta sobre as mudas) e monitoramento das mudas não forem cuidadosamente planejados.

Hazarika (2003) explica que tais perdas na fase de aclimatização podem realmente ocorrer, pois as plantas não suportam drásticas mudanças ambientais proporcionadas pelo transplante, de um meio totalmente controlado para o ambiente natural com elevados níveis de estresse (baixa umidade, luminosidade e temperaturas elevadas, doenças, etc). Além disso, as plantas recém micropropagadas são pouco eficientes fotossinteticamente e as folhas das plantas cultivadas *in vitro* possuem menor quantidade de ceras epicuticulares do que as plantas crescidas em casa de vegetação ou no campo. E quando associadas à pouca funcionalidade dos estômatos e à fraca conexão com o sistema vascular, tornam-nas sensíveis a grandes perdas de água por transpiração, podendo ocasionar a morte destas (COSTA et al., 2009).

Outro aspecto a se considerar na fase de aclimatização refere-se ao padrão de crescimento das plantas. Isso se deve ao fato de que, ao sofrer mudança abrupta de ambiente, ou seja, passando de condições *in vitro* para *ex vitro*, normalmente elas apresentam uma parada ou redução do crescimento até que se adaptem às novas condições, podendo levar de dias a semanas até que retornem ao crescimento (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2000; SCHERWINSKI-PEREIRA et. al., 2001). Assim, a redução de perdas por morte, associada ao rápido crescimento de mudas na aclimatização são fatores que podem contribuir significativamente para que mudas micropropagadas cheguem ao setor produtivo de forma mais rápida e barata (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2004).

Neste contexto, cuidados devem ser tomados durante o transplante,

visando assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento satisfatório das plantas micropropagadas. Tais cuidados estão relacionados com as condições ambientais, os substratos, as condições fitossanitárias, a irrigação e os recipientes (BOMFIM, 2006), onde, a escolha adequada de cada item para cada espécie é de fundamental importância para o sucesso da técnica e sobrevivência das plantas (SCHMITZ et al., 2002).

No caso dos substratos, suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem facilitar ou limitar a sobrevivência, formação de novas raízes e o conseqüente crescimento das plantas (CALVETE, 2000; SETUBAL; NETO, 2000; SILVA et al., 2004). Para Torres et al. (1998), um bom substrato deve apresentar uma boa capacidade de retenção de água e não compactar-se excessivamente, comprometendo a drenagem e, conseqüentemente, a aeração do sistema radicular.

Ressalta-se ainda, que não apenas as propriedades físico-químicas devem ser consideradas na escolha de substratos e materiais que irão compor a mistura, devendo-se observar também, o custo e sua disponibilidade. Desse modo, o uso de substratos e formulações facilmente disponíveis nos locais de produção das mudas, tais como pó de coco, esterco bovino, casca de arroz carbonizada, bagana de carnaúba, entre outros (PEIXOTO et al., 2006), são alternativas para a redução dos custos, com resultados positivos no desenvolvimento das plantas (BEZERRA; ROSA, 2002).

Entretanto, substratos comerciais já prontos são alternativos para trabalhos de aclimatização, especialmente na pesquisa científica por serem formulações já conhecidas quanto a sua composição, facilitando seu uso e recomendação. Além disso, os substratos comerciais possuem a característica de virem estéreis de fábrica seguindo as recomendações de Hoffmann et al. (1996) que indicam que um bom substrato deve, além de ser firme e denso o suficiente para oferecer sustentação às plantas até o enraizamento, não encolher e não expandir com a variação da umidade, reter água em quantidade adequada e ser suficientemente poroso para permitir a drenagem da água e aeração, ser também livre de invasoras, nematoides ou outros patógenos, não apresentar níveis excessivos de salinidade e permitir a esterilização por vapor.

Quanto aos recipientes nos quais as plantas são cultivadas, devem-se considerar aspectos como o volume do recipiente que poderão exercer influência

decisiva no desenvolvimento e manutenção do ativo crescimento das plantas durante as etapas de aclimatização e enviveiramento. De maneira geral, as plantas crescem mais rapidamente em recipientes mais espaçosos. Segundo Reis et al. (1989), o desempenho no campo é maior à medida que as dimensões das mudas, por ocasião do plantio, forem maiores. A restrição do sistema radicular limita o crescimento e o desenvolvimento de várias espécies, pela redução da área foliar, altura e produção de biomassa. Ainda segundo estes autores, o pequeno volume dos recipientes exige, também, a aplicação de doses elevadas de nutrientes, devido às perdas por lixiviação, resultantes da necessidade de regas freqüentes.

Por outro lado Oliveira et al., (2008) em seus trabalhos observaram que o tamanho do recipiente também pode estar relacionado com o tempo de permanência das plantas nesta condição. Em biofábricas por exemplo, onde o tempo de aclimatização pode ser curto em decorrência da comercialização e rápida rotatividade de mudas, estas acabam optando por material mais econômico a cerca da utilização de substrato, como por exemplo as bandejas plásticas. Estas são mais práticas no manuseio e preenchimento, são mais baratas e otimizam o uso do espaço físico.

Estes mesmos autores descrevem questões práticas sobre as melhores composições e proporções de tipos de substratos, além dos melhores tipos e tamanhos de recipientes a serem utilizados para aclimatização de mudas de bananeira oriundas da micropropagação nas condições da Amazônia Sul-Occidental.

#### 2.2.2.3 Sistemas de micropropagação: um comparativo entre o convencional e por biorreatores

A micropropagação convencional tem sido uma técnica intensivamente aperfeiçoada e aplicada para várias espécies. Atualmente, é utilizada por biofábricas comerciais para produção de mudas especialmente de bananeira, abacaxizeiro, cana-de-açúcar, eucalipto, teca, orquídeas, gérberas, antúrios, limonion, violetas e suas quimeras, circumas, gengibres, aloés, além de bromélias (DEBIASI, 2011).

Entretanto, apesar de eficiente, essa técnica baseia-se no cultivo em

pequenos frascos, com número reduzido de plantas por frasco, e uso de meio nutritivo gelificado, o que acarreta intensa manipulação das culturas e envolvimento de grande contingente de mão-de-obra especializada (TEIXEIRA, 2002).

Como alternativa foram desenvolvidos os biorreatores, equipamentos utilizados para o cultivo de células, gemas axilares, embriões somáticos ou qualquer tipo de propágulo que possa ser utilizado em cultura de tecidos de plantas. Durante o cultivo neste equipamento, os explantes podem ser submetidos à regimes de imersão temporária ou permanente do meio de cultura (TEIXEIRA; CID, 2010).

O uso de tal ferramenta parte do princípio da otimização da produção de plantas por meio da cultura de tecidos uma vez que possibilita reduzir a necessidade de manipulação e consequentes custos de mão-de-obra. Adicionalmente, a técnica potencializa a capacidade proliferativa e de crescimento das espécies nele cultivadas, além de reduzir custos com meio de cultura, já que utiliza-se meio de consistência líquida (DEBIASI, 2011). Outras vantagens do uso dos biorreatores é que o sistema permite a renovação do ar durante o cultivo, além de permitir o monitoramento de um ou mais parâmetros essenciais ao crescimento do propágulo, tais como o pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de íons, entre outros. O seu uso permite ainda, proporcionar, mesmo com mão-de-obra reduzida, a produção de grandes quantidades de mudas em espaço menor que o ocupado pelos frascos no sistema convencional de micropropagação. Por fim, os biorreatores permitem diminuir a manipulação do material, reduzindo possíveis perdas por contaminação microbiana (TEIXEIRA, 2002).

Anteriormente, os biorreatores eram adaptados daqueles utilizados para cultivo de células de bactérias e fungos e por isso eram denominados fermentadores. Os primeiros biorreatores utilizados para cultivo de células vegetais também surgiram da adaptação desses modelos fermentadores existentes no mercado. Surgiu então, na literatura, um dos primeiros trabalhos relatados especificando o uso dos biorreatores para cultivo de plantas datado de 1981, tratando-se de um experimento de micropropagação de begônia realizado por Takayama e Misawa (TAKAYAMA; MISAWA, 1981).

Inicialmente, as modificações realizadas aos fermentadores para

proporcionar o cultivo de células vegetais consistiu basicamente de ajustes na taxa de renovação do ar e na forma de agitação das células. Entretanto, uma série de biorreatores para cultivo de células foram estudados, especialmente na década de 80, sendo desenvolvido, então, a partir de diversos modelos específicos para o cultivo de plantas. Tais modelos se diferenciam e se classificam especialmente pelo tipo de agitação e pelo tipo de frasco em: biorreatores do tipo aerador e agitador, tambor rotatório, filtro rotatório, tipo borbulhamento, levantamento de ar, fase gasosa, de aeração por membrana porosa ao oxigênio, do tipo sobreaeração e os de imersão temporária (TEIXEIRA, 2011).

Atualmente diversos autores e, dentre eles, Rodrigues (2011), Teixeira (2011), Barros (2011), Debiasi (2011) e Cabral (2011) relatam que para várias espécies, como cana-de-açúcar, abacaxi e banana dentre outras, a eficiência produtiva com o uso de biorreatores, quando estabelecidos protocolos adequados, pode ser significativamente superior ao sistema convencional de micropropagação.

Debiasi (2011) cita que para o cultivo de banana e abacaxi no sistema convencional de micropropagação, trabalha-se com frascos pequenos, geralmente de 250 mL, de vidro ou plástico, que pode conter em média de 10 a 15 explantes cada, no início do ciclo, para ambas as espécies. Entretanto, em biorreatores utilizam-se frascos que podem variar de 0,5 a 50 L e, dependendo do volume do frasco utilizado, as mesmas espécies podem ter seu cultivo iniciado com 40 ou até mesmo 200 explantes por frasco.

Além disso, sobre as mesmas culturas, este autor relata ainda que a duração dos ciclos de subcultivos pelo sistema convencional é em média de 4 a 5 semanas, com uma taxa de propagação média de 5 a 10 propágulos por explante para o abacaxi e 2 a 5 propágulos para banana, enquanto que em biorreatores o ciclo pode durar de 6 a 12 semanas, dando origem de 30 a 50 novos propágulos de abacaxi por explante e de 15 a 40 para banana. Por outro lado, o número de perdas de material por contaminação é significativamente maior no sistema de biorreatores quando não estabelecidas condições ótimas de controle de contaminantes, especialmente no início de processo.

### 2.3 BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA - BIT

O princípio da imersão temporária para o cultivo de células e tecidos vegetais foi proposto em 1952 por Steward e colaboradores, passando a ser relatado por Harris e Mason (1983). O diferencial do sistema de imersão temporária em relação aos demais é que, em todos os demais modelos apresentados, com exceção daquele que utiliza um sistema de pulverização do meio, o material em cultivo permanece continuamente imerso no meio de cultura, o que pode, conseqüentemente, acarretar em problemas de hiper-hidratação dos tecidos, dos órgãos e das plantas (TEIXEIRA; CID, 2010). Já em biorreatores de imersão temporária o meio de cultura permanece em contato com o explante por um período de tempo definido para cada cultura.

Esse modelo de imersão temporária foi basicamente desenvolvido para minimizar o surgimento de um fenômeno denominado de hiper-hidricidade (ALVARD et al., 1993). A hiper-hidricidade é um distúrbio fisiológico que afeta o crescimento e o desenvolvimento do material em cultivo, devido a hiper-hidratação dos tecidos, comumente observada em modelos de biorreatores onde o explante permanece em contato contínuo com o meio de cultura (TEIXEIRA; CID, 2010).

Entretanto, os primeiros biorreatores de imersão temporária desenvolvidos por Alvard et al. (1993) eram constituídos de um frasco com dois compartimentos: um superior e outro inferior. Esses frascos eram conectados entre si por um tubo onde o meio que estava no compartimento inferior banhava os explantes no compartimento superior, após uma injeção de ar que promovia o borbulhamento e o impulsionamento do meio. Esse modelo foi posteriormente modificado quanto a sua estrutura dando origem ao sistema de biorreator denominado RITA® (TEISSON et al., 1995) que manteve apenas as mesmas características de funcionamento do modelo proposto por Alvard (TEIXEIRA, 2002).

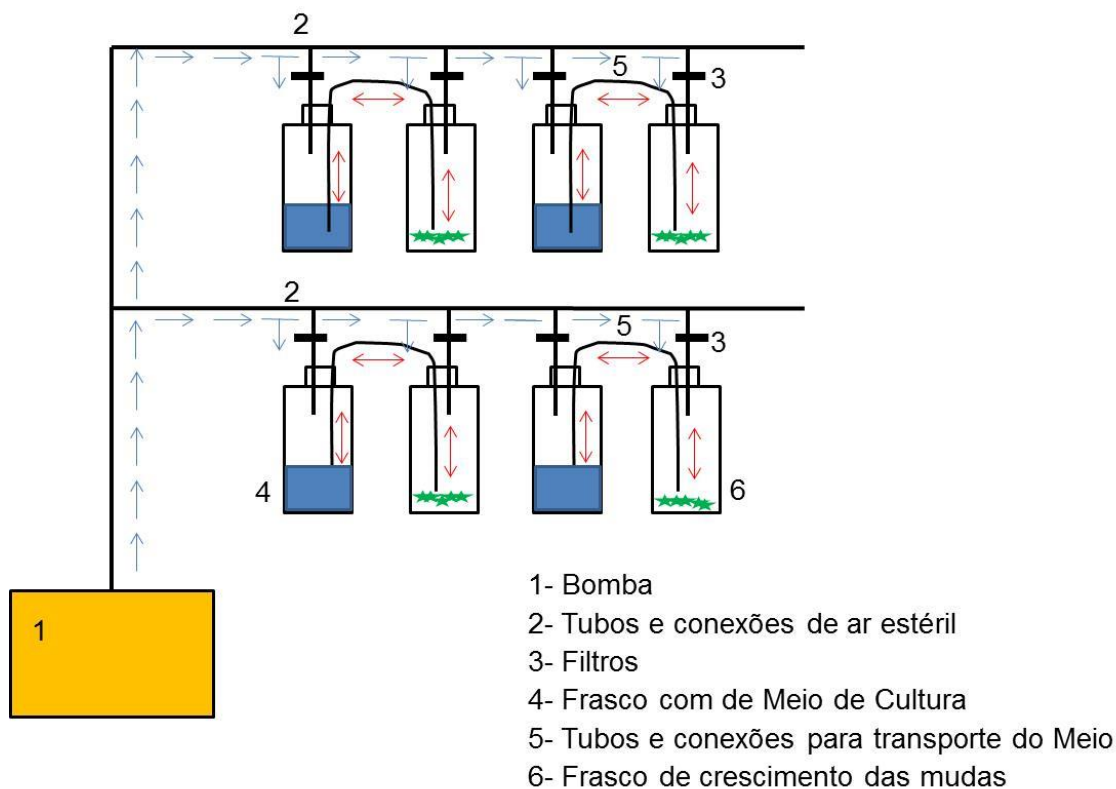
Várias modificações foram feitas no modelo proposto por Alvard ao longo do tempo, que inclui desde a modificação dos tipos de frascos até a automatização do sistema promovendo a injeção do ar por Simonton e colaboradores em 1991. Em seguida, Lorenzo et al. (1998) sugeriu modificações



ao sistema quando utilizou para o cultivo de gemas de abacaxi dois frascos separados: um para a estocagem do meio e outro para o cultivo do material.

Baseado nos modelos propostos por Alvard e Lorenzo, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia lançou, em meados de 2000, um sistema de frascos duplos que, segundo Teixeira (2002), apresenta características não encontradas nos demais modelos de biorreatores propostos. Este modelo é de fácil montagem, desmontagem e esterilização, sendo: versátil quanto ao tipo e tamanho de frascos, tampas e funis, além de permitir adaptação tanto ao uso de cultivo por imersão temporária como contínua. O modelo foi desenhado para suportar diferentes números de frascos e pode ser montado em diferentes ambientes de intensidade luminosa, fotoperíodo e temperatura. Também permite fazer uso de uma fonte artificial de ar e o controle de dosagens específicas de oxigênio, nitrogênio e gás carbônico, podendo ser utilizados para diversos cultivos de diferentes espécies, já tendo sido testado com abacaxi e café.

Recentemente, os biorreatores de imersão temporária seguindo o modelo da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia começaram a ser fabricados e comercializados com algumas adaptações, incluindo uso de lâmpadas de LED (Light Emitting Diode) e controle computadorizado de injeção de ar. Tais equipamentos já estão sendo utilizados em laboratórios e biofábricas, com objetivo final de produção de mudas em larga escala (MACIEL, 2011).



**FIGURA 1** Modelo de Biorreator de Imersão Temporária – BIT, desenvolvido pela Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Em se tratando da bananeira, os biorreatores de imersão temporária têm apresentado importantes resultados durante a fase de cultivo relacionados especialmente com as etapas de alongamento e enraizamento das mudas (TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA; CID, 2010). Entretanto, algumas diferenças entre as mudas propagadas convencionalmente e as micropropagadas têm sido relatadas na literatura. Portanto, estudos sobre o comportamento das brotações axilares micropropagadas utilizando biorreatores em níveis que incluam análises anatômicas para verificar a deposição de cera epicuticular e diferenciação do mesofilo, observações de feixes vasculares e dos estômatos, além da ocorrência de hiper-hidricidade e variantes somaclonais são importantes já que diversos autores como Romano; Martins-Loução (2003), Costa et al. (2009a) e Oliveira et al. (2014), relatam tais modificações como sendo de extrema relevância e que podem comprometer o cultivo.

## 2.4 ESTUDOS ANATÔMICOS DE MUDAS DE BANANEIRA MICROPROPAGADAS

Embora as técnicas de cultivo *in vitro* sejam comprovadamente eficientes na produção de mudas com certificação genética e fitossanitária, tendo nos últimos 30 anos, sido adotada em diversos países (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004), existem dificuldades e pouco entendimento no que se refere à obtenção de elevadas taxas de sobrevivência em algumas espécies durante a aclimatização. Este fato tem sido diretamente relacionado à capacidade das plantas em se adaptar as amplas variações ambientais após sua transferência *ex vitro* (COSTA, 2007).

Isso ocorre, pois, apesar de suas vantagens, as plantas cultivadas *in vitro* apresentam certas características morfoanatômicas e fisiológicas intrínscas ao ambiente de cultivo, tais como: reduzida deposição de cera epicuticular, cutícula e epiderme pouco espessa, reduzida diferenciação do mesofilo, abundantes espaços intercelulares, feixes vasculares rudimentares, conexão vascular entre raízes e parte aérea deficiente ou inexistente, e deficiente mecanismo estomático (ACUÑA, 1995; CAPELLADES et al., 1990; DONNELLY et al., 1985; ROMANO; SANDOVAL et al., 1994; SANTAMARIA; KERSTIENS, 1994; MARTINS-LOUÇÃO, 2003; COSTA, 2007).

Segundo Sandoval et al. (1994), durante a aclimatização novas folhas surgem, sendo estas mais adaptadas as novas condições e mais eficientes nos processos concernentes ao desenvolvimento vegetal. Embora perdurem por apenas parte do período de aclimatização, estes fatores são comumente reportados como responsáveis pelos elevados índices de perdas durante esta fase, sendo citado como principal fator da mortalidade a excessiva transpiração dos órgãos aéreos (GANGOPADHAY et al., 2002), principalmente as folhas, em razão da deficiência estomática (CAPELLADES et al., 1990; SANTAMARIA; KERTIENS, 1994) e a inadequada absorção de água pelas raízes (ROMANO; MARTINS-LOUÇÃO, 2003).

Algumas estratégias já foram estudadas e adotadas, dentre as quais estão as reduções nos níveis exógenos de carboidratos e da umidade relativa no interior dos frascos (MOHAMMED; VIDAVER, 1990), variações nos níveis de irradiância (DECETTI, 2004; THINGUYEN; KOZAI, 2001), uso da luz natural (COSTA et al., 2009b; ROCHA, 2005; TALAVERA et al., 2005), enriquecimento ambiental com CO<sub>2</sub> (SHIM et al., 2003; THINGUYEN; KOZAI, 2001) e aumento

das trocas gasosas nos recipientes de cultivo (BRAGA, 2006; DECCETTI, 2004). Todas essas técnicas são importantes fatores que, quando bem regulados podem influenciar direta ou indiretamente no desenvolvimento vegetal podendo induzir alterações na anatomia foliar contribuindo para melhor adaptação das plantas ao ambiente externo (WHATLEY; WHATLEY, 1982).

De acordo com Smith et al. (1997) e Lee et al. (2000), as alterações na estrutura foliar podem afetar as plantas de três maneiras: i) pela densidade estomática, forma e espessura do mesofilo foliar, afetando também a resistência a trocas gasosas e assimilação fotossintética; ii) pelo conteúdo e distribuição dos pigmentos, influenciando a eficiência da captação da luz pelas folhas e, conseqüentemente, a fotossíntese e iii) a resistência foliar, reduzindo a suscetibilidade das plantas a danos bióticos e/ou abióticos.

Sendo assim, apesar de muitos trabalhos já terem sido realizados a fim de elucidar os mecanismos que determinam a sobrevivência das plantas cultivadas *in vitro* na aclimatização, são relativamente poucas as espécies estudadas. No que se refere à bananeira onde recentemente novas variedades foram lançadas no mercado e ainda poucos estudos foram realizados com tais genótipos em relação ao seu comportamento durante o processo de micropropagação. Destaca-se ainda, o ineditismo referente aos estudos anatômicos destas variedades produzidas em sistemas de Biorreatores de Imersão Temporária – BIT.

Além disso, a anatomia vegetal tem sido adotada como ferramenta para o entendimento biológico de diversas espécies. Secções transversais de raiz, caule, folhas, entre outros órgãos, podem auxiliar na diferenciação ou mesmo diferenciar espécies dentro de um mesmo gênero podendo ser utilizada também para o entendimento fisiológico (SILVA et al., 2010). Existem evidências de que a relação entre os diâmetros estomáticos polares e equatoriais é importante para determinar o momento de transferir bananeiras ‘Prata-anã’ do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (ROCHA, 2005). Em outros estudos, a microscopia eletrônica permitiu detectar ainda, marcadores morfológicos para distinguir variantes somaclonais de plantas normais em ‘Prata-anã’ (LACERDA et al., 2008), bem como de ter ajudado nos estudos referentes a hiper-hidricidade de algumas espécies lenhosas, como maçã e eucalipto (CHAKRABARTY et al., 2005; PICOLI et al., 2008).

## 2.5 DISTURBIOS MORFO-FISIOLÓGICOS E GENÉTICOS QUE PODEM OCORRER DURANTE O CULTIVO *IN VITRO*

### 2.5.1 HIPER-HIDRICIDADE

Durante a fase de multiplicação por meio da cultura de tecidos vegetais, algumas espécies de *Orchis* (RODRIGUES et al., 2012) podem apresentar distúrbios fisiológicos ou morfológicos em razão do ambiente do cultivo (RADMANN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

Assim, não raramente os explantes em cultivo podem apresentar folhas translúcidas e/ou túrgidas, ou ainda espessadas, alongadas, enrugadas ou enroladas, originando brotações mal formadas quando comparadas à plantas de desenvolvimento considerado normal (GASPAR, 1991; ZIV, 1991; HAZARIKA, 2006). Dessa forma, plantas com algum tipo de anormalidade geralmente não sobrevivem ao transplante quando no momento da aclimatização, o que acarreta perdas significativas no processo de propagação *in vitro*, inviabilizando um programa comercial de produção de mudas (HAZARIKA, 2006).

Dentre os fatores que contribuem para a formação anormal dos explantes cultivados *in vitro* têm-se as altas concentrações de citocinina no meio de cultura, baixas concentrações do agente solidificante, excesso de fatores nutricionais e baixa densidade de fluxo luminoso (RADMANN et al., 2009). Entretanto, vários autores indicam que estas anomalias podem ocorrer com maior frequência em meio líquido (PASQUAL et al., 1991; ŁADYŻYŃSKI et al., 2002; RADMANN et al., 2009).

Assim, apesar dos biorreatores estarem sendo cada vez mais utilizados na produção de mudas de grande número de espécie de interesse comercial (LE MOS et al., 2001; SCHEIDT et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014) e o meio utilizado neste sistema de cultivo apresentar consistência líquida, são ainda restritos os estudos sobre o comportamento das mudas produzidas por meio deste sistema de cultivo (PICOLI et al., 2008), quanto ao manejo ideal da cultura durante o cultivo (OLIVEIRA et al., 2014; CASTRO; GONZÁLEZ, 2002) na tentativa de evitar estresses fisiológicos às plantas.

### 2.5.2 VARIAÇÃO SOMACLONAL

A cultura de tecidos oferece diferentes rotas para a propagação de mudas, tais como: indução de calos, indução de gemas axilares, células em suspensão e cultura de protoplastos (CID; TEIXEIRA, 2010). E a micropropagação, mediante a cultura de ápices caulinares *in vitro*, é uma delas.

Essa modalidade tem sido adotada em muitos países para a produção de mudas de bananeiras. No Brasil, o método vem sendo utilizado de maneira crescente nos últimos anos (ÁLVARES; CALDAS, 2002), especialmente com o surgimento de Biofábricas, empresas especializadas na propagação em larga escala de mudas micropropagadas.

Porém, todos esses métodos apresentam riscos de proporcionar variação genética nas plantas regeneradas. Assim, o surgimento de variação somaclonal tem se tornado um dos principais problemas enfrentados na produção massal de mudas. Tal fenômeno pode ser definido como uma variabilidade genética gerada durante a cultura *in vitro* (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

Em se tratando do cultivo da bananeira as preocupações acerca da ocorrência desses variantes durante o cultivo é fundamentada, principalmente, nas taxas de perdas dos produtores, quando tal material é levado ao campo (ÁLVARES; CALDAS, 2002; SANTOS; RODRIGUES, 2004; LACERDA et al., 2008;). Plantas que apresentam algum tipo de variação somaclonal apresentam um desenvolvimento anormal durante o processo de multiplicação, principalmente relacionado a estatura, cor, forma e arquitetura das folhas e má formação dos cachos (ISRAELI et al., 1991).

Esta variação pode ser um fenômeno inevitável e a simples falta de experiência e conhecimento durante a utilização da técnica de micropropagação pode acarretar no aparecimento inesperado de variantes somaclonais (KARP, 1994; ÁLVARES; CALDAS, 2002). Além disso, Shen et al. (2007) citam que o genótipo tem sua importância, já que cultivares de uma mesma espécie podem apresentar diferentes taxas de variação.

Em bananeira o comportamento dos genótipos ao cultivo *in vitro* tem sido relatado para diferenças nas taxas de variação somaclonal para um mesmo protocolo de multiplicação (SANTOS; RODRIGUES, 2004).

Cid e Teixeira (2010) afirmam que a variabilidade do somaclone pode ter mais probabilidade de ocorrer se o explante não for inicialmente diplóide. Assim,

tanto a bananeira como demais culturas agronomicamente importantes dentre elas a batata, a mandioca e a cana-de-açúcar tem na literatura citações sobre a detecção de diferentes taxas de variação referente à sua natureza poliploide. Ligado a este fator, do ponto de vista da cultura de tecidos, o uso de reguladores de crescimento, como por exemplo, o BAP em altas concentrações, pode favorecer ou mesmo agravar a instabilidade genética dos calos ou material regenerado (GIMENEZ et al., 2001).

Durante o cultivo *in vitro* estudos sobre os fatores que podem influenciar a taxa de variação somaclonal no processo de propagação, descritos por Scowcroft (1984) e George e Sherrington (1984), mostraram que o aparecimento de calos em determinada fase do processo de micropropagação, relaciona-se com a taxa de variação somaclonal, bem como períodos prolongados de cultivo *in vitro*.

O número de subcultivos também é citado por alguns autores tais como Santos et al. (2004) e Rodrigues et al. (1998) como sendo um fator importante no controle da ocorrência de variação somaclonal. Reuveni et al. (1986) sugeriram que o número máximo de plantas de bananeiras obtido a partir de um ápice caulinar deve ser de aproximadamente 1.000 plantas para a cv. Willians (grupo AAA). Krikorian et al. (1993) sem especificar números, sugeriram que possa ocorrer influência do número excessivo de subcultivos *in vitro* no aumento da taxa de variação somaclonal.

Dentre os métodos utilizados na detecção desses variantes nas mudas produzidas *in vitro*, está a observação e avaliação morfo-fisiológica desse material em campo. Entretanto, segundo relatos de Stover (1987), alguns tipos de variações se manifestaram cinco ou seis meses após o plantio ou a floração, o que torna este método ineficaz. O uso de análises moleculares e citogenéticas do material produzido também podem ser realizadas, entretanto, somente uma pequena amostragem das mudas produzidas por meio da microporpagação é analisada, o que diminui a eficiência dos resultados.

Algumas estratégias podem ser usadas para detecção da variação somaclonal durante o cultivo, tais como o uso de marcadores para análise genética que, permitem detectar polimorfismos entre os indivíduos (OLIVEIRA et al., 2007). Além destes, o uso de técnicas de contagem de cromossomos de bananeira também tem sido muito utilizadas. Entretanto, os estudos do cariótipo

têm sido bastante dificultado devido ao tamanho dos cromossomos (CARVALHO, 1995). Neste contexto, a análise por citometria de fluxo tem se tornado uma excelente alternativa aos métodos clássicos de contagem cromossômica (LOUREIRO; SANTOS, 2004) e tem auxiliado nos estudos de instabilidade genética de materiais micropropagados (MSOGOYA et al., 2011; RIBEIRO, 2013).

## 2.6 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida. Tal técnica foi originalmente desenvolvida, no fim dos anos 50 para a contagem e análise de células sanguíneas (LOUREIRO; SANTOS, 2004). A hematologia e a imunologia celular foram indubitavelmente as duas áreas da biologia que impulsionaram o desenvolvimento desta técnica (CÔRTE-REAL et al., 2002).

O fato do citômetro utilizar amostras em forma de suspensão líquida para análise é uma das particularidades que diferencia a citometria de fluxo de outras técnicas de análise quantitativa de núcleos isolados ou cromossomos (e.g. microespectrofotometria), que necessitam da fixação das partículas a uma superfície (e.g. lâmina). Além disso, medição em fluxo permite análises com alta velocidade (e.g.  $10^2 - 10^3$  partículas por segundo) e garante que os citomas analisados sejam selecionados aleatoriamente de toda a população, sem qualquer subjectividade associada (DOLEŽEL, 1997).

Apesar das primeiras análises de citometria terem sido desenvolvidas para atender a uma demanda mais voltada para o estudo das células animais, a necessidade de se obter informações no decorrer dos bioprocessos, envolvendo também, outros organismos, tem contribuído para o aparecimento e utilização de uma grande diversidade de técnicas e ferramentas concebidas para o efeito. Os dados obtidos não só tem permitido aprofundar o conhecimento dos processos, como também o desenvolvimento de novas estratégias (SILVA et al., 2001).



Assim, com a natural evolução técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como células vegetais e microbianas (DOLEŽEL 1997).

A utilização da citometria de fluxo para estudos de células vegetais iniciou a partir dos anos 80, e o número de aplicações tem aumentado continuamente desde então, sendo, hoje em dia, uma técnica rotineiramente usada em vários laboratórios por todo o mundo (DOLEŽEL 1991; DOLEŽEL; BARTOS, 2005). A oportunidade de separar subpopulações de partículas celulares/subcelulares (“cell sorting”) aumentou ainda mais o espectro de aplicações desta técnica (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

Apesar da citometria de fluxo aplicada ao estudo de células e organelas vegetais apresentar ainda algumas limitações, segundo Yanpaisan et al. (1999) esta técnica permite análises rápidas (“real time”) do conteúdo de DNA e RNA, da expressão de transgenes e contagem de células, entre outras aplicações. Associada a outras técnicas citológicas, a citometria de fluxo é considerada uma ferramenta muito importante para o estudo de citomas vegetais.

No que se refere ao estudo da bananeira, a citometria de fluxo já é reconhecidamente uma técnica amplamente utilizada por contribuir nos estudos de avaliação de ploidia, auxiliado no melhoramento genético e na seleção de material para obtenção de novos híbridos (PIO, 2008). Entretanto, a bananeira é um material com altas taxas de ploidia e com um número elevado de material genético recém-lançado no mercado. Por esse motivo, está técnica ainda pode contribuir fortemente com as novas elucidações da cultura, especialmente no que se refere ao material micropropagado. Além disso, a citometria é uma técnica relativamente recente nos estudos de células vegetais onde já foram elencados diversos usos especialmente no que se refere aos estudos de variantes no material micropropagado (MSOGOYA et al., 2011).

## REFERÊNCIAS

ACUÑA, P. I. Micropropagación de banano a partir de ápices vegetativos. **Corbana**, Costa Rica, v. 17, p. 9-12, 1995.

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Orgàn Culture**, Dordrecht, v. 32, p.55-60, 1993.

ÁLVARES, M. do C.; CALDAS, L. S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 415-420, 2002.

ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.

ARIGITA, L. GONZÁLEZ, A. ; TAMÉS, R. S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, p.116-173, 2002.

BARBOZA, S. B. S. C. ; GRACIANO-RIBEIRO, D. ; TEIXEIRA, J. B. ; PORTES, T. A. ; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.

BARROS, A. C. B. Biorreator de imersão temporária aplicado na biofabricação de cana-de-açúcar. In: BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PLANTAS IN VITRO. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 51-69, 2011.

BARROS, M. A. B. ; LOPES, G. M. B. ; WANDERLEY, M. de B. Cadeia produtiva da banana : consumo, comercialização e produção no Estado de Pernambuco. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 39, n. 1, 2008.

BEZERRA, F. C.; ROSA, M. F. **Utilização do pó da casca de coco verde como substrato para produção de mudas de alface**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002, 4 p. (Comunicado Técnico, 71).

BOMFIM, G. V. do. **Efeitos de lâminas e freqüências de irrigação e tipos e**

**volumes de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental.** 2006. 167 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BRAGA, F. T. **Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema gradiflora* Tzvelev cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas.** 2006. 119p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CABRAL, J. B. Sistema de imersão temporária (SIT) na produção em larga escala de vitroplantas. In: BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PLANTAS IN VITRO. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 71-87, 2011.

CALVETE, E. O. Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv. Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). **Substrato para plantas - a base da produção vegetal em recipientes.** Porto Alegre: Genesis, p. 257-264, 2000.

CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata na epidermal cells in tissue-cultured *Rosamultiflora*. **Journal of the American Societyfor Horticultural Science**, Alexandria, V. 115, n. 1, p. 141-`145, 1990.

CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de citogenética em milho (*Zea mays* L.).** 1995. 127 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, O. J. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 62, p. 68-78, 2002.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S. Y.; ALI, M. B.; SHIN, K. S.; PAEK, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, Canadá, v. 26, p. 377-388, 2005.

CID, L. P. B. TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. IN: CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS. (Ed. Tec.) CID, L. P. B. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, p. 51-66, 2010.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, v. 71, p. 19-33, 2002.

COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. de; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2009.

COSTA, F. H. da S.; CASTRO, E. M. de; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OLIVEIRA, C. de. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, v.39, n. 2, 2009a.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; ROCHA, H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; CASTRO, E. M. de; MIYATA, L. Y. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.2, p.303-311, 2009b.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; SANTOS, A. M. dos; CASTRO, E. M. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Modificações na anatomia foliar de bananeiras durante o processo de micropropagação. **Interciencia**, v. 33, p. 663-667, 2008.

COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n.1, p. 41-46, 2007.

COSTA, F. H. da S. **Micropropagação da bananeira: características fitotécnicas, fisiológicas e anatômicas**. 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, 2007.

COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grande Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 280-283, 2006.

COX, E.A.; STOTZKY, G.; GOODS, R.D. In vitro culture of *Musa balbisiana* cola embryos. **Nature**, London, v.185, p.403-404, 1960.

DEBIASI, C. Utilização de biorreatores de imersão temporária em uma biofábrica de cultura de tecidos. In: **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 99-115, 2011.

DECCETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 143-154, 1991.

DOMINGUES, A. R. **Produção de banana ‘Nanicão’ (*Musa sp. AAA*) em clima Cwa.** Piracicaba – SP, 2012, 78p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq, Piracicaba, 2012.

DONATO, S. L. R. **Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa spp.*), em primeiro ciclo de produção no sudoeste da Bahia, região de Guanambi.** Pelotas – RS, 2003, 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes). Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

DONNELLY, D. J.; VIDA VER, W. E.; LEE, K. Y. The anatomy of tissue culture red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n.1,p. 43-50, 1985.

FAO, 2014. **Food and agriculture organization of the united nations.** Disponível em: < [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)> Acesso em: 03 de junho 2014 às 15h23.

FLORES, P. S. **Propagação *in vitro* e *in vivo* de *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae).** 2003, 154f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2003.

FLORES, J.C. de O. **Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira (*Musa spp.*) em quatro ciclos de produção em Cruz das Almas-BA.** 2000. 109p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

GANGOPADHYAY, G., DAS, S., MITRA, S.K., PODDAR, R., MODAK, B.K. AND MUKHERJEE, K.K. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. **Plant Cell Tissue & Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 301-310, 2002.

GASPAR, T. Vitrification in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry – High-tech and micropropagation I.** Berlin: Springer, v. 17, p. 116-126, 1991.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; **A cultura da bananeira na região Norte do Brasil.** Embrapa Informação Tecnológica – Brasília, DF, 2010.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1: the technology.** 2 ed. Edington: Exegetics, 1993. 786 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Plant propagation by tissue culture. In: EXEGETICS. Handbook and directory of commercial laboratories. London: Exegetics, p.51-78, 1984.

GERALD, L. T. S; LEE. L. L. **Biofábrica de plantas: por que biorreator?** In: BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PLANTAS *IN VITRO*. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 14-31, 2011.

GIMENEZ, C.; GARCIA, E. de; ENRECH, N. X.; BLANCA, I. Somaclonal variation in banana: Cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant Cien BTA-03. **In Vitro-Plant**, [New York], v. 37, p. 217-222, 2001.

GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa spp.*). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 28, p. 355-361, 2004.

HARRIS, R. E.; MASON, E. B. B. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid medium. **Canadian J. Plant Science**, v. 63, p. 311-316, 1983.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 105-120, 2006.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura comercial**: propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319 p.

HUANG, P. L.; LIAO, L. J.; TSAI, C. C.; LIU, Z. H. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 73-78, 2011.

IBGE, 2012. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Estudo da produção agrícola, lavouras permanentes: Banana. Disponível em: <[www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php](http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php)>. Acesso em: 10 de janeiro de 2013 às 10h07.

ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; LAHAV, C. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 71-88, 1991.

JESUS, O. N. **Caracterização morfológica e molecular de cultivares de bananeira**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

KARP, A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.7, p.139-151, 1994.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata*) cv. Grande Naine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.55, n.2, p.141-145, 1999.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; BYOUNG, R. J. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

KRIKORIAN, A. D.; IRRIZARRY, H.; CRONAUER, S.; RIVERA, E. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa AAB*) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Annals of Botany*, New York, v.71, p.519-535, 1993.

LACERDA, G. A.; SILVA, J. de O. C. e; ABREU, J. C. de; ALVES, E.; PAIVA, L. V. 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 brasílica**, Brasília, v. 22, n.1, p. 85-90, 2008.

ŁADYŻYŃSKI, M.; BURZA, W.; MALEPSZY, S. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. **Euphytica**, v. 125, n. 3, p. 349-356, 2002.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.60, p.197–214, 1981.

LEÃO, J. R. A.; VASCONCELOS J. de M.; BELTRÃO, R. T.; RAPOSO A.; FERMINO JUNIOR, P. C. P. Micropropagação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.: uma bromélia endêmica da Amazônia Ocidental. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 4, n. 2, p. 117-123, 2014.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H. YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.

LEMONS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, p. 482-487, 2001.



LIMA, J. D.; MORAES, W. da S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 36, n. 3, p. 181-186, 2006.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, p.197-200, 1998.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 77, p. 18-29, 2004.

MACIEL, A. L. de R. **Micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática via biorreator de imersão temporária**. 2011. 114p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras – Lavras- MG, 2011.

MACHADO, J. L. de A. Banana: a musa paradisíaca. A história de um alimento que se tornou ícone. 2006. Disponível em: <http://www.planetaeducacao.com.br/portal/artigo.asp?artigo=1001>. Acesso em 17 de janeiro de 2013 às 10:30.

MARTINS, A. N; FURLANETO, F de P. B. Bananicultura: pesquisas voltadas para agricultura familiar. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, 2008.

MENDES, B. M. J.; MENDES, F. J.; TULMANN NETO, A.; DEMÉTRIO, C. G. B.; PUSKE, O. R. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 12, p. 863-867, 1996.

MOHAMMED, G. H.; VIDA VER, W. E. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 111-117, 1990.

MSOGOYA, T. J.; GROUT, B. W.; ROBERTS, A. Reduction in genome size and DNA methylation alters plant and fruit development in tissue culture induced off-

type banana (*Musa* spp.). **Journal of Animal & Plant Sciences**, 2011. v. 11, n. 3, p. 1450-1456, <http://www.biosciences.elewa.org/JAPS>; ISSN 2071 – 7024.

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

OLIVEIRA, M. L. de; XAVIER, A.; PANCHEL-FILHO, R. M.; REIS, J. P. dos. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 37-45, 2014.

OLIVEIRA, S. O. D.; SAYD, R. M.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 204-209, 2013.

OLIVEIRA, J. P. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Influência genotípica e clonal de genótipos de bananeiras micropropagados a partir de gemas florais masculinas. **Revsta Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 558-563, 2011.

OLIVEIRA, H. S.; LEMOS, O. F.; MIRANDA, V. S.; MOURA, H. C. P.; CAMPELO, M. F.; SANTOS, L. R. R. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa* spp.). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3., p. 369-376, 2011.

OLIVEIRA, J. P. de. **Produção de mudas *in vitro* e ocorrência de microrganismos endofíticos em bananeiras da Amazônia Sul-Ocidental**. 2009. 122 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2009.

OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Ocidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 459-465, 2008.

OLIVEIRA, T. K. de; LESSA, L. S.; SILVA, S. O. e; OLIVEIRA, J. P. de. Características agronômicas de genótipos de bananeira em três ciclos de produção em Rio Branco, AC. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1003-1010, 2008b.

OLIVEIRA, C. A. P. de; PEIXOTO, C. P.; SILVA, S. de O. e; LEDO, C. A. da S.; SALOMÃO, L. C. C. Genótipos de bananeira em três ciclos na zona da Mata Mineira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 173-181, 2007.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. da S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVA, S. de O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 415-420, 1997.

ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.39, p.137-145, 1994.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.

PASQUAL, M. LOPES, P. A.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. de. Influência de 6-benzylaminopurina, sacarose e ágar sobre a vitrificação de brotos de pereira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11/12, p. 1919-1924, 1991.

PEIXOTO, M. J. A.; CARNEIRO, M. S. de S.; SOUZA, P. Z.; DINIZ, J. D. N.; SOUTO, J. S.; CAMPOS, F. de A. P. Desenvolvimento de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., em diferentes substratos, após micropropagação *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n.1, p.17-20, 2006.

PEREIRA, M. R. **Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação de bananeira cv. Williams**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2014.

PICOLI, E. A. T.; PAIVA, E. A. S.; XAVIER, A.; AGUIAR, R. M.; CAROLINO, S. M. B.; FARI, M. G.; OTONI, W. C. Ultrastructural and biochemical aspects of normal and hyperhydric eucalypt. **International Journal of Horticultural Science**, Budapest, v. 14, n. 3, p. 61-69, 2008.

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

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishing, p. 71-93, 1991.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SOUZA, T. M.; FACHINELLO, J. C.; OLIVEIRA, R. P. de. influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GXN-9'. **Scientia Agrária**, Curitiba, v.10, n. 2, p. 095-101, 2009.

RANGEL, A.; PENTEADO, L. A. C.; TONET, R. M. **Cultura da banana**, 2 ed. Campinas, CATI, 2002. 91 p. ilus. 21 cm (Boletim Técnico, 234).

REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; MAESTRI, M.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. M. Crescimento de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis* e *E. cloeziana* sob diferentes níveis de restrição radicular. **Revista Árvore**, Viçosa, v.13, n.1, p.1-18, 1989.

REUVENI, O.; ISRAELI, Y.; DEGANI, H.; ESHDAT, Y. Genetic variability in banana plants multiplied via in vitro techniques. In: INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES MEETING, 1986, Rome. **Resumos...** Rome: IBPGR, 1986. p.36.

RIBEIRO, A. P. **Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira**. 2012, 129 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/fitotecnia concentração em produção Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2013.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”: alterações morfoanatômicas**. 2005, 98p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, 2005.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V. V. H.; DIAS, J. M. M.; OTONI, W. C.; VILLANI, E. M. de A. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.1, p. 9-15, 2012.

RODRIGUES, P. H. V. Produção de mudas em biorreator de imersão temporária: um novo desafio para as biofábricas. In: **BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PLANTAS IN VITRO**. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 89-97, 2011.

RODRIGUES, E. P. **Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inoculado**. 2004, 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciências do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédca, 2004.

RODRIGUES, P.H.V.; TULMANN NETO, A.; CASSIERI NETO, P.; MENDES, B.M.J. Influência do número de subcultivos na ocorrência de variação somaclonal em mudas de bananeira cv. Nanicão, no Vale do Ribeira - SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.20, n.1, p.74-79, 1998.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, p. 57-66, 2005.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of cork oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.616, p.439-442, 2003.

SANDOVAL, J. A.; MÜLLER, L. E.; WEBERLING, F. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) Plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Paris, v. 49, n. 1, p. 37-46, 1994.

SANTAMARIA, J. M.; KERTIENS, G. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 2, p. 191-195, 1994.

SANTOS, D. S. dos. **Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno**. 2009. 133 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SANTOS, C. C. C. dos; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan, **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A. CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1235-1237, 2001.

SCHEIDT, G. N.; ARAKAKI, A. H.; CHIMILOVSKI, J. S.; PORTELLAI, A. C. F.; SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; BIASI, L. A.; SOCCOL, C. R. Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. **Brazilian Archives Biology and Technology**, Curitiba, v.52 n. special: p.37-43, 2009.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; ARARUNA, E. C.; SILVA, T. L.; MESQUITA, A. G. G.; MACIEL, S. A.; COSTA, F. H. S. Double-phase culture system for large

scale production of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 263-269, 2012.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Produção de mudas pré-básicas de batata por estaquia a partir de plantas micropropagadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 185-191, 2004.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. da. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 89-95, 2001.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Desfolhamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada de crescimento durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 135-145, 2000.

SCHMITZ, J. A. K.; SOUZA, P. V. D.; KAMPF, A. N. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 937-944, 2002.

SCOWCROFT, W. R. Genetic variability in tissue culture, impact on germplasm conservation and utilization. In: INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES MEETING, 1986, Rome. **Resumos...** Rome: BPGR, 1984. p.41.

SETUBAL, J. W.; NETO, A. F. C. Efeito de substratos alternativos e tipos de bandejas na produção de mudas de pimentão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 593-594, 2000.

SHEN, X.; CHEN, J.; KANE, M. E. Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, The Hague, v. 91, p. 27-91, 2007.

SHIM, S. W.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock "5BB" as influenced by number of air exchanges and the presence or

absence of sucrose in culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 1, p. 57-62, 2003.

SILVA, S. O.; MATOS A. P.; CORDEIRO, Z. J. M.; LIMA, M. J. C.; AMORIM, E. P. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do mal-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 125-132, 2011.

SILVA, J. de O. C.; LACERDA, G. A.; CASTRO, E. M. de; CHALFUN-JUNIOR, A.; PAIVA, L. V.; OLIVEIRA, C. de. Aplicação de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) e anatomia da epiderme foliar visando à detecção de variantes somaclonais de bananeira *Musa* sp. Colla cv. Prata-anã (Musaceae). **Acta Botânica Brasilica**, Brasília, v. 24, n.1, p. 47-52, 2010.

SILVA, R. M. dos S.; SOUZA, C. D. de; LEMOS, E. E. P. de; REZENDE, L. de P. Controle de contaminantes fúngicos na micropropagação de Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 3, p. 191-197, 2007.

SILVA, E. A. da; BOLIANI, A. C.; CORRÊA, L. de S. Avaliação de cultivares de bananeira (*Musa* sp) na região de Selvíria – MS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 28, n. 1, p. 101-103, 2006.

SILVA, J. V.; BEZERRA, F. C.; HERNANDEZ, F. F. F.; CORDÃO TERCEIRO NETO, C. P.; LEAL, F. R. R. Efeito do substrato na aclimatização de mudas micropropagadas de antúrio. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 4., 2004. Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2004. 364 p.

SILVA, S. O.; PASSOS, A. R.; DONATO, S. L. R.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V.; LIMA NETO, F. P.; LIMA, M. B. Avaliação de genótipos de bananeira em diferentes ambientes. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 24, p. 737-748, 2003.

SILVA, T. L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. C. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim Biotecnológico**, p.32-40, 2001.



SIMONTON, W.; ROBACKER, C.; KRUEGER, S. A programable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.27, p. 211-218, 1991.

SMITH, W. K.; VOGELMANN, T. C.; DELUCIA, E. H.; BELL, D. T.; SHEPHERD, K. A. Leaf form and photosynthesis. **BioScience**, Washington, v. 47, n. 11, p. 785-793, 1997.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação de abacaxizeiro e outras bromélias. In: JUNGHANS, T. G.; D.; SOUZA, A. da S. (Eds.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p. 177-205. 2009.

STEWART, F. C.; CAPLIN, S. M.; MILLAR, F. K. Investigations on growth and metabolism of plant cells. I. New techniques for the investigation of metabolism, nutrition and growth in undifferentiated cells. **Annals of Botany**, London, v. 16, p.57- 77, 1952.

STOTZKY, G.; COX, E.A.; GOOS, R.D. Seed germination studies in Musa. I. Scarification and aseptic germination of Musa balbisiana. **American Journal of Botany**, Massachusetts, v.49, n.5, p.512-520, 1962.

STOVER, R. H. Somaclonal variation in Grande Naine and Saba bananas in the nursery and field. In: PERSLEY, G.J.; DELANGHE, E.A. (Eds.). INTERNATIONAL WORKSHOP ON BANANA AND PLANTAIN BREEDING STRATEGIES, 1986, Cairns. **Proceedings...** Cairns, 1987. p.136-139.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of Begonia x hiemalis plantlets by shake culture. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n.3, p. 461-467, 1981.

TALAVERA, C. CONTRERAS, F.; ESPADAS, F.; FUENTES, G.; SANTAMARIA, J. M. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 3, p. 287-292, 2005.

TAUTORUS, T. E.; LULSDORF, M. M.; KIKCIO & DUNSTAN, D. I. Bioreactor culture of *Picea glauca-engelmannii* (interior spruce) somatic embryos. Growth parameters. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 38, p. 46-51, 1992.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J. V.; ETIENNE, H. In vitro culture by temporary immersion: a new device. **Plantations**, v. 2, n. 5, p.32-33, 1995.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores de imersão temporária – o Futuro da produção industrial de plantas *in vitro*. In: BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PLANTAS IN VITRO. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 33-49, 2011.

TEIXEIRA, J. B.; CID, L. P. B.; Biorreatores para produção de mudas em Larga escala. IN: CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS. (Ed. Tec.) CID, L. P. B. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, p. 157-176, 2010.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais – produção de mudas em larga escala. **Biociência**, São Paulo, V. 4, n. 24, p. 36-41, 2002.

THINGUYEN, Q.; KOZAI, T. Growth of *in vitro* banana (*Musa spp.*) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **In vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 37, n. 6, p. 824-829, 2001.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 72 p. (Boletim Técnico, 174).

TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/CNPH, v. 1, 1998, 864 p. VASIL, I. K.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of cereal and grasses. **Plant cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994, 593 p.

VUYLSTEKE, D. **Shoot-tip culture for the propagation, conservation, and exchange of *Musa* germplasm**. Rome : IBPGR, 1989. 56p. (IBPGR. Practical manual for handling crop germplasm *in vitro*, 2).

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

WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Mount Vernon, v. 108, n. 3, p. 386-389, 1983.

WHATLEY, F. H.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU-EDUSP, 1982. 101 p. (Temas de Biologia, 30).

WILLADINO, L.; CAMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais: cultivo *in vitro* de vegetais**. UFRPE, Departamento de Química, Laboratório de Pesquisa Cultura de Tecidos Vegetais, 2005. Disponível em: <<http://ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 27 de maio de 2006 às 20h02.

YANPAISAN, W.; KING, N.; DORAN, P. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 3-27, 1999.

YOKOTA, S.; KARIM, M. Z.; AZAD, M. A. K.; RAHMAN, M. M. EIZAWA, J.; SAITO, Y.; ISHIGURI, F.; LIZUKA, K.; YAHARA, S.; YOSHIZAWA, N. Histological observation of changes in leaf structure during successive micropropagation stages in *Araliaelata* and *Phellodendron amurense*. **Plant Biotechnology**, Oxford, V. 24, p. 221-226, 2007.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 45-69, 1991.

## CAPÍTULO I

---

### MANUTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE BANANEIRAS PRODUZIDAS EM DOIS DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*

#### RESUMO

A bananeira é suscetível a doenças que ocasionam redução na produtividade da cultura e depreciação dos frutos, causando prejuízos econômicos aos produtores. As principais cultivares de bananeiras cultivadas atualmente não produzem sementes, portanto o estabelecimento de coleções *in vitro* e posterior regeneração é uma estratégia para a manutenção e multiplicação de material de interesse. Objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade de ápices caulinares de variedades de bananeira submetidos ao regime de crescimento mínimo, bem como observar seu posterior comportamento quando cultivados em dois diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Para tanto, após coleta, desinfecção e estabelecimento *in vitro*, ápices caulinares das variedades 'Maravilha', 'Preciosa', 'Japira', 'D'Angola', 'Prata', 'Pacovan Ken' e 'Thap Maeo' foram submetidos a condições de crescimento mínimo, em diferentes temperaturas (20 °C e 25 °C) e concentrações de sais do meio de cultura de MS (MS pleno e ½MS) por até sete meses. Em seguida, o material foi transferido para meio de multiplicação, subcultivado por duas vezes, e utilizadas em experimentos de multiplicação em sistemas de cultivo Semi-Sólido (SS) e Biorreator de Imersão Temporária (BIT) foram testados. Após os subcultivos, as brotações então enraizadas foram avaliadas quanto sua altura, número de folhas, diâmetro do pseudocaule, número de raízes, porcentagem de enraizamento, comprimento da raiz principal e a massa fresca total. Em seguida, o material foi aclimatizado em casa de vegetação, e avaliado quanto à altura, diâmetro do pseudocaule, número de folhas e taxa de sobrevivência. Após sete meses de conservação não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de folhas mortas, porcentagem de raízes formadas, vigor e número de brotações, independentemente do tratamento utilizado. Sob multiplicação, verificaram-se taxas entre 1,1 e 2,5 brotos/explante e quando os sistemas de cultivo SS e BIT foram comparados, houve diferenças significativas para a maioria das variáveis

analisadas. De modo geral, plantas cultivadas em BIT obtiveram incremento em altura, comprimento de raízes e massa fresca entre todas as variedades estudadas. O índice de enraizamento *in vitro* das brotações foi de 100% em ambos os sistemas de cultivo e a sobrevivência das mudas em casa de vegetação foi superior 70%. Conclui-se que é possível conservar explantes de bananeira por até sete meses usando meio de cultura de MS pleno e temperatura de 20 °C. Após sete de meses de conservação em regime de cultivo mínimo a taxa de multiplicação das variedades estudadas não é afetada. Não há influência negativa quanto ao desenvolvimento de plantas de bananeira obtidas em sistema BIT de cultivo durante processo de aclimatização.

**Palavras-chave:** *Musa* sp., Crescimento mínimo, Biorreator de Imersão Temporária.

## CHAPTER I

---

### MAINTENANCE, MULTIPLICATION AND ACCLIMATIZATION OF BANANA PLANTS PRODUCED IN TWO DIFFERENT TYPES OF IN VITRO CULTIVATION SYSTEMS

#### ABSTRACT

The banana plants are susceptible to diseases that cause reduction in productivity and fruits depreciation, factors that economically harm producers. Commercial banana cultivars do not produce seeds. Therefore, the establishment of *in vitro* collections and further regeneration is a strategy for the maintenance and fast multiplication when necessary. The objective of this study was assess the viability in maintain shoots under minimum growth regime, and observe its subsequent behavior when multiplied in two different *in vitro* systems. To do so, after collect, disinfection and *in vitro* establishment, banana shoot apices of the varieties 'Maravilha', 'Preciosa', 'Japira', 'D'Angola', 'Prata', 'Pacovan Ken' and 'Thap Maeo' were submmited to conditions of minimal growth, in different temperatures (20 °C and 25 °C) and salt concentration of the MS culture medium (full and half strength) for up to seven months. Then, the material was transferred to a multiplication medium where was multiplied by two subcultures, prior to be used used in the multiplication experiments using Semi-Solid culture systems (SS) and Temporary Immersion Bioreactor (TIB). After the subcultures, the shoots were rooted and evaluated for height, number of leaves and roots, pseudostem diameter, rooting percentage, length of the main root and the total fresh mass. Then, the material was acclimatized in greenhouse, and evaluated in terms of height, pseudostem diameter, number of leaves and survival rate. After seven months of *in vitro* manutention no significant differences were observed about the number of dead leaves, percentage of roots formed, vigor and number of shoots, regardless of the treatment used. On multiplication, it was found rates between 1.1 and 2.5 shoots per explant and when the SS and TIB systems were compared, significant differences were observed for most of the analyzed variables. In general, plants from TIB obtained greater increse in height, root length and fresh mass. The rooting rate of the shoots reached 100% in both culture systems and the survival of the plantlets in greenhouse was higher

than 70%. It is concluded that it is possible to maintain banana shoots for up to seven months in full strength MS medium at 20 °C. After seven months of *in vitro* maintenance, the multiplication rate of the studied varieties is not affected. There is no negative influence on the development of banana plants obtained in TIB cultivation system during acclimatization process.

**Keywords:** *Musa* sp., Minimal growth, Bioreactor of Temporary Immersion.

## 1 INTRODUÇÃO

A bananeira é suscetível a um grande número de doenças que reduzem a produtividade da cultura e depreciam os frutos, causando prejuízos econômicos aos produtores. Entre as principais doenças, destacam-se o mal-do-panamá, a sigatoka amarela e a sigatoka negra (MARÍN et al., 2003). Aliado ao processo de erosão genética, estas doenças podem acelerar o processo de extinção de algumas variedades comerciais de bananeira, situação que torna os programas de conservação uma importante ferramenta para impedir que esta variabilidade seja perdida (NOFIARLI, 2013).

As principais cultivares de bananeiras comerciais não produzem sementes e, portanto, a principal estratégia de conservação de germoplasma da espécie se dá em campo, um procedimento oneroso e que, tem como fator de risco, possíveis ataques de pestes e doenças, bem como a ocorrência de fatores climáticos adversos que resultam em perda de material vegetal (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010). Dessa maneira, aliada aos bancos de conservação em campo, o estabelecimento de coleções *in vitro*, utilizando-se propágulos provenientes de meristemas é, sem dúvida uma importante estratégia para garantir a efetividade da conservação da variedade genética da bananeira (VAN DE HOUWE et al., 1995).

Entre as técnicas de conservação de germoplasma da bananeira, a conservação *in vitro* por técnicas de crescimento mínimo é um dos métodos mais vantajosos em relação às outras técnicas, devido aos relativos baixos custos de implantação e a facilidade de monitoramento das coleções, além de facilitar o intercâmbio de materiais entre instituições de pesquisas (AGRAWAL et al., 2010). O princípio fundamental das técnicas de crescimento mínimo constitui-se na redução do metabolismo da planta, retardando o seu crescimento e aumentando o intervalo entre os subcultivos, sem que isso afete a viabilidade e a capacidade regenerativa das plantas (SANTOS, 2014).

Para propagação *in vitro* da bananeira, diversos métodos capazes de promover a multiplicação e obtenção de elevado número de mudas tem sido utilizados, dentre os quais, destaca-se o método que utiliza meios de consistência semi-sólida (RIOS et al., 2008; OLIVEIRA, 2009; COSTA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

Entretanto, um dos fatores limitantes deste método é o elevado custo



empregado com os constituintes do meio de cultura, especialmente com agentes geleificantes, para sua produção (CAMOLESI et al., 2010). Assim, pesquisas têm sido realizadas de modo a tornar mais factíveis e menos onerosos os processos de multiplicação *in vitro* (DINIZ et al., 1999; KODYM; ZAPATA-ARIAS, 2001; BERNARDI et al., 2004; MADHULATHA et al., 2004; ERIG; SCHUCH, 2005).

O uso de Biorreatores de Imersão Temporária têm sido empregado com frequência para este fim e em várias espécies de plantas (ESCALONA et al., 1999; ZIV, 1999; PAEK et al., 2001, SILVA et al., 2007), constituindo-se como uma ferramenta de grande potencial para aumento da taxa de multiplicação e significativa redução do custo de produção de mudas, seja pela redução de mão-de-obra nas etapas de manipulação, ou pelo uso de meio de consistência líquida. Segundo Camilesi et al. (2010), a consistência do meio de cultivo pode ser um dos fatores de diminuição dos custos de produção. CALDAS et al. (1998) observaram que o meio líquido normalmente exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante. Os mesmos autores observaram que, em meios semis-sólidos, pode ocorrer a formação de gradientes na distribuição de nutrientes com o crescimento dos tecidos, o que não acontece em meios líquidos. De acordo com Debiasi (2011), Biorreatores de Imersão Temporária são vantajosos como equipamentos de multiplicação de plantas, por proporcionarem aumentos da taxa de multiplicação, economia de mão-de-obra e, tempo, e conseqüente redução dos custos de produção, devido ao seu sistema semi-automatizado.

Entretanto, apesar de suas aparentes vantagens, ainda é incipiente o conhecimento sobre o uso dos Biorreatores de Imersão Temporária para diversas culturas, como a bananeira. Além disso, Rodrigues (2006) relata que o desenvolvimento de novos protótipos de imersão temporária, bem como o estudo de seu funcionamento em diferentes culturas é fundamental para tentar reduzir custos, aumentar a produtividade e manter a qualidade genética do material vegetal submetido a essa técnica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de ápices caulinares de variedades de bananeira submetidos ao regime de crescimento mínimo, bem como analisar seu posterior comportamento quando cultivado em diferentes sistemas de cultivo após sete meses de conservação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Cultura de Tecidos II e anexos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF.

Para os estudos de aclimatização e avaliação das mudas micropropagadas foi utilizada a casa de vegetação medindo aproximadamente 10 x 4 m, recoberta com plástico agrícola (sombrite 70%), sistema de circulação de ar automatizado, com  $27\pm 4$  °C de temperatura e 70 a 80% de umidade relativa.

### 2.1 Coleta e estabelecimento *in vitro* do material vegetal

Os materiais propagativos utilizados em todos os experimentos foram coletados da Coleção de Trabalho de Bananeiras da Embrapa Acre, Rio Branco, AC, no ano de 2008. As variedades coletadas e usadas para o estabelecimento *in vitro* foram: 'Maravilha' – CCG1 (FHIA 01 AAAB), 'Preciosa' – CCG2 (PV42-85 AAAB), 'Japira' – CCG3 (PV42.142 AAAB), 'D'Angola' – CCG5 (AAB), 'Prata' – CCG6 (AAB), 'Pacovan Ken' – CCG7 (PV42-68 AAAB) e 'Thap Maeo' – CCG8 (AAB). Entre as sete variedades utilizadas nos estudos, cinco foram selecionadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura para plantios no Estado do Acre (SIVIERO et al., 2006), sendo as bananeiras 'D'Angola' e 'Prata' incluídas nos experimentos devido sua importância e preferência do consumidor local.

Após a coleta dos ápices caulinares em campo foram realizadas três desinfestações: a primeira em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por uma hora, sendo, em seguida, realizada uma pré limpeza do material para eliminar o excesso do pseudocaule. Posteriormente fez-se nova desinfestação por 30 minutos ainda em NaOCl a 1% passando, então, para a câmara de fluxo laminar onde foi feita nova desinfestação com hipoclorito de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) a 1% por 10 minutos. Após cada desinfestação, realizou-se o enxágue dos explantes em água destilada e autoclavada por três vezes consecutivas.

Uma vez desinfestados, os materiais propagativos foram reduzidos a aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup> e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Em

seguida os cultivos foram transferidos para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde foram mantidos por 30 a 40 dias de cultivo em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e, intensidade luminosa de  $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Após esse período, o material propagativo não contaminado foi induzido à multiplicação inicial, dividindo-se os ápices caulinares ao meio e transferindo-os para frascos de 250 mL de capacidade, com 30 mL de meio cultura de MS, adicionado de  $2,5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP ( $\text{N}^6$  – Benzilaminopurina), nas mesmas condições ambientais *in vitro* descritas acima.

## 2.2 Conservação de germoplasma sob condições de crescimento mínimo

Para este experimento foram utilizados como fonte de explantes, ápices caulinares das sete variedades de bananeiras já mencionadas, sendo realizada uma subdivisão para multiplicação inicial do material.

Inicialmente, visando adequar uma metodologia para a manutenção e conservação *in vitro* baseando-se na redução da concentração de sais do meio de cultura de MS e na temperatura da câmara de conservação, ápices caulinares das variedades de bananeira foram estabelecidos em duas concentrações dos sais do meio de cultura de MS (MS pleno e  $\frac{1}{2}\text{MS}$ ), suplementado com  $0,5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP,  $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $5,0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ágar. Em seguida, os ápices foram acondicionados sob intensidade luminosa de  $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas e temperaturas de  $20\ ^{\circ}\text{C}$  e  $25\ ^{\circ}\text{C}$ . O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com pelo menos seis repetições por tratamento. Cada repetição foi formada por um tubo de ensaio (25 x 150 mm), preenchido com 10 mL de meio de cultura e um ápice caulinar.

Os materiais propagativos foram mantidos nesta condição por sete meses, sendo, em seguida, avaliados quanto à taxa de sobrevivência (%), altura de plantas (cm), número de folhas vivas e mortas, enraizamento (%), consumo de meio de cultura, além do vigor e número de brotações formadas.

Posteriormente, o material foi então subcultivado por duas vezes sucessivas em meio de multiplicação, a fim de se obter número de brotações suficiente para manutenção em Banco de Germoplasma *in vitro* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF, bem como para montagem de experimentos de multiplicação.

Cada subcultivo da etapa de multiplicação durou aproximadamente 40 dias, sendo que ao final de cada período, a taxa de multiplicação do material foi contabilizada a fim de verificar o comportamento proliferativo dos explantes.

### 2.3 Multiplicação clonal *in vitro* de bananeiras em sistemas de cultivo Semi-Sólido e em Biorreator de Imersão Temporária

Devido à quantidade de material obtido, para este experimento apenas brotações de bananeira das variedades 'Japira', 'D'Angola', 'Pacovan Ken' e 'Thap Maeo', oriundas do terceiro subcultivo após o período de manutenção foram utilizadas.

Para a multiplicação do material foram testados dois diferentes sistemas: Semi-Sólido – SS e Biorreator de Imersão Temporária – BIT (TEIXEIRA, 2002).

O meio de cultura utilizado para a multiplicação das brotações em todos os sistemas foi o MS, acrescido de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP (COSTA et al., 2011). No sistema SS o meio foi solidificado com  $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$  de Phytigel, enquanto que em BIT foi utilizado apenas meio líquido.

Durante todas as etapas do cultivo, em sistema SS o material foi mantido em frascos de 250 mL de capacidade, contendo 30 mL de meio de cultura. Já em BIT os explantes permaneceram em frascos de 5.000 mL de capacidade, contendo 300 mL de meio líquido. O sistema BIT é constituído por dois frascos conectados por tubos de silicone, onde em um dos frascos fica contido o meio de cultura e no outro ocorre o cultivo dos explantes (TEIXEIRA, 2002). Nesse sistema, o ar fornecido por um compressor é esterilizado por uma membrana de  $0,22 \mu\text{m}$ , entra no frasco que contém o meio de cultura e faz com que o líquido chegue ao outro frasco que contém os explantes. Após um tempo de imersão, ocorre reversão do processo: o meio nutritivo retorna para seu frasco. A frequência e o tempo de imersão são controlados por "timers" eletrônicos e válvulas solenóides (ESCALONA et al., 1999). O tempo de imersão pode variar e o ar promove a renovação da atmosfera do frasco. Neste estudo, o sistema de imersão foi acionado por meio de um Timer<sup>®</sup> e os explantes imersos a cada 6 horas por 3 minutos.

Uma vez em meio de cultura as brotações foram mantidas em sala de crescimento com, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade

luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares brancas frias. As brotações permaneceram nestas condições por dois subcultivos sucessivos com duração de, aproximadamente, 40 dias cada.

Durante a multiplicação, o material propagativo cultivado em sistema SS foi subdividido a cada subcultivo, enquanto que, em sistema BIT foi realizada apenas a substituição do meio líquido. Passado então, o período de multiplicação, as brotações foram transferidas para meio de enraizamento conforme descrito no item 2.3.1.

### 2.3.1 Enraizamento das brotações produzidas em diferentes sistemas de cultivo

O enraizamento das brotações formadas *in vitro* foi realizado em meio de cultura de MS desprovido de regulador de crescimento, por um período de, aproximadamente, 40 dias. Assim como na etapa de multiplicação, em sistema de cultivo SS o meio de cultura foi geleificado com  $1,8 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel, enquanto que em BIT foi utilizado meio líquido.

Independente do sistema de cultivo, o meio de cultura teve o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ , sendo em seguida esterilizado por 15 minutos, a  $121^\circ\text{C}$  e  $1,3 \text{ atm}$  de pressão. Durante a etapa de enraizamento o material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares brancas frias.

Após o período de enraizamento, as plantas foram retiradas do meio e lavadas em água corrente para eliminar o excesso do meio de cultura aderido às raízes. Em seguida, as mudas foram avaliadas quanto sua altura (cm), número de folhas, diâmetro do pseudocaulo (mm), número de raízes, enraizamento (%), comprimento da raiz principal (cm) e a massa fresca total (g). Posteriormente, o número de plantas total obtido em cada sistema e a taxa de multiplicação também foram contabilizados.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial  $2 \times 4$  (2 sistemas de cultivo e 4 variedades), com pelo menos 6 repetições por tratamento. Em razão dos diferentes sistemas de cultivo apresentarem frascos com capacidades diferentes e para padronizar a relação brotos/meio de cultura foi mantida uma relação equivalente de 10 mL de meio de cultura por

brotação. Dessa forma, cada frasco em sistema de cultivo SS e BIT recebeu 3 e 30 brotações/frasco, respectivamente.

## 2.4 Aclimatização das plantas produzidas nos diferentes sistemas de cultivo

Após o enraizamento, as plantas de bananeira foram transferidas para viveiro e acondicionadas em bandejas plásticas de aproximadamente 37,5 x 59 cm, contendo 60 células de 90 cm<sup>3</sup>, suspensas cerca de 20 cm do solo do viveiro e preenchidas com substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. As plantas foram mantidas sob sombrite (50% de interceptação solar), em casa de vegetação a 27±4°C e entre 70 e 80% de umidade relativa.

A irrigação das plantas foi feita diariamente por meio de regas manuais. Nestas condições a altura das plantas (cm), o diâmetro do pseudocaulo (mm), o número de folhas e a taxa de sobrevivência das plantas (%) foram avaliados quinzenalmente, durante 60 dias. Durante todo o período de crescimento e avaliação das plantas não foram realizados tratamentos fitossanitários.

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas utilizando-se nas parcelas os sistemas de cultivo (SS e BIT) e nas subparcelas as variedades de bananeira em estudo, com quatro repetições e seis plantas por parcela.

## 2.5 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dados expressos em contagem foram transformados segundo  $\sqrt{X} + 0,5$ .

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Manutenção de germoplasma sob regime de cultivo mínimo

Os valores médios apresentados na Tabela 1 mostram que entre os genótipos não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de folhas mortas, percentagem de raízes formadas, vigor e número de brotações,

independentemente das concentrações de sais do meio de cultura de MS e temperaturas utilizadas.

Além disso, os dados observados quanto à sobrevivência do material, de modo geral, indicam que todos os genótipos estudados apresentaram potencial para serem conservados *in vitro*. A menor taxa de sobrevivência média foi de 75,0% e 58,8% observada quando as brotações foram submetidas à temperatura de 25 °C em MS e ½MS, sendo que em 20 °C a sobrevivência foi de 100% dos genótipos, especialmente quando estes foram mantidos em meio de cultura de MS pleno. Quando se avaliou os genótipos individualmente, verificou-se que apenas a variedade 'D'Angola' apresentou um índice de 16,7%, valor significativamente menor de plantas vivas ao final de sete meses de conservação, quando mantida em meio de cultura de MS à 25 °C. Estes resultados corroboram com os obtidos por Sandoval e Müller (1989) que trabalhando com explantes de bananeira observaram que quando a temperatura usada foi em torno de 15 °C foi possível conservar os explantes viáveis por até 17 meses.

Quanto à altura das brotações, o menor valor médio observado foi de 3,4 cm no tratamento ½MS à 20 °C, o qual diferiu significativamente do tratamento em MS à 25 °C, que promoveu maior crescimento das brotações, que chegaram a 5,1 cm independentemente da variedade estudada (Tabela 1). Withers (1991) sugere a redução da temperatura entre 15 e 25 °C para culturas de clima tropical quando o objetivo é diminuir o crescimento dos explantes cultivados *in vitro*. Lemos et al. (2002), trabalhando com conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar sob diferentes temperaturas afirmam ainda, que temperaturas mais amenas no cultivo *in vitro* são capazes de reduzirem a ação de enzimas e o metabolismo geral das plantas. Com isso a redução da temperatura promove crescimento mais lento dos explantes sem, contudo, provocar-lhes danos fisiológicos, o que pode explicar também a alta taxa de sobrevivência das plantas conservadas a 20 °C observada neste estudo.

Na temperatura de 20 °C a quantidade de meio consumido foi significativamente menor que à 25 °C, o que possibilitou a conservação por tempo superior à 240 dias, sem a necessidade de transferência para novo meio de cultura (Figura 1).

Uma discussão mais específica relacionada a este estudo infere que a temperatura seja o fator de maior relevância durante a etapa de conservação do

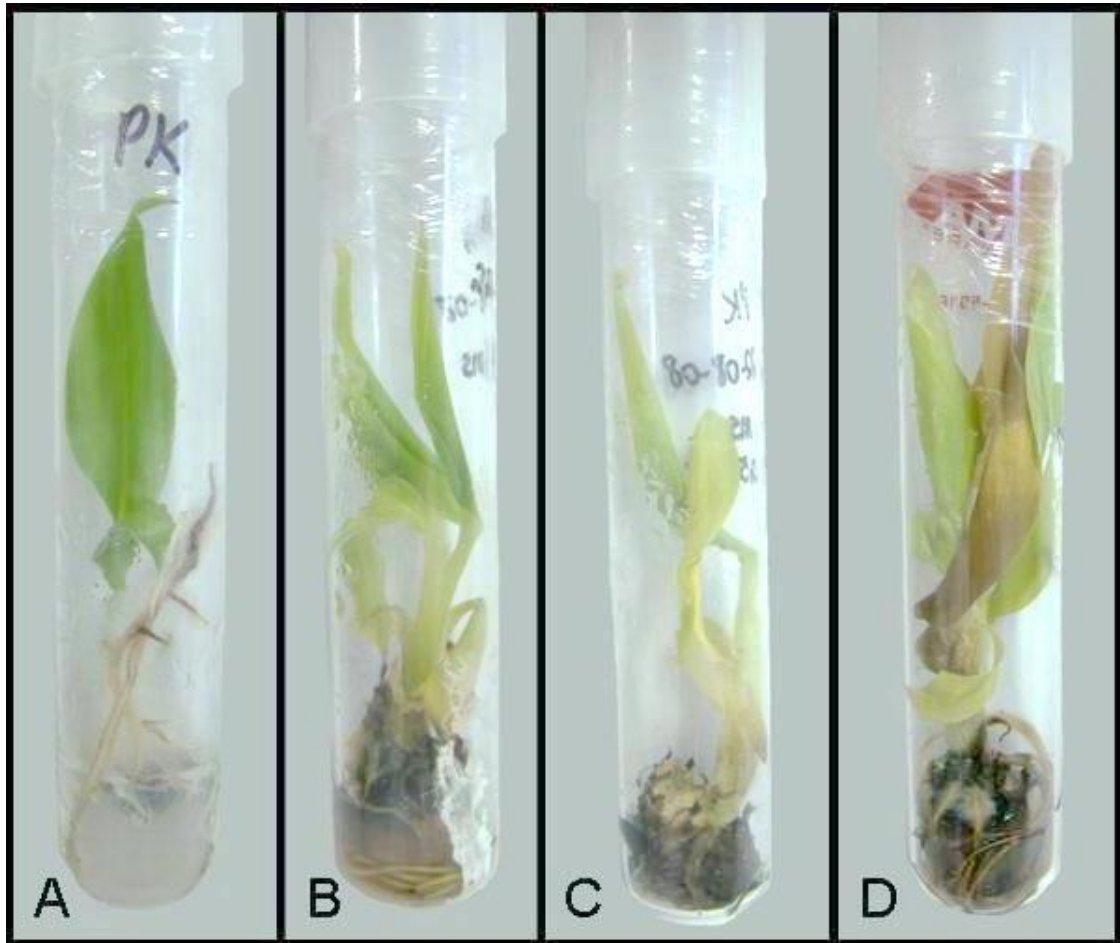
material vegetal de bananeira *in vitro*. Tal afirmativa está fundamentada na observação dos resultados que apresentaram diferenças significativas, especialmente no que se refere à taxa de sobrevivência, altura de plantas e consumo de meio entre os tratamentos. Quando submetidos à 20 °C, independentemente da concentração de sais de MS, as plantas apresentaram menores valores para altura por redução de seu metabolismo refletindo, assim, em menor consumo do meio e maior sobrevivência do material vegetal, sem afetar seu vigor, formação de novas brotações e emissão de folhas novas.



**TABELA 1** Características morfológicas de variedades de bananeira durante sete meses, sob condições de crescimento mínimo

Meio*	Temp. °C	Variedades**							Média	
		TM	PT	MA	PR	D'A	JP	PK		
Sobrevivência (%)										
MS	20	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100,0 a
	25	75,0 aA	66,7 bA	100 aA	83,3 aA	16,7 bB	100 aA	100 aA	100 aA	75,0 b
½ MS	20	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	83,3 aA	83,3 aA	97,6 a
	25	60,0 aA	40,0 bA	50,0 bA	60,0 aA	75,0 aA	60,0 bA	66,7 aA	66,7 aA	58,8 c
Altura (cm)										
MS	20	5,7 aA	1,5 bA	4,7 aA	2,9 aA	3,9 aA	5,1 aA	2,9 aA	2,9 aA	3,8 b
	25	5,1 aA	4,5 aA	4,9 aA	4,6 aA	5,1 aA	6,5 aA	5,2 aA	5,2 aA	5,1 a
½ MS	20	2,5 bA	5,6 aA	2,7 aA	1,7 aA	3,7 aA	4,6 aA	2,9 aA	2,9 aA	3,4 b
	25	1,6 bB	5,9 aA	4,6 aA	2,2 aB	2,3 aB	5,4 aA	4,3 aA	4,3 aA	3,8 b
Nº de Folhas Vivas										
MS	20	4,8 aA	1,8 aA	3,2 aA	2,7 aA	2,7 aA	3,4 aA	1,9 aA	1,9 aA	2,9 a
	25	3,8 aA	2,7 aA	3,3 aA	2,9 aA	0,2 bB	3,8 aA	2,7 aA	2,7 aA	2,8 a
½ MS	20	4,8 aA	1,8 aA	3,2 aA	2,7 aA	2,7 aA	3,4 aA	1,9 aA	1,9 aA	2,9 a
	25	1,3 aA	1,8 aA	1,5 aA	1,6 aA	1,0 bA	1,6 bA	2,6 aA	2,6 aA	1,6 b
Nº de Folhas mortas										
MS	20	1,3 aA	1,7 aA	1,5 aA	1,2 aA	2,0 aA	1,4 aA	1,2 aA	1,2 aA	1,5 a
	25	1,5 aA	2,0 aA	3,0 aA	0,9 aA	0,8 bA	2,1 aA	2,0 aA	2,0 aA	1,8 a
½ MS	20	1,3 aA	1,6 aA	0,9 aA	1,2 aA	2,1 aA	1,7 aA	0,8 bA	0,8 bA	1,4 a
	25	1,4 aA	1,2 aA	2,0 aA	1,0 aA	0,7 bA	2,2 aA	2,1 aA	2,1 aA	1,5 a
Raízes (%)										
MS	20	100 aA	40,0 aA	100 aA	66,7 aA	57,1 bA	83,3 aA	50,0 aA	50,0 aA	71,0 a
	25	75,0 aA	66,7 aA	100 aA	33,3 aA	100 aA	83,3 aA	100 aA	100 aA	71,3 a
½ MS	20	66,7 aA	83,3 aA	60,0 aA	12,5 bA	100 aA	62,5 aA	50,0 aA	50,0 aA	62,1 a
	25	60,0 aA	40,0 aA	50,0 aA	60,0 aA	25,0 bA	60,0 aA	80,0 aA	80,0 aA	53,6 a
Absorção de Meio de cultura (%)										
MS	20	45,6 aA	52,8 aA	33,6 bA	42,0 bA	64,2 aA	37,1 aA	46,7 aA	46,7 aA	46,0 b
	25	5,5 bA	16,7 bA	23,5 bA	19,7 cA	7,0 bA	15,8 bA	19,5 bA	19,5 bA	15,4 c
½ MS	20	71,3 aA	62,7 aA	69,6 aA	70,5 aA	68,7 aA	49,2 aA	51,7 aA	51,7 aA	63,4 a
	25	11,0 bA	11,6 bA	11,0 bA	9,6 cA	2,5 bA	26,8 bA	21,3 bA	21,3 bA	13,4 c
Vigor										
MS	20	2,7 aA	1,0 bA	2,3 aA	2,0 aA	2,2 aA	2,7 aA	2,0 aA	2,0 aA	2,1 a
	25	2,7 aA	2,6 aA	2,7 aA	2,0 aA	1,5 aA	3,0 aA	3,0 aA	3,0 aA	2,5 a
½ MS	20	1,8 aA	3,1 aA	1,8 aA	1,8 aA	2,0 aA	2,4 aA	1,9 aA	1,9 aA	2,1 a
	25	1,3 aA	2,0 bA	1,7 aA	1,2 aA	1,2 aA	2,0 aA	2,1 aA	2,1 aA	1,7 a
Nº de brotações										
MS	20	1,4 bA	2,6 aA	1,8 aA	2,3 aA	1,7 aA	1,8 aA	1,6 aA	1,6 aA	1,9 a
	25	1,2 bA	1,3 aA	1,2 aA	2,0 aA	1,0 aA	1,6 aA	2,1 aA	2,1 aA	1,5 a
½ MS	20	1,3 bA	1,3 aA	1,8 aA	3,0 aA	1,6 aA	1,7 aA	0,8 bA	0,8 bA	1,6 a
	25	3,0 aA	1,0 aB	1,0 aB	2,2 aA	2,0 aA	1,0 aB	1,1 bB	1,1 bB	1,6 a

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. \*Meios: MS=Meio de MS pleno, ½MS=Meio de MS reduzido a 50% de seus saís; \*\*Variedades: TM='Thap Maeo', PT='Prata', MA='Maravilha', PR='Preciosa', D'A='D'Angola', JP='Japira', PK='Pacovan Ken'.



**FIGURA 1** Aspecto de plantas de bananeiras, variedade ‘Pacovan Ken’, conservadas *in vitro* durante 240 dias. A e B. plantas conservadas a 20 °C em meio de cultura de  $\frac{1}{2}$ MS e MS, respectivamente; C e D. plantas conservadas a 25 °C em meio de cultura de  $\frac{1}{2}$ MS e MS. Imagem destaca ainda a comparação do consumo de meio de cultura nos tubos.

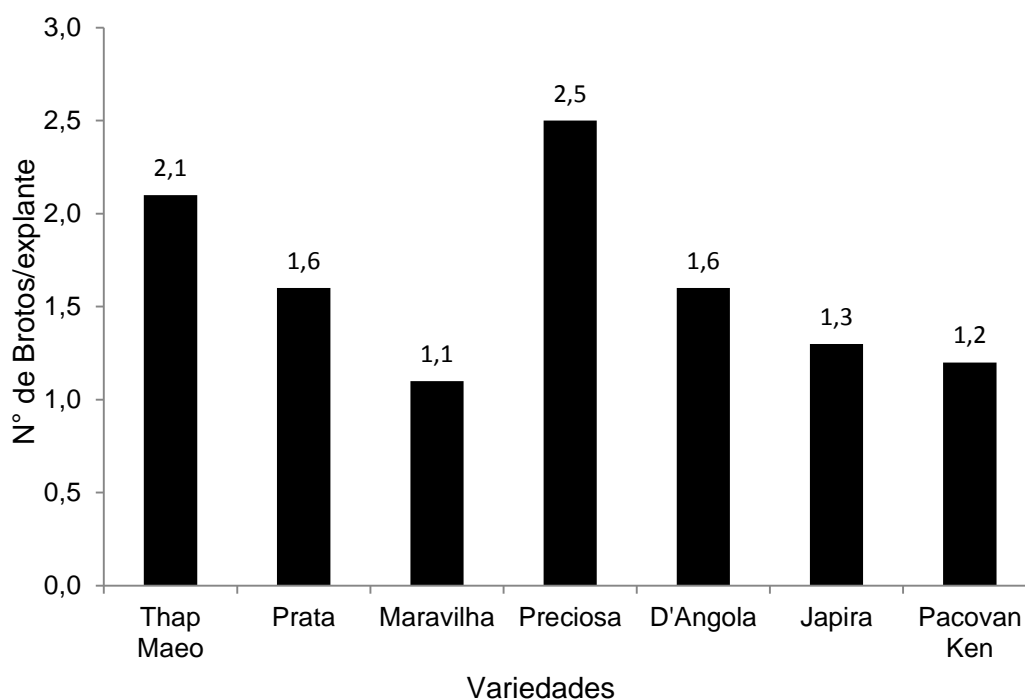
Embora a conservação *in vitro* da maioria das espécies tropicais seja realizada à temperatura de 15 a 20 °C é necessário definir fatores, como a composição do meio de cultura, a temperatura da sala de conservação e o período de transferência entre os subcultivos para maximizar a eficiência de conservação (OLIVEIRA et al., 2000). Segundo Oliveira et al. (2000), é possível conservar *in vitro* acessos diplóides de bananeira por até 450 dias à temperatura de 17 °C, sem a necessidade de subculturas durante este período.

Como já mencionado, além da diminuição da temperatura, modificações na composição do meio de cultura, também são alternativas à conservação *in vitro* de germoplasma. No que se refere à conservação de acessos de bananeira,

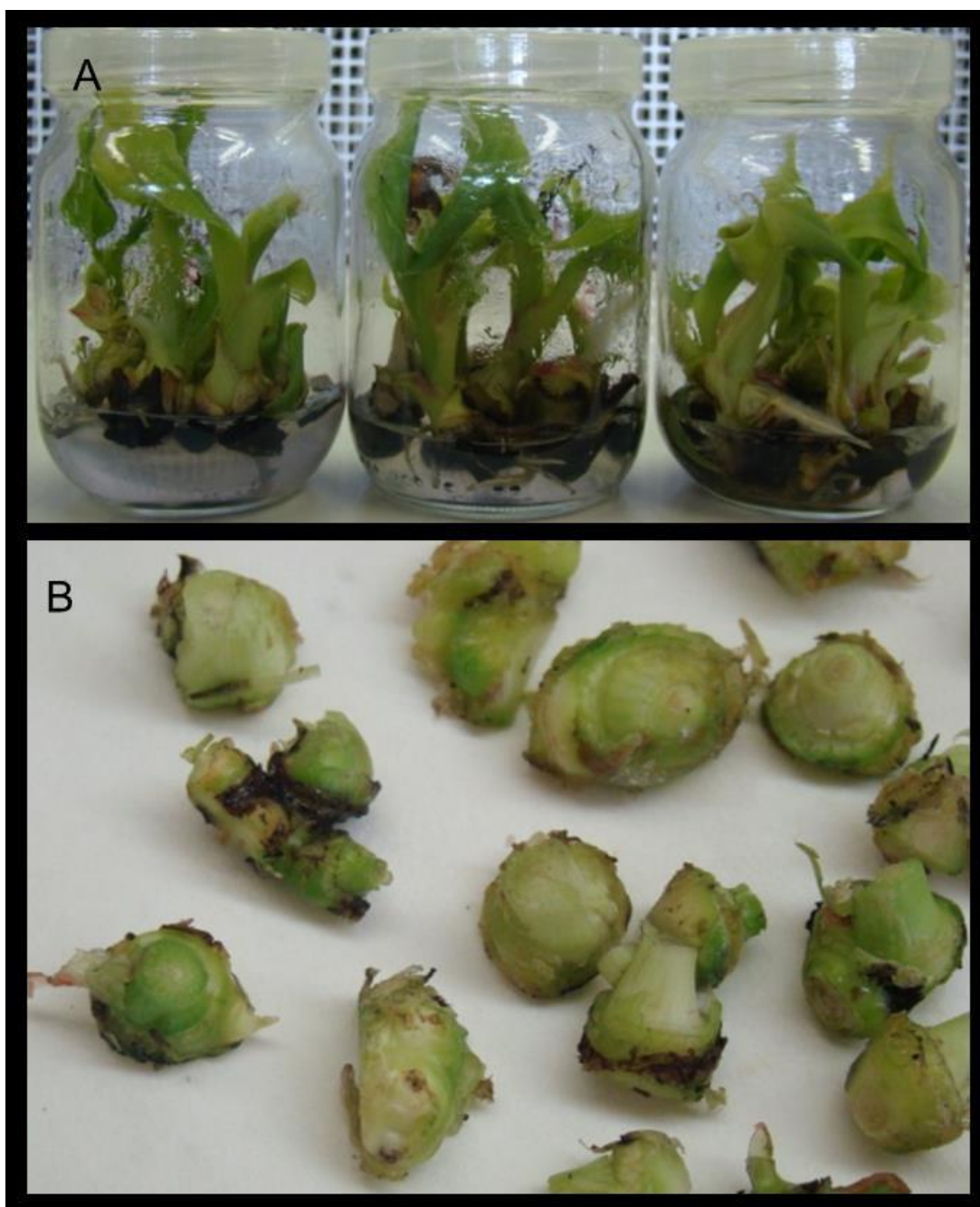
Nofiarli (2013) conseguiu conservar por um período de nove meses, gemas de banana cv. Ambon Kuning, pela redução de 50% dos sais de MS e com aumento da concentração de sacarose (6%). A ensete ou falsa bananeira, também pertencente à família Musaceae, muito utilizada como fonte de alimento na Etiópia, foi testada quanto à conservação *in vitro* utilizando gemas, as quais foram mantidas durante seis meses à 15 °C em meio de cultura contendo manitol (NEGASH et al., 2001).

Comparando os valores referentes à taxa de multiplicação do material com valores relatados por outros autores, observou-se que não houve influência negativa do tempo de conservação, temperatura e/ou concentração salina do meio, na capacidade proliferativa das plantas. Essas mantiveram valores médios para taxa de multiplicação variando entre 1,1 e 2,5 brotos/explante (Figura 2). Oliveira (2009) descreveu uma taxa de multiplicação de até 2,4 brotos/explante em material de bananeira micropropagado que não foi submetido ao processo de conservação.

O vigor e o aspecto geral das mudas e dos brotos formados após os sete meses de conservação em sistema de cultivo mínimo, podem ser observados na Figura 3.



**FIGURA 2** Taxa de multiplicação de variedades de bananeira aos sete meses de conservação *in vitro*. Médias referentes a dois subcultivos sucessivos.



**FIGURA 3** Aspecto de bananeiras variedade Thap Maeo em meio de multiplicação, após conservação. A. Aspecto das mudas em meio de cultura de MS semi-sólido sob multiplicação; B. Propágulos utilizados como fonte de explantes em sistemas de cultivo: SS e BIT.

### 3.2 Multiplicação clonal *in vitro* de bananeiras em sistemas de cultivo Semi-Sólido e em Biorreatores de Imersão Temporária

O comportamento *in vitro* das brotações axilares conservadas foi avaliado em dois diferentes sistemas de cultivo e os dados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Observou-se diferença significativa para variável altura de plantas entre os sistemas de cultivo. Plantas cultivadas em BIT (Figura 4 A, B e C) tiveram o crescimento potencializado, apresentando um valor médio de 4,7 cm, independentemente da variedade, após 60 dias de cultivo. Já no sistema SS as plantas apresentaram altura média de 2,9 cm para o mesmo período. Adicionalmente, maiores valores para massa fresca de plantas também foi observado em sistema BIT (31,5 g), enquanto que em SS o acúmulo de biomassa fresca foi de apenas 8,0 g. Individualmente, a variedade que apresentou maior acúmulo de massa fresca foi a 'D'Angola' (38,2 g), enquanto que o maior valor observado em sistema SS foi na variedade 'Pacovan Ken' (10,0 g). Camolesi et al. (2010) testando o volume dos frascos e consistência do meio de cultivo, observaram maior desempenho das plantas quanto ao desenvolvimento dos brotos em bananeiras cultivadas em meio líquido e quando utilizaram frascos de 500 mL, comparativamente àquelas cultivadas em meio de mesma consistência em frascos de 250 mL. Isso, sugere que a maior disponibilidade de nutrientes proporcionadas pelo meio líquido também pode estar associada ao maior espaço no interior dos frascos de cultivo para o melhor desenvolvimento das brotações.

Quanto ao número de folhas formadas, diferenças significativas só foram verificadas para variedade 'Thap Maeo' que apresentou maior número de folhas em sistema SS (7,8 folhas/planta), enquanto que em BIT (Figura 4 D) houve formação de apenas 6,0 folhas/planta. Já para as demais variedades não houveram diferenças significativas quanto ao número de folhas formadas em nenhum dos sistemas utilizados.

Em relação ao diâmetro do pseudocaule, observou-se que, apesar de não ter sido verificada diferenças estatísticas entre os sistemas, valores maiores foram verificados para esta variável quando as variedades foram cultivadas em sistema SS. Tal fato ocorreu em virtude de as plantas cultivadas em BIT, terem

apresentado maior altura e conseqüentemente, pseudocaulos mais alongados que espessos.

Não houve influência negativa de nenhum sistema de cultivo na etapa de enraizamento das plantas, visto que 100% das plantas de todas as variedades estudadas apresentaram formação de raízes, independentemente do sistema de cultivo utilizado.

Entretanto observou-se influência do sistema de cultivo quanto ao número e tamanho das raízes formadas. Independentemente da variedade, maior número de raízes formadas foi observado em sistema SS, com valores médios de 11,6 raízes/planta enquanto que em BIT observou-se formação de 9,3 raízes/planta. Apesar de menor número de raízes terem sido detectadas em BIT, esse foi o sistema que apresentou para todas as variáveis os maiores valores relacionados ao tamanho da raiz principal, onde para a variedade 'Japira' foi de 5,0 cm, 'D'Angola' 10,6 cm, 'Pacovan Ken' 6,5 cm e para 'Thap Maeo' 3,9 cm. Já em SS os valores foram de 3,9, 4,0, 3,9 e 2,3 cm, respectivamente. Andrade et al. (2011), também observaram comportamento semelhante em seus estudos, onde maiores valores para o comprimento da raiz em bananeiras foi observado quando estas foram cultivadas em meio de consistência líquida, ao passo que maior número de raízes ocorreu em tratamentos contendo diferentes concentrações de ágar. Oliveira et al. (2014) afirmam que a proliferação das raízes depende da disponibilidade de água e nutrientes no microambiente que as circundam. Se este microambiente é pobre em nutrientes ou muito seco, o crescimento radicular é lento, e, na medida em que as condições melhoram, o crescimento radicular aumenta (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Foi observada baixa taxa de multiplicação do material em ambos os sistemas de cultivo utilizado. A taxa variou de 0,8 brotos/explante para variáveis 'D'Angola' e 'Thap Maeo', 0,9 brotos/explante para 'Pacovan Ken' e 1,0 broto/explante para 'Japira' em sistema SS e 1,1, 1,0, 1,0 e 1,0 broto/explante, respectivamente, em BIT. Pereira (2014) testando fontes alternativas de minerais e sacarose no meio de cultura para bananeiras, também observou baixa taxa de multiplicação do material e sugeriu falha na quebra da dominância apical em seus sistemas. Dentre os métodos de quebra da dominância apical da bananeira um dos mais empregados é por processos físicos, no qual é realizada uma incisão no ápice do explante para indução aos estímulos às gemas laterais causando o

aumento da taxa de multiplicação (CARNEIRO et al., 1999) método bastante empregado inclusive em biofábricas (PEREIRA, 2014). Pereira (2014) sugere que uma falha neste procedimento pode acarretar baixa taxa de multiplicação do material.

Muitos trabalhos sugerem que a incisão e mesmo o número de cortes sobre o ápice do explante e ainda, o tamanho deste, seja uma prática importante capaz de aumentar a taxa de multiplicação do material (ZAFFARI et al., 1994; CARNEIRO et al., 1999). A simples divisão do material ao meio seria capaz de promover a quebra da dominância apical, entretanto, tal procedimento não foi realizado antes da inoculação nos diferentes sistemas conforme pode ser observado na Figura 3. Logo, sugere-se que tal procedimento deva ser realizado antes da transferência do material, especialmente em sistema BIT onde não são realizadas subdivisão do material durante o cultivo.

Além disso, apesar da taxa de multiplicação pós-conservação ter sido de até 2,5 brotos/explante, sabe-se que há ainda, influência genotípica, e que a manipulação pode ser, também, um fator capaz de afetar a taxa de multiplicação do material nos subcultivos subsequentes.

**TABELA 2** Características morfológicas de brotações produzidas por meio de sistema de cultivo semi-sólido e biorreator de imersão temporária

Sistemas de cultivo	Variedades**				Média
	JP	D'A	PK	TM	
<b>Altura (cm)</b>					
SS	2,6b	3,1b	3,1b	2,8b	2,9b
BIT	4,9a	4,3a	5,1a	4,5a	4,7a
Média	3,7A	3,7A	4,1A	3,7A	
CV	13,8				
<b>Número de folhas</b>					
SS	5,3a	4,9a	5,2a	7,8a	5,8a
BIT	5,8a	4,2a	4,9a	6,0b	5,2a
Média	5,5B	4,6B	5,1B	6,9A	
CV	16,4				
<b>Diâmetro do Pseudocaule (mm)</b>					
SS	6,2a	5,2a	6,7a	6,2a	6,1a
BIT	5,4a	5,3a	6,0a	4,7b	5,3b
Média	5,8A	5,2A	6,3A	5,4A	
CV	16,2				
<b>Taxa de enraizamento (%)</b>					
SS	100a	100a	100a	100a	100a
BIT	100a	100a	100a	100a	100a
Média	100A	100A	100A	100A	
CV	17,6				
<b>Número de raízes</b>					
SS	11,9a	9,9a	11,9a	12,7a	11,6a
BIT	8,3b	10,4a	7,6b	10,7a	9,3b
Média	10,1A	10,2A	9,8A	11,7A	
CV	0,0				
<b>Comprimento da Raíz principal (cm)</b>					
SS	3,9a	4,0b	3,9b	2,3a	3,5b
BIT	5,0a	10,6a	6,5a	3,9a	6,5a
Média	4,4B	7,3A	5,2B	3,1C	
CV	27,7				
<b>Massa fresca total (g)</b>					
SS	8,3b	7,7b	10,0b	5,9b	8,0b
BIT	28,9a	38,2a	33,0a	25,8a	31,5a
Média	18,6B	23,0A	21,5A	15,8B	
CV	14,0				
<b>Taxa de multiplicação (%)</b>					
SS	1,0a	0,8a	0,9a	0,8a	0,8a
BIT	1,0a	1,1a	1,0a	1,0a	1,0a
Média	1,0A	0,9A	0,9A	0,9A	
CV	0,0				

Médias acompanhadas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.





**FIGURA 4** Aspecto geral das plantas durante o cultivo em sistema SS e BIT: A. Kit do sistema BIT montado em prateleira, contendo brotações em início de cultivo; B. Detalhe das brotações em início de cultivo em BIT; C. Mudanças de bananeira da variedade 'Japira' em BIT durante a fase de troca de meio do primeiro para o segundo subcultivo; D. Plantas da variedade 'Thap Maeo' durante a etapa de avaliação após a etapa de enraizamento: a. BIT e b. SS; experimento de comparação de desempenho.

### 3.3 Aclimatização *ex vitro* das plantas produzidas nos diferentes sistemas de cultivo

Após 60 dias de aclimatização, maior valor médio para altura de plantas no sistema SS foi observado na variedade 'Japira' (5,6 cm), seguida das variedades 'Thap Maeo' e 'Pacovan Ken', com valores de 5,0 e 4,5 cm, respectivamente. Já em BIT, não foram observadas diferenças para altura de

plantas entre as variedades, sendo verificados valores que variaram entre 4,9 e 6,3 cm (Tabela 3).

Diferenças estatísticas para essa variável não foram verificadas quando o efeito do sistema de cultivo foi analisado. De modo geral, os valores médios observados para altura de planta no sistema SS foi de 5,2 cm e em BIT foi de 5,4 cm (Figura 5 A e B). Considerando que as plantas do sistema BIT foram aclimatizadas apresentando valor médio para altura em torno de 4,7 cm e as do sistema SS 2,9 cm, observou-se então, que as plantas em sistema SS tiveram uma taxa de crescimento de 79,3% após o transplante, enquanto que em BIT foi de apenas 14,8% em 60 dias. Plantas do sistema SS podem ter apresentado maior capacidade adaptativa quando transferida para casa de vegetação e um sistema fisiológico mais acelerado durante aclimatização enquanto que as plantas do sistema BIT apresentaram esse comportamento apenas durante o cultivo *in vitro*. Aragón et al. (2014) comparando mudas propagadas em sistema de imersão temporária e em meio geleificado durante o cultivo *in vitro* e aclimatização, também observaram uma alta taxa de crescimento das plantas em BIT, durante a fase de alongamento, em relação às cultivadas em SS. Esses mesmos autores relataram que tal comportamento se manteve apenas durante as primeiras semanas quando então, ocorreu frequente desaceleração no final, quando o diâmetro do caule começou a aumentar o acúmulo de reservas e raízes.

Quando a taxa de sobrevivência é analisada, observou-se que mais de 94% das plantas cultivadas em BIT sobreviveram ao processo de aclimatização, ao passo que aquelas produzidas em sistema SS apresentaram 85,6% de sobrevivência (Tabela 3) (Figura 5 C e D). Estes valores corroboram com os obtidos Costa et al. (2008), que relataram taxas de sobrevivência superiores a 80% para mudas de bananeira das variedades 'Preciosa', 'Japira' e 'Caipira' após 90 dias de aclimatização. Oliveira et al. (2014), relataram taxas de sobrevivência de plantas de bananeiras micropropagadas durante o período de aclimatização de 97%. Taxas de sobrevivência de mudas de bananeira superiores a 90% têm sido relatadas por diversos autores (PEREIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Embora a fase de aclimatização seja considerada uma etapa delicada para várias culturas, as taxas de sobrevivência observadas em diferentes

estudos demonstram que mudas micropropagadas de bananeira apresentam boa capacidade de adaptação ao sistema *ex vitro* (NOMURA et al., 2012).

Para a variável número de folhas foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os sistemas de cultivo apenas para variedade 'Thap Maeo'. Nesta variedade, os valores observados foram de 6,2 folhas/planta em sistema SS e 4,7 folhas/planta em BIT. O número de folhas é importante, pois geralmente quanto maior o número de folhas formadas durante aclimatização, maior o índice de pegamento, crescimento inicial e desenvolvimento das plantas de bananeira, em razão da maior produção de fotoassimilados (SANTOS et al., 2004).

Quanto ao diâmetro do pseudocaule, não foram observadas diferenças entre as variáveis para nenhum dos sistemas utilizados. Assim, de modo geral, os valores médios observados para esta variável foram de 7,3 mm em SS e 7,2 mm em sistema de cultivo BIT (Tabela 3). Camolesi et al. (2010) também observam comportamento semelhante quando analisaram o diâmetro do pseudocaule de plantas de bananeira do tipo 'maçã' em estudos durante a aclimatização. Estes autores utilizaram diferentes sistemas de cultivo (Fracos de 250 e 500 mL de capacidade) com dois tipos de meio de cultura (semi-sólido e líquido estacionário) e, segundo eles, as médias entre os tratamentos também não diferiram entre si, de modo que em meio semi-sólido foi de 11,7 mm e líquido de 13,2 mm.

**TABELA 3** Crescimento das plantas de bananeira das variedades ‘Japira’, ‘D’Angola’, ‘Pacovan Ken’ e ‘Thap Meo’, originadas de sistemas de cultivo Semi-Sólido (SS) e Biorreator de Imersão Temporária (BIT), após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação

Sistemas de cultivo	Variedades**				Média
	JP	D’A	PK	TM	
<b>Altura (cm)</b>					
SS	5,6a	5,3b	4,5a	5,0a	5,2a
BIT	5,3a	6,3a	4,9a	5,3a	5,4a
<b>Média</b>	5,4B	6,1A	4,8B	5,2B	
CV	21,99				
<b>Número de folhas</b>					
SS	5,5a	5,3a	5,7a	6,2a	5,7a
BIT	5,4a	5,9a	5,0a	4,7b	5,2a
<b>Média</b>	5,5A	5,7A	5,1B	5,0B	
CV	20,1				
<b>Diâmetro do Pseudocaule (mm)</b>					
SS	7,1a	7,8a	6,8a	7,5a	7,3a
BIT	7,2a	8,1a	6,5a	7,0a	7,2a
<b>Média</b>	7,2B	8,0A	6,6B	7,1B	
CV	24,9				
<b>Taxa de sobrevivência (%)</b>					
SS	100,0a	90,0a	72,7b	80,0b	85,6a
BIT	100,0a	93,9a	90,6a	93,7a	94,5a
<b>Média</b>	100,0A	91,9A	81,6A	86,8A	
CV	0,0				

Médias acompanhadas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



**FIGURA 5** Aspecto geral de plantas de bananeira das variedades em estudo A. Plantas obtidas em sistema BIT: a. 'Thap Maeo', b. 'Pacovan Ken', c. 'D'Angola', d. 'Japira'; B. Plantas cultivadas pelo sistema SS: a. 'Thap Maeo', b. 'Pacovan Ken', c. 'D'Angola', d. 'Japira'; C. Após o transplântio para aclimatização em casa de vegetação e D. Aspecto vigoroso da planta após o transplântio.

## 4 CONCLUSÕES

- Ápices caulinares de bananeiras podem ser conservados *in vitro* utilizando condições de crescimento mínimo, antes de serem utilizados para fins de propagação;
- A melhor condição para conservação *in vitro* de bananeiras é utilizando meio de cultura de MS pleno e temperatura de 20 °C;
- Após sete meses de conservação em regime de cultivo mínimo a taxa de multiplicação das variedades estudadas não é afetada;
- Mudanças produzidas em sistema de Biorreator de Imersão Temporária apresentam comportamento semelhante às produzidas em meio Semi-Sólido, quanto ao número de folhas, percentagem de enraizamento e taxa de multiplicação;
- O sistema de cultivo em Biorreator de Imersão Temporária causa efeito positivo no desenvolvimento *in vitro* de plantas de bananeira, incrementando características como altura, comprimento de raiz e acúmulo de biomassa;
- Plantas micropropagadas em Sistema Semi-Sólido e Biorreator de Imersão Temporária apresentam características normais de desenvolvimento durante o processo de aclimatização;
- Ao final da etapa de aclimatização não há diferenças significativas quanto ao sistema de cultivo (SS ou BIT) para altura, diâmetro do pseudocaule, número de folhas e/ou taxa de sobrevivência;
- Após 60 dias de aclimatização a taxa de sobrevivência das plantas foi superior a 85% em ambos os sistemas de cultivo (SS e BIT).

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A.; SANAYAIMA, R.; TANDON, R.; TYAGI, R.K. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). **Acta Physiology Plantarum**, v. 32, p. 703-711, 2010.

ANDRADE, R. A. de; MARQUES, T. F.; JASPER, S. P.; DONATTO JUNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Micropropagação de mudas de bananeira em meio líquido. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 3, p. 156-159, 2011.

ARAGÓN, C. E.; SÁNCHEZ, C.; GONZALEZ-OLMEDO, J.; ESCALONA, M.; CARVALHO, L.; AMÂNCIO, S. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. **Biologia Plantarum**, v.58, n.1, p. 29-38, 2014.

BERNARDI, W. F.; RODRIGUES, B. I.; NETO, P. C.; ANDO, A.; TULMANN-NETO, A.; CERAVOLO, L. C. NALESSO, S. M.; MONTES, M. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p.503-506. 2004.

CALDAS, L.S. HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. V.1, p.87-132.

CAMOLESI, M. R.; FARIA, R. T. de; NEVES, C. S. V. J.; MARTINS, N. A. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, v.40, p. 359-365, 2010.

CARNEIRO, I. F.; ZICA, L. F.; CHAVES, L. J. Quebra da dominância apical, por processos físicos, em cultivo *in vitro* de bananeira-Maçã. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.29, n.2, p.51-57, 1999.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. e; NETO, H. P. da S.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. Poliploidização em ápices caulinares de bananeirae seus efeitos morfofisiológicos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n.8, p.805-813, 2011.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; ROCHA, H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; CASTRO, E. M. de; MIYATA, L. Y. Crescimento e anatomia foliar de

bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.2, p.303-311, 2009.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; RODRIGUES, F.A.; MIYATA, L. Y. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.30, n.1, p. 31-37, 2008.

DEBIASI, C. Utilização de biorreatores de imersão temporária em uma biofábrica de cultura de tecidos. In: **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 99-115, 2011.

DINIZ, J. D. N.; GONÇALVES, A. N.; HERNANDEZ, F. F. F.; TORRES, A. C. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.7, p.1201-1209. 1999.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso de luz natural. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.L.; DANQUITA, M.; GONZALES, J.L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 16/10/2014.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento sistemático da produção agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, v. 26, n. 8, 2013, 84 p.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, n.1, p.67-71, 2001,

LEMOS, E. E. P de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; RAMALHO NETO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.



MADHULATHA, P.; ANBALANGAN, M.; JAYACHANDRAN, S.; SAKTHIVEL, N. Influence of liquid treatment with regulators on in vitro propagation of banana (*Musa* spp. AAA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, n.2, p.189- 191, 2004.

MARÍN, D.H.; ROMERO, R.A.; GUZMÁN, M.; SUTTON, T.B. Black sigatoka: AN increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease**, v. 87, n. 3, p. 208-222, 2003.

NEGASH, A.; KRENS, F.; SCHAART, J.; VISSER, B. In vitro conservation of enset under slow-growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 66, p. 107-111, 2001.

NOFIARLI, S.M. Conservation of banana cv. Ambon kuning on various media *in vitro* formula ARPN. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 8, n. 4, p. 322-328, 2013.

NOMURA, E. S.; DAMATTO JÚNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; SAES, L. A.; JENSEN, E. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira 'Grand Naine' com aplicação de biofertilizantes em duas estações do ano. **Revista Ceres**, v.59, n.4, p.518-529, 2012.

OLIVEIRA, J. A. A.; PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHE, S.; SOUZA, V. N. R.; COSTA, I. de J. S. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira em diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Ciência. Agrárias**, Recife, v.9, n.1, p.72-78, 2014.

OLIVEIRA, J. P. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Influência genotípica e clonal de genótipos de bananeiras micropropagados a partir de gemas florais masculinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 558-563, 2011.

OLIVEIRA, J. P. de. **Produção de mudas *in vitro* e ocorrência de microrganismos endofíticos em bananeiras da Amazônia Sul-Occidental**. 2009. 122 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2009.

OLIVEIRA, J. P.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. S. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia sul-occidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.459-465, 2008.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVA, S. de O. e; SILVA, K. M. da; SILVEIRA, D. G. *In vitro* conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.245-249, 2000.

PAEK, K. Y.; HAHAN, E. J.; SON, S. H. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v.37, p.149-157, 2001.

PEREIRA, M. R. **Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação de bananeira cv. WilliAms**. 2014, 102p. Dissertação (Mestrado em produção vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goyatazes – RJ, 2014.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHKE, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C. F.; LIMA, C. de; GONÇALVES, V. D.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOBAYASHI, M. K. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240, ago. 2005.

RIOS, S. de A.; NIETSCHKE, S.; PEREIRA, M. C. T.; XAVIER, A. A.; FERNANDES, T. P.; DIAS, M. M.; LIMA, C. de; SANTOS, T. M. dos. Protocolos de assepsia e comprimento de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ sobre a produção de mudas por micropropagação. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 10, n, 1/2, p. 46-52, 2008.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagation of heliconia plantlets in temporarily immersion bioreactor. **Bragantia**, v. 65, p.29-35, 2006.

SANDOVAL, J.; MÜLLER, L. Consideraciones sobre la conservación in vitro de musáceas: posibilidades y limitaciones. **Asbana**, Turrialba, v. 13, n. 31, p. 21-24, 1989.

SANTOS, M. de S. **Prospecção, caracterização molecular e conservação in vitro de Laeliinae (Orchidaceae)**. 2014, 72 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

SANTOS, J. A.; SILVA, C. R. de R. e; CARVALHO, J. G. de; NASCIMENTO, T. B. do. Efeito do calcário dolomítico e nitrato de potássio no desenvolvimento

inicial de mudas da bananeira 'Prata-Anã' (AAB), provenientes de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 150-154, 2004.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.177-234.

SILVA, B. A. da; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1257-1260, 2007.

TAIZ L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Artmed, 5 ed. p. 164-197, 2013.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais – produção de mudas em larga escala. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, V. 4, n. 24, p. 36-41, 2002.

VAN DE HOUWE, I.; SMET, K.D.; MONTCEL, H. T.; SWENNEN, R. Variability in storage potencial of banana shoot cultures under medium term storage conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 269-274, 1995.

WITHERS, L. A. *In vitro* conservation. In: HAWKES, J. G. (Ed.). **Genetic conservation of world crop plants**. San Diego: Academic, p. 31-42, 1991.

ZAFFARI, G. R.; SOLIMAN FILHO, L. F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra de dominancia apical, sobre a brotacao das gemas laterais na producao de mudas de bananeira, *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 3, p.71-76, 1994.

ZIV, M. Organogenic plant regeneration in bioreactors. In: ALTMAN, A.; ZIV, M.; IZHAR, S. (Ed.). **Plant biotechnology and *in vitro* biology in the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.673-676, 1999.

## CAPÍTULO II

---

### COMPORTAMENTO ORGANOGÊNICO E CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA DE PLANTAS DE BANANEIRAS MULTIPLICADAS EM SISTEMA SEMI-SÓLIDO E BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

#### RESUMO

Anatomia vegetal tem sido uma importante ferramenta utilizada na cultura de tecidos vegetais no sentido de auxiliar o entendimento de diversas anomalias e distúrbios morfo-fisiológicos das plantas micropropagadas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento organogênico e os aspectos morfo-anatômicos de plantas de bananeiras produzidas em sistemas de micropropagação convencional e de Biorreator de Imersão Temporária (BIT), durante o cultivo *in vitro* e aclimatização. Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos II e de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília – DF. O material vegetal utilizado como fonte de explante foi obtido de brotações de bananeira das variedades ‘Preciosa’ e ‘Thap Maeo’. Na fase de multiplicação e nos dois sistemas de cultivo (SS e BIT) foi utilizado os sais e vitaminas do meio de Murashige e Skoog (MS), suplementado com 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Após a etapa de multiplicação, as brotações foram submetidas à etapa de alongamento e enraizamento em meio de cultura de MS desprovido de regulador de crescimento e, decorridos 40 dias, os seguintes parâmetros foram avaliados: altura da parte aérea e número de folhas vivas; além da massa fresca e seca total das plantas. Para avaliação da altura, as plantas foram separadas em classes de tamanho, considerando: C1- plantas entre 1 e 2,5 cm; C2- plantas entre 2,6 e 5,0 cm; C3- plantas entre 5,1 e 8,0 cm e C4- plantas maiores que 8,0 cm. Em seguida, as plantas foram aclimatizadas e avaliadas quinzenalmente, durante 60 dias, quanto a sua altura, diâmetro do pseudocaule, número de folhas e taxa de sobrevivência. Durante as etapas, também foram realizados estudos morfo-anatômicos em microscópio de luz e varredura das folhas de bananeira originados dos diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. De maneira geral, verificou-se que a percentagem de enraizamento das plantas foi superior a 90% em ambos os sistemas de cultivo. Mudanças produzidas em BIT

apresentaram maiores valores de matéria fresca e seca, independentemente da variedade. Maior número de plantas apresentando altura superior a 8,0 cm também foi verificado no sistema BIT, embora este sistema tenha sido o que apresentou menor taxa de multiplicação. Para o diâmetro do pseudocaule não foram verificadas diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo testados para nenhuma das variedades estudadas. Quanto aos aspectos anatômicos, observou-se durante a aclimatização incremento na camada de cera epicuticular em ambas as variedades, independentemente do sistema de cultivo. Maior densidade estomática foi observada na face abaxial em ambas as variedades, independentemente do sistema de cultivo. Tanto na variedade 'Preciosa' quanto na 'Thap Maeo', independentemente do sistema de cultivo, foi observada maior espessura da epiderme e hipoderme na face adaxial. Diferenças estatísticas entre os tecidos parenquimáticos só foi observada na variedade 'Preciosa', onde de modo geral o sistema BIT foi o que apresentou maior espessura dos parênquimas paliádico (39,9  $\mu\text{m}$ ) e esponjoso (123,9  $\mu\text{m}$ ), enquanto que para 'Thap Maeo' não foi observada diferença entre os sistemas de cultivo para estas variáveis. A taxa de sobrevivência das plantas da variedade 'Preciosa' foi superior a 70%, independentemente do sistema de cultivo, enquanto que para 'Thap Maeo' a melhor taxa de sobrevivência foi de 97,2% observada em sistema Semi-Sólido. De acordo com os estudos anatômicos não foram observadas formações de estruturas anormais nas mudas de bananeiras cultivadas *in vitro* em nenhum dos sistemas de cultivo testado.

**Palavras-Chave:** *Musa* sp., micropropagação, anatomia, microscopia de varredura, Biorreator de Imersão Temporária.

## CHAPTER II

---

### ORGANOGENIC BEHAVIOR AND MORPHO-ANATOMICAL CHARACTERIZATION OF BANANA PLANTS MULTIPLIED IN SEMI-SOLID AND TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR SYSTEMS

#### ABSTRACT

Anatomy has been an important tool to be used in the plant tissue culture in order to help the understanding of various abnormalities and morphophysiological disorders of the micropropagated plants. The present study aimed to evaluate the organogenic behavior and the morpho-anatomical aspects of banana plantlets produced in conventional and Temporary Immersion Bioreactor (TIB) micropropagation systems. The studies were conducted in the Tissue Culture II Laboratories and Bio-Imaging of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia – DF. The material used as explant source was obtained from banana plants shoots of the ‘Preciosa’ and ‘Thap Maeo’ varieties. In the multiplication stage and for both culture systems (SS and TIB) it was used the salts and vitamins of Murashige and Skoog (MS) medium, supplemented with 2,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP and 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose. After multiplication, the shoots were submitted to rooting in MS medium devoid of growth regulator and, after 40 days, the following parameters were evaluated: height of aerial part and number of live leaves, besides of the fresh and dry mass of the plants. For height, the plants were separated in categories, considering: C1- plants between 1 and 2.5 cm; C2- plants between 2.6 and 5.0 cm; C3- plants between 5.1 and 8.0 cm and C4- plants larger than 8.0 cm. Then, the plants were acclimatized and evaluated during 60 days, in terms of height, pseudostem diameter, number of leaves and survival rate. During the stages, morphoanatomic studies were also performed in the plants leaves originated from different *in vitro* culture systems. It was found that the plants rooting reached over 90% in both culture systems. Plantlets produced in TIB presented higher values of fresh and dry mass weight, independently of the variety. Highest number of plants presenting height over to 8.0 cm were also verified in the TIB system, although this system presented a lower multiplication rate. For pseudostem diameter, no statistical differences were found between the treatments. Regarding the anatomical aspects, during

the acclimatization it was observed increments in the epicuticular wax layer for both varieties, independently of the culture system. Higher stomatal density was observed in the abaxial face of both varieties, independently of the culture system. For both 'Preciosa' and 'Thap Maeo' varieties, independently of the culture system, it was observed greater epidermis and hypodermis thickness in the face adaxial. Statistical differences between the parenchyma tissues was only observed in the 'Preciosa' variety, where generally plants from TIB showed highest thickness of palisade (39.9  $\mu\text{m}$ ) and spongy (123.9  $\mu\text{m}$ ) parenchymas, while for 'Thap Maeo' no difference was observed between the culture system for these variables. The plants survival rate from 'Preciosa' variety was over 70%, independently of the culture system, while for 'Thap Maeo' the best survival rate reached 97.2% observed plants from semi-solid system. According to the anatomical studies there were not observed abnormal structures formations in the plantlets of banana cultivated under different micropropagation systems.

**Keywords:** *Musa* sp., Micropropagation, Anatomy, Scanning Microscopy, Bioreactor of Temporary Immersion.

## 1 INTRODUÇÃO

As Bananeiras são normalmente propagadas por meio de suas partes vegetativas, devido ao fato da maioria das cultivares comerciais não apresentarem sementes ou apresentarem sementes estéreis (IQBAL et al., 2013). Entretanto, a forma de propagação convencional por meio de brotos laterais (perfilhos) desenvolvidos a partir do rizoma, é considerada ineficaz no que diz respeito ao número e qualidade das mudas produzidas. Além disso, a propagação é lenta e o período de uma floração para outra é considerado longo (ROELS, et al., 2005; IQBAL et al., 2013).

Neste sentido, devido a sua comprovada eficiência, a micropropagação a partir de ápices caulinares cultivados *in vitro* é extensivamente utilizada em diversos países para produção de mudas de bananeira (SILVA et al., 2010). Desta forma, alternativas cada vez mais eficientes têm sido testadas e aplicadas visando aprimorar esta técnica de produção (TEIXEIRA, 2002).

Porém, apesar das plantas cultivadas *in vitro* apresentarem uma aparência normal, as mesmas podem acabar desenvolvendo características anatômicas e fisiológicas não adequadas ao ambiente *ex vitro*, tais como reduzida deposição de cêra epicuticular e diferenciação do mesofilo, feixes vasculares rudimentares e baixo controle de abertura e fechamento dos estômatos (ROMANO; MARTINS-LOUÇÃO, 2003). Essas modificações podem ocorrer em consequência das complexas condições do cultivo *in vitro*, tais como as diferenças na atmosfera dos recipientes utilizados para incubação das plantas, incluindo reduzida irradiância, presença de carboidrato exógeno, baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub>, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas com o ambiente *ex vitro* (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999; ARIGITA et al., 2002).

O uso de técnicas anatômicas no sentido de auxiliar o entendimento de diversas anomalias e distúrbios fisiológicos que podem ocorrer nas plantas micropropagadas, incluindo a variação somaclonal, tem dado resultados promissores possibilitando compreender, inclusive o melhor período para a transferência das plantas para o meio *ex vitro* (CHAKRABARTY et al., 2005; ROCHA, 2005; SILVA et al., 2010).

Assim, estudos desse tipo podem auxiliar no entendimento do comportamento das plantas micropropagadas, especialmente aquelas



produzidas em sistemas de biorreatores que, por ser uma ferramenta nova de produção de mudas, pouco ainda se sabe sobre sua influência no desenvolvimento das plantas produzidas durante e após o cultivo *in vitro*.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o comportamento organogênico e os aspectos morfo-anatômicos de plantas de bananeiras produzidas em sistemas de micropropagação convencional e de Biorreator de Imersão Temporária (BIT), durante o cultivo *in vitro* e aclimatização.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos II e Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília – DF.

O material vegetal utilizado como fonte de explante para este experimento foi obtido de brotações *in vitro* de bananeira das variedades ‘Preciosa’ – CCG2 (PV42-85 AAAB) e ‘Thap Maeo’ – CCG8 (AAB), entre o terceiro e quarto subcultivos, conforme descrito no Capítulo 1 deste trabalho.

### 2.1 Multiplicação em Sistema de Micropropagação Convencional e Biorreator de Imersão Temporária

Na fase de multiplicação foram testados dois sistemas de cultivo: sistema de micropropagação convencional ou Semi-Sólido (SS) e em Biorreator de Imersão Temporária (BIT). Nestes sistemas, as plantas foram mantidas em condições assépticas, em meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (COSTA et al., 2011) e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

No sistema SS o meio foi solidificado com 1,8 mg.L<sup>-1</sup> de Phytigel, enquanto que em BIT foi utilizado apenas meio líquido, sem a adição de agentes geleificantes.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do agente geleificante (somente no caso do SS) e foram autoclavados por 15 minutos, a 121°C e 1,3 atm de pressão.

Durante a micropropagação em SS o material foi mantido em frascos de 250 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio semi-sólido, sendo as brotações subcultivadas a cada 40 dias. Já em BIT, os explantes permaneceram em frascos de 5.000 mL de capacidade, contendo 400 mL de meio líquido, onde o sistema de imersão foi acionado por meio de um Timer® e os explantes imersos com meio de cultura a cada 6 horas por 3 minutos (TEIXEIRA, 2002). No sistema BIT, as brotações foram mantidas continuamente, sem a mudança de frasco a cada subcultivo, sendo somente o meio de cultura substituído por meio novo a cada 40 dias, assim como realizado no sistema SS.

Uma vez em meio de cultura, as brotações foram mantidas em sala de crescimento, sob temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares brancas frias. As brotações permaneceram nestas condições por 4 subcultivos de 40 dias cada, sendo em seguida, transferidas para meio de alongamento e enraizamento.

#### 2.2.1 Alongamento e enraizamento de plantas produzidas em Sistema de Micropropagação Convencional e Biorreator de Imersão Temporária

Após a etapa de multiplicação, as brotações foram submetidas à etapa de alongamento e enraizamento. Para tal, foi utilizado o meio de cultura de MS desprovido de reguladores de crescimento, adicionado com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose.

As mesmas condições de cultivo já descritas no item 2.1 para os sistemas SS e BIT foram mantidas.

Decorridos aproximadamente 40 dias para alongamento o enraizamento *in vitro*, os seguintes parâmetros foram avaliados: altura da parte aérea (cm), número de folhas vivas, diâmetro do pseudocaule - DPC, taxa de multiplicação, percentagem de enraizamento, além da massa fresca e seca total (g), sendo esta última obtida após secagem a  $65^{\circ}\text{C}$  por 48 horas em estufa com circulação de ar. Para avaliação da altura, as plantas foram quantificadas quanto ao número e separadas em classes considerando: C1- plantas medindo entre 1 e 2,5 cm, C2- entre 2,6 e 5,0 cm, C3- entre 5,1 e 8,0 cm e C4- maior que 8,0 cm.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial 2 x 2 (2 variedades e 2 sistemas de cultivo), com pelo menos 6 repetições por tratamento. Pelos diferentes sistemas de cultivo apresentarem frascos com capacidades diferentes e para padronizar a relação brotos/meio de cultura foi mantida uma relação equivalente de 10 mL meio de cultura por brotação. Dessa forma, cada frasco em sistema SS e BIT recebeu 4 e 40 brotações/frasco, respectivamente.

### 2.2.2 Aclimatização das plantas produzidas *in vitro* em Sistemas de Micropropagação Convencional e Biorreator de Imersão Temporária

Após a etapa de alongamento e enraizamento, as plantas de bananeira foram transferidas para casa de vegetação medindo aproximadamente 10 x 4 m, recobertas com telas plásticas (sombrite), sistema de circulação de ar automatizado. As plantas foram acondicionadas em bandejas plásticas de aproximadamente 37,5 x 59 cm, contendo 60 células de 90 cm<sup>3</sup>, suspensas cerca de 20 cm do solo e preenchidas com substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. As plantas foram mantidas sob sombrite (50% de interceptação solar), à 27±4°C e entre 70 e 80% de umidade relativa.

As irrigações das mudas foram feitas diariamente por meio de regas manuais. Quinzenalmente, as plantas eram avaliadas quanto a altura (cm), o diâmetro do pseudocaule (mm), o número de folhas e a taxa de sobrevivência das plantas (%) por um período de até 60 dias. Durante o período de crescimento e avaliação do experimento não foram realizados tratamentos fitossanitários.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial de 2 x 4 x 2 (2 variedades, 4 classes e 2 sistemas de cultivo). O experimento foi formado por 3 blocos e 6 plantas por repetição.

### 2.3 Caracterização morfo-anatômica de folhas de bananeiras obtidas em sistemas de micropropagação convencional e Biorreator de Imersão Temporária

Após as etapas de multiplicação e alongamento/enraizamento sob sistemas SS e BIT nas condições descritas nos itens 2.3.1 e 2.3.2, quatro plantas

de cada tratamento testado foram selecionadas aleatoriamente para a realização de estudos morfo-anatômicos.

Para tanto, a segunda folha expandida foi destacada das plantas medindo entre 3 a 8 cm de altura, imediatamente após serem avaliadas, antes da aclimatização.

Para a obtenção dos cortes anatômicos foi utilizado o terço médio da segunda folha expandida (direção ápice-base), previamente fixada em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (JOHANSEN, 1940), por 72 horas e conservada em álcool etílico 70% (v/v).

A preparação das seções foi realizada por clarificação em hipoclorito de sódio (5%) por 1 a 2 minutos, seguido de 5 a 6 lavagens em água destilada, sendo a coloração realizada com azul de alcian/safranina 1% (9:1) (KRAUS; ARDUIN, 1997) por 4 minutos e a para observação da cutícula foi usado SUDAN III deixando reagir por até 5 min.

Para o estudo da epiderme utilizou-se a técnica da impressão epidérmica (SEGATTO et al., 2004), utilizando esmalte incolor.

A captura das imagens foi obtida utilizando microscópio MOTIC BA300 com câmera digital acoplada. Como parâmetros foram avaliadas as espessuras dos parênquimas paliçádico e esponjoso e das hipodermes abaxial e adaxial ( $\mu\text{m}$ ), efetuando-se quatro medições em três folhas por tratamento, totalizando 12 medições por tratamento. Em adição, a espessura do limbo foliar ( $\mu\text{m}$ ) também foi mensurada. Para os cortes paradérmicos, apenas a densidade estomática foi avaliada, sendo expressa em número de estômatos por  $\text{mm}^2$ , estimando-se para medição uma área de  $1,0 \text{ mm}^2$ . Para esta análise, as avaliações ocorreram em quatro campos no terço mediano de três folhas por tratamento, perfazendo-se um total de 12 campos por tratamento.

Os dados quantitativos foram obtidos usando-se o programa Image-Pro Plus 4.5 software (*Média Cybernetics*<sup>®</sup>).

#### 2.4 Caracterização morfo-anatômica via microscopia eletrônica de varredura de folhas de bananeira durante a fase *in vitro* e *ex vitro*, após o cultivo em sistemas de micropropagação convencional e Biorreator de Imersão Temporária

A caracterização morfo-anatômica das folhas de plantas *in vitro* foi realizada em amostras de folhas das plantas de bananeira, utilizando-se material oriundo do cultivo *in vitro* e já fixado em FAA conforme descrito no ítem 2.3.

Já as análises de plantas *ex vitro* foram realizadas a partir de amostras de folhas obtidas em plantas de bananeira após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação. Para tanto, foram coletadas folhas recém formadas em condições *ex vitro* e já expandidas.

Para análise, foram feitas secções na região mediana das folhas de bananeiras tanto *in vitro* quanto *ex vitro*, previamente lavadas em água corrente. As amostras de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> foram imersas em solução fixativa Karnovsky (1965) modificado: glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 6,8 por um período de 24 horas.

Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2 (cinco vezes de 10 min), pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 2% em água por 1 hora em temperatura ambiente. Subsequentemente, as amostras foram lavadas por 3 vezes em água destilada, seguida da desidratação em de etanol (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 uma vez cada e 100% por três vezes por 15 min).

Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico, utilizando CO<sub>2</sub> como líquido de transição (ROBARDS, 1978). Os fragmentos de folhas obtidos foram montados em suportes de alumínio “stubs”, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio e, cobertos com partículas de ouro (20 nm). As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura ZEISS modelo DSM 962 e as imagens amostrais foram geradas e registradas digitalmente, em aumentos variáveis (150 até 4000 vezes), nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de 9 mm.

Observações visuais foram feitas quanto à morfologia e distribuição dos estômatos. Além disso, a densidade estomática, o tamanho dos estômatos e a relação entre os diâmetros equatorial e polar dos estômatos (µm) foram mensurados a fim de verificar estômatos anormais, considerando as características descritas na literatura como sendo atípicas para espécie.

## 2.5 Análise Estatística dos resultados

Os valores obtidos durante este estudo foram avaliados estatisticamente e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dados de análise morfométrica também foram comparados pelo teste F. Os dados referentes à contagem foram transformados de acordo com a  $\sqrt{X} + 0,5$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Multiplicação em sistema de micropropagação convencional e Biorreator de Imersão Temporária

Para variável percentagem de plantas formadas foram observadas diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo, tanto para variedade 'Preciosa' quanto para 'Thap Maeo', apenas nas classes C2 e C4 (Tabela 1). Independentemente da variedade, maior percentagem de plantas em sistema SS foi verificado na Classe C2 (52,1% na 'Preciosa' e 59,4% na 'Thap Maeo'). Já em BIT, para 'Preciosa', não houve diferença quanto a percentagem de plantas formadas entre as classes de tamanho, ao passo que para 'Thap Maeo', maior percentagem de plantas foi observada na classe C4 (48,8%) (Figura 1). Independentemente da variedade, o sistema SS não apresentou mudas com altura superior a 8,0 cm.

Lima (2009) trabalhando com abacaxizeiro utilizando sistema dupla-fase também descreveu condições de menor comprimento das brotações devido às limitações no microambiente de cultivo, ou seja, devido ao espaço dos recipientes. Além disso, a constante renovação do ar durante o período de transferência do meio foi relatada por Lemos et al. (2001), como sendo um fator que parece favorecer o crescimento dos explantes nos biorreatores. Segundo eles, essa prática auxilia na eliminação de possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo das plantas que normalmente se acumulam na fase gasosa dos sistemas SS.

Muitos são os trabalhos que enfatizam o ambiente gasoso dos recipientes de cultivo como um importante fator que influencia o desenvolvimento das culturas (CHAKRABARTY et al., 2005; AFREEN, 2006). Autores como Majada

et al. (2000), Park et al. (2004) e Lai et al. (2005) relatam a ventilação ou as trocas gasosas como uma importante medida para redução da umidade relativa no interior dos recipientes e na renovação do etileno, CO<sub>2</sub> e outros componentes voláteis acumulados no interior dos frascos e, conseqüentemente, prevenção de estresses como por exemplo a hiper-hidricidade.

Embora a maioria das plantas no sistema SS não tenha apresentado um maior alongamento, em relação à taxa de multiplicação, independentemente da variedade, este foi o sistema que apresentou as maiores médias, ou seja, 3,1 brotos/explante para variedade 'Preciosa' e 2,9 brotos/explante para 'Thap Maeo'. Já em BIT a taxa de multiplicação foi em torno de 1,5 a 2,0 brotos/explante, respectivamente. Este resultado estão em desacordo com os obtidos por Lemos et al. (2001) que utilizando sistema de imersão temporária obtiveram 2,2 brotos a mais que os obtidos em sistema SS. Segundo Lemos (1996), a composição do meio de cultura, o seu contato com os tecidos e a sua oxigenação são alguns dos fatores que parecem influenciar na capacidade micropropagativa dos explantes.

Contudo, neste estudo, a baixa taxa de multiplicação quando o sistema BIT foi usado pode ser explicada devido ao fato dos explantes não terem sido subdivididos durante os subcultivos, fato ocorrido naqueles em sistema SS. De fato, a condição de cultivo *in vitro* da bananeira, associada à quebra da dominância apical pela realização da subdivisão do explante, parece de fundamental importância para a multiplicação dos propágulos. Carneiro et al., (1999), Oliveira et al. (2001) e Pereira, (2014) também relatam a importância do processo de subdivisão dos explantes no aumento das taxas de multiplicação de bananeira.

Quanto ao número de folhas formadas, diferenças estatísticas foram observadas entre os sistemas de cultivo somente para variedade 'Preciosa', com média de 7,0 folhas/explante quando as plantas foram produzidas em BIT. Em sistema SS o número de folhas por planta desta variedade foi cerca de 50% menor (3,7 folhas/explante).

Para 'Thap Maeo' não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre o número de folhas formadas em nenhum dos sistemas de cultivo testados (6,2 folhas/explante em SS e 6,9 folhas/explante em BIT). Segundo Mercier et al. (2003), para algumas espécies de plantas, a presença de

folhas proporciona melhorias nas respostas organogênicas *in vitro*, seja por questões hormonais ou nutricionais. Scherwinski-Pereira et al. (2005) em seu trabalho com batata demonstrou a importância da presença de folhas durante a etapa de aclimatização e sendo ainda indicativo do vigor das plantas. Mudanças com maior área foliar e maior número de folhas proporcionam maior índice de pegamento, aceleraram o crescimento inicial e o seu desenvolvimento, pela maior produção de fotoassimilados (Santos et al., 2004).

Quanto ao diâmetro do pseudocaule não foram verificadas diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo para nenhuma das variedades estudadas, assim como para a porcentagem de enraizamento, superior a 90% (Tabela 1).

**TABELA 1** Resposta das brotações de bananeiras das variedades ‘Preciosa’ e ‘Thap Maeo’ produzidas em dois sistemas de cultivos após a fase de multiplicação, alongamento e enraizamento

Variedades	Sistema de Cultivo*	% Plantas por classe				Taxa de Mult*	Nº Folhas	DPC (mm)*	Enraiz. (%)*
		C1*	C2	C3	C4				
‘Preciosa’	SS	35,7aA	52,1aA	12,0aB	0,0bB	3,1a	3,7b	5,1a	91,2 a
	BIT	35,5aA	23,3bA	13,0aA	28,1aA	1,5b	7,0a	6,6a	100,0a
‘Thap Maeo’	SS	8,2aC	59,4aA	32,3aB	0,0bC	2,9a	6,2a	5,8a	100,0a
	BIT	10,6aB	19,8bB	20,7aB	48,8aA	2,0b	6,9a	5,4a	100,0a
CV (%)		78,5				29,7	16,8	22,4	8,2

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. \* Sistemas: Semi-Sólido (controle)= frascos de 250 mL de capacidade com 40 mL de meio de cultura de MS semi-sólido. BIT = Biorreator de Imersão Temporária com frascos de 5000 mL de capacidade com 400 mL de meio líquido. Classes: 1 = 0 – 2,5 cm; 2= 2,6 – 5,0 cm; 3= 5,1 – 8,0 cm; 4= > 8,0 cm. DPC = Diâmetro do pseudocaule. Taxa de Multiplicação. Porcentagem de enraizamento.

Verificou-se que, plantas do sistema BIT foram as que apresentaram o maior teor de matéria fresca e seca total acumulada, independentemente da variedade. Esse resultado está de acordo com os publicados por Lemos et al. (2001) que também observaram que plantas da variedade ‘Terra’, quando produzidas em BIT, apresentaram maior acúmulo de biomassa.

Lemos et al. (2001) também observaram que, em sistema de imersão temporária, a produção de biomassa de bananeira foi 2,8 vezes maior do que a apresentada pelo sistema tradicional (meio semi-sólido), comprovando a eficiência do sistema de imersão. Segundo estes autores, essa maior produção



de biomassa, observada neste sistema, deve-se, provavelmente, a um maior contato do meio líquido com os explantes, o que proporcionou uma maior área de absorção e, conseqüentemente, melhor aproveitamento do meio de cultura. Diferentemente, no sistema tradicional SS, o meio de cultura utilizado semi-sólido limita a área de contato da planta com o meio de cultura, limitando, assim o pleno aproveitamento dos nutrientes pelas plantas.

Ainda segundo os autores, menores ciclos de imersão (a cada 4 horas por 10 min.) são importantes no aumento da biomassa, tanto quanto a renovação do meio a cada 30 dias. Isso possivelmente influencia no maior aproveitamento e esgotamento dos nutrientes do meio de cultura pelas plantas em cultivo e, provavelmente, na taxa de multiplicação. Na literatura existem alguns estudos que focam no manejo dos intervalos e na duração da imersão em espécies do gênero *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) (CASTRO; GONZÁLEZ, 2002; McALISTER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014), *Heliconia champneiana* (Heliconiaceae) (RODRIGUES et al., 2006), *Musa sapientum* (Musaceae) (LEMOS et al., 2001) e *Ananas comosus* (Bromeliaceae) (SILVA et al., 2007). Na maioria destes trabalhos, os menores intervalos entre as imersões favoreceram o desenvolvimento das culturas pelo maior aproveitamento do meio de cultura líquido pelas plantas.

**TABELA 2** Acúmulo de massa fresca e seca de plantas de bananeira, variedades 'Preciosa' e 'Thap Maeo', produzidas em sistemas de cultivo Semi-Sólido (SS) e em Biorreator de Imersão Temporária (BIT)

Variedades	Sistema de Cultivo*	Massa Fresca (g)**			Massa seca (g)		
		Parte Aérea	Raiz	Total	Parte Aérea	Raiz	Total
'Preciosa'	SS	5,0 b	1,1b	6,1 b	0,3b	0,0b	0,3b
	BIT	20,6a	3,5a	24,1a	1,3a	0,2a	1,5a
'Thap Maeo'	SS	4,1 b	1,6b	5,7 b	0,2b	0,0b	0,2b
	BIT	13,5a	3,3a	16,9a	1,0a	0,2a	1,2a
CV (%)		8,2	61,9	35,0	64,2	65,1	61,2

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.  
 \* Sistemas: Semi-Sólido (controle)= frascos de 250 mL de capacidade com 40 mL de meio semi-sólido. BIT = Biorreator de Imersão Temporária com frascos de 5000 mL de capacidade com 400 mL de meio líquido.



**FIGURA 1** Aspecto geral das plantas da variedade 'Preciosa' após cultivo em diferentes sistemas de cultivo: A. Durante a classificação; B e C. Plantas em sistema SS durante avaliação; D, E e F. Mudanças de bananeira oriundas de Biorreator de Imersão Temporária durante a avaliação e classificação.

### 3.2 Aclimatização das plantas produzidas *in vitro* em sistemas de micropropagação convencional e Biorreator de Imersão Temporária

Os dados referentes as avaliações realizadas durante 60 dias de aclimatização das plantas cultivadas em sistema SS e BIT estão descritos na Tabela 3. Observou-se que as plantas da variedade 'Preciosa' foram significativamente influenciadas pelo sistema de cultivo. Assim, quando produzidas em BIT as plantas apresentaram maior valor médio para altura (6,1 cm) e diâmetro do pseudocaule (5,9 mm). Já para a variedade 'Thap Maeo' não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os sistemas de cultivo utilizado quanto a estas variáveis.

No estudo de Costa et al. (2008), quando relaciona-se o diâmetro do pseudocaule com o número de raízes formadas também verifica-se que, aos 28 dias de aclimatização quando as plantas apresentaram maiores diâmetros de pseudocaule estas obtiveram também maior número e comprimento de suas raízes.

Além de oferecer apoio à planta, o pseudocaule tem capacidade de armazenar reservas amiláceas e hídricas (ALVES, 1999). Dessa forma, sugere-se que mudas com diâmetros de colo superiores possam originar plantas com sistema radicular mais vigoroso, favorecendo o pegamento, crescimento, desenvolvimento inicial, tolerância a intempéries (SANTOS et al., 2004) e conseqüentemente promover maior adaptação das plantas quando transferidas ao campo.

O número de folhas formadas foi a única variável que sofreu influencia negativa quando as plantas foram produzidas em sistema de cultivo BIT, independentemente da variedade estudada. Assim, verificou-se médias em torno de 3,4 folhas/planta para 'Preciosa' e 3,9 folhas/planta para 'Thap Maeo', quando formadas em BIT, enquanto que em sistema SS formaram-se 4,2 e 4,3 folhas/planta em média, respectivamente.

A taxa de sobrevivência das mudas em casa de vegetação foi superior a 70% na variedade 'Preciosa' e não diferiu entre os sistemas de cultivo utilizados (Figura 2 A e B). Já para a 'Thap Maeo' maior taxa de sobrevivência das plantas foi observada em sistema SS (97,2%), ao passo que em BIT verificou-se uma perda de aproximadamente 40% das mudas produzidas durante a aclimatização (Figura 2 C e D).

Essa menor taxa de sobrevivência das mudas produzidas em BIT durante a aclimatização possivelmente ocorreu devido ao fato de as plantas terem apresentado crescimento estiolado (Figura 2C). Apesar do tamanho dos frascos utilizados neste sistema, oferecer maior espaço para o desenvolvimento das plantas, não se deve permitir que estas permanessem em cultivo até atingir altura máxima permitida. Isso porque as condições as quais as plantas são impostas ocasionam crescimento exagerado em altura, tornando a planta estiolada e prejudicando sua sustentação durante a etapa de aclimatização e, conseqüentemente, perda de material e mão-de-obra. Scaranari (2006), ressalta a necessidade de um período de pré-aclimatização para maturação das plantas antes de serem levadas para aclimatização em casa de vegetação e para que as mudanças sejam graduais, este mesmo autor sugere que a altura das plantas não deva passar de 10 cm durante essa transição para garantir a sobrevivência das plantas.

Apesar de não existir na literatura, relatos sobre hiper-hidricidade em bananeiras, é consenso de muitos autores tais como Lamhamedi et al. (2003) e Vasconcelos et al. (2012) que, o maior contato das plantas com meio líquido pode

ocasionar acúmulo de água nas células e, conseqüentemente, maior taxa de transpiração sofrida pelas plantas durante a aclimatização. Elevada taxa de transpiração causa murchamento e inevitável perda de vigor das plantas (Figura 2 C e D). Por esse motivo, mudas produzidas através deste sistema requerem especial atenção durante a etapa de aclimatização.

Oliveira et al. (2014), são incisivos em determinar os cuidados com o manejo do cultivo de culturas produzidas por meio de biorreatores para se evitar problemas relativos a distúrbios fisiológicos das plantas. Dentre estes distúrbios Gaspar (1991) e Ziv (1991) citam o alongamento exagerado das mudas e formação de folhas mais espessadas e alongadas como sendo aspectos característicos de plantas durante o cultivo em biorreatores. Esses aspectos foram identificados visualmente (Figura 2 C e D) nas plantas da variedade 'Thap Maeo', embora esse fato não tenha sido observado na variedade 'Preciosa'.

**TABELA 3** Comportamento de plantas de bananeira, variedades 'Preciosa' e 'Thap Maeo', cultivadas em sistema de cultivo Semi-Sólido (SS) e em Biorreator de Imersão Temporária (BIT), após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação

Sistema de Cultivo*	'Preciosa'					'Thap Maeo'				
	Altura (cm)					Número de Folhas				
	C1	C2	C3	C4	Média	C1	C2	C3	C4	Média
SS	4,2A	3,9aA	3,9bA	nc*	4,0b	4,0aA	4,6aA	-	nc	4,3a
BIT	-	4,8aA	5,0aA	8,4B	6,1a	1,2bC	3,8aB	4,7B	6,3A	4,0a
CV (%)	26,5					27,7				
	Número de Folhas									
SS	4,5A	4,0aA	4,2aA	nc	4,2a	4,0aA	4,6aA	-	nc	4,3a
BIT	-	2,8bB	3,3bB	4,0A	3,4b	3,3aA	4,0bA	4,2A	4,1A	3,9b
CV (%)	21,6					17,5				
	Diâmetro do Pseudocaul (mm)									
SS	4,0A	5,2aA	5,7aA	nc	5,0b	5,0aA	6,0aA	-	nc	5,5a
BIT	-	5,3aA	5,6aA	6,9B	5,9a	3,4aC	4,9bB	5,8A	7,0A	5,3a
CV (%)	26,1					21,0				
	Taxa de Sobrevivência (%)									
SS	22,2aB	100,0aA	100,0aA	nc	74,1a	100,0aA	94,4aA	0,0 bB	nc	97,2a
BIT	0,0aC	38,9bB	94,4 aA	100,0A	77,8a	16,7bB	61,1aA	72,2aA	94,4A	61,1b
CV (%)	33,5					40,3				

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. \* Sistemas: Semi-Sólido (controle)= frascos de 250 mL de capacidade com 40 mL de meio semi-sólido. BIT = Biorreator de Imersão Temporária com frascos de 5000 mL de capacidade com 400 mL de meio líquido. Classes: 1 = 0 – 2,5 cm; 2= 2,6 – 5,0 cm; 3= 5,1 – 8,0 cm; 4= > 8,0 cm. Nc = não classificado material na classe correspondente.



**FIGURA 2** Aspecto das plantas de bananeira produzidas em sistema de Biorreator de Imersão Temporária durante a fase inicial da aclimatização em casa de vegetação: A e B. variedade ‘Preciosa’; C. variedade ‘Thap Maeo’ e D. Perda da variedade ‘Thap Maeo’ por murchamento.

### 3.3 Caracterização morfo-anatômica de folhas de plantas de bananeiras obtidas em sistemas de micropropagação convencional e Biorreator de Imersão Temporária

Na Tabela 4 pode ser observado os dados referentes aos estudos morfo-anatômicos de folhas de plantas de bananeira, após sua produção em sistema SS e BIT. De maneira geral observaram-se diferenças entre os sistemas de cultivo para maioria das características avaliadas.

Para espessura da cutícula, diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo foi observada apenas para a face abaxial para a variedade ‘Preciosa’. O cultivo *in vitro* em sistema SS foi o que proporcionou cutícula mais espessa chegando a 1,43  $\mu\text{m}$  na variedade ‘Thap Maeo’.

**TABELA 4** Características morfológicas e anatômicas de folhas de bananeira das variedades 'Preciosa' e 'Thap Maeo' cultivadas em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*

VARIÁVEIS**	'PRECIOSA'		'THAP MAEO'	
	SS*	BIT	SS	BIT
EC-ADA ( $\mu\text{m}$ )	0,88 $\pm$ 0,18	0,87 $\pm$ 0,13	1,43 $\pm$ 0,52 A	1,18 $\pm$ 0,46 B
EC-ABA ( $\mu\text{m}$ )	1,11 $\pm$ 0,04 A	0,94 $\pm$ 0,17 B	1,15 $\pm$ 0,41 A	0,92 $\pm$ 0,13 B
DE-ADA ( $\text{mm}^2$ )	8,22 $\pm$ 1,29 B	12,52 $\pm$ 1,64 A	6,42 $\pm$ 1,65	5,09 $\pm$ 1,47
DE-ABA ( $\text{mm}^2$ )	28,81 $\pm$ 5,13 B	41,25 $\pm$ 4,26 A	32,57 $\pm$ 2,83 A	21,27 $\pm$ 3,87 B
DEE-ADA ( $\mu\text{m}$ )	3,72 $\pm$ 2,37 A	3,41 $\pm$ 3,79 B	37,40 $\pm$ 2,09 A	32,21 $\pm$ 1,26 B
DEE-ABA ( $\mu\text{m}$ )	27,47 $\pm$ 2,42 A	18,12 $\pm$ 1,38 B	28,56 $\pm$ 1,25 B	34,05 $\pm$ 2,68 A
DPE-ADA ( $\mu\text{m}$ )	33,64 $\pm$ 1,95 B	38,13 $\pm$ 1,43 A	31,60 $\pm$ 1,44 B	33,03 $\pm$ 1,36 A
DPE-ABA ( $\mu\text{m}$ )	44,24 $\pm$ 0,74 A	17,94 $\pm$ 0,86 B	37,10 $\pm$ 2,49	37,51 $\pm$ 3,42
DP/DE-ADA ( $\mu\text{m}$ )	0,81 $\pm$ 0,07 B	1,25 $\pm$ 0,12 A	0,84 $\pm$ 0,07 B	1,02 $\pm$ 0,05 A
DP/DE-ABA ( $\mu\text{m}$ )	1,62 $\pm$ 0,16 A	0,99 $\pm$ 0,11 B	1,29 $\pm$ 0,13 A	1,11 $\pm$ 0,18 B
EEp-ADA ( $\mu\text{m}$ )	15,09 $\pm$ 2,37	13,05 $\pm$ 2,49	14,42 $\pm$ 1,70 A	10,75 $\pm$ 1,97 B
EEp-ABA ( $\mu\text{m}$ )	2,28 $\pm$ 2,67 B	2,54 $\pm$ 1,92 A	13,23 $\pm$ 1,65 A	9,12 $\pm$ 1,46 B
EHp-ADA ( $\mu\text{m}$ )	63,11 $\pm$ 13,88 B	82,33 $\pm$ 10,54 A	55,65 $\pm$ 3,89 B	63,59 $\pm$ 7,83 A
EHp-ABA ( $\mu\text{m}$ )	37,42 $\pm$ 16,26 B	58,94 $\pm$ 10,08 A	44,07 $\pm$ 4,66 B	52,22 $\pm$ 4,76 A
EPP ( $\mu\text{m}$ )	35,26 $\pm$ 10,27	39,95 $\pm$ 5,26	22,83 $\pm$ 3,49 B	29,27 $\pm$ 2,96 A
EPE ( $\mu\text{m}$ )	96,95 $\pm$ 26,81	109,27 $\pm$ 37,30	66,06 $\pm$ 7,11	68,99 $\pm$ 8,94
ELF ( $\mu\text{m}$ )	266,31 $\pm$ 71,82 B	332,92 $\pm$ 45,76 A	211,13 $\pm$ 13,91	242,63 $\pm$ 20,88

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F à 5% de probabilidade. \*SS= Sistema de cultivo em meio semi-sólido e BIT = Sistema de cultivo em Biorreator de Imersão Temporária. \*\*EC-ADA=Espessura da Cutícula adaxial; EC-ABA= Espessura da Cutícula abaxial; DE-ADA= Densidade estomática da face adaxial; DE-ABA= Densidade estomática da face abaxial; DEE-ADA= Diâmetro Equatorial do estômato da face adaxial; DEE-ABA= Diâmetro Equatorial do estômato da face abaxial; DPE-ADA= Diâmetro Polar do estômato da face adaxial; DPE-ABA= Diâmetro Polar do estômato da face abaxial; DP/DE-ADA= Diâmetro Polar/Diâmetro Equatorial da face adaxial; DP/DE-ABA= Diâmetro Polar/Diâmetro Equatorial da face abaxial; EEp-ADA= Espessura da epiderme da face adaxial; EEp-ABA= Espessura da epiderme da face abaxial; EHp-ADA= Espessura da hipoderme da face adaxial; EHp-ABA= Espessura da hipoderme da face abaxial; EPP= Espessura do parênquima paliçádico; EPE= Espessura do parênquima esponjoso; ELF= Espessura do limbo foliar.

Quanto aos estômatos, maior densidade foi observada na face abaxial para ambas variedades. Contudo, houve diferenças estatísticas entre a densidade de estômatos observadas entre os cultivos onde na variedade 'Preciosa' o cultivo em Biorreator de imersão temporária foi o que apresentou maior densidade enquanto que para 'Thap Maeo' foi observado este comportamento no sistema semi-sólido com média de 32,57 estômatos/ $\text{mm}^2$ .

Costa et al. (2009a) avaliando a influência do ambiente de cultivo na densidade estomática de folhas de bananeira, também observaram maior densidade na face abaxial e relataram que incremento para esta variável está relacionado ao ambiente de cultivo.

Alta densidade estomática observada em bananeira cultivada *in vitro* é frequentemente relatada também para outras espécies e tem sido associada, especialmente, com a elevada umidade relativa do ar no interior dos frascos de cultivo (KHAN et al., 2003).

Quanto às características morfológicas dos estômatos, observou-se diferenças estatísticas nos estômatos de ambas as faces foliares, tanto para variedade 'Preciosa' quanto para 'Thap Maeo' em relação ao diâmetro equatorial. Para ambas variedades o diâmetro equatorial na face adaxial foi maior em Sistema SS que em BIT, 3,72  $\mu\text{m}$  na 'Preciosa' e 37,40  $\mu\text{m}$  na 'Thap Maeo'. Já na face abaxial o mesmo comportamento foi verificado apenas na variedade 'Preciosa' enquanto que para 'Thap Maeo' maior diâmetro equatorial foi verificado nos estômatos das folhas de plantas cultivadas e BIT.

O diâmetro polar dos estômatos foi significativamente menor na face abaxial das folhas da variedade 'Preciosa' quando cultivada em BIT (17,94  $\mu\text{m}$ ).

No entanto, visualmente, pode-se verificar neste estudo (Figura 2 e 3 I, J, k e L), estômatos com formato mais arredondado fato que pôde ser confirmado com os dados referentes ao tamanho dos estômatos. Autores como Khan et al. (2002) afirmam que o formato dos estômatos pode estar relacionado com a sua funcionalidade. Estes autores afirmam que estômatos mais arredondados são pouco funcionais. Isso pode ocorrer devido ao excesso de água absorvida durante o cultivo, que tornam as células mais túrgidas e as plantas hiperídricas, em razão da deficiência em celulose e lignina, que causa redução da pressão da parede celular (ZIV, 1991; MACHADO; BIASI, 2011).

Assim, para variedade 'Preciosa' maiores resultados quanto à relação diâmetro polar/diâmetro equatorial da face adaxial foi observada para o sistema BIT com valor médio de 1,25  $\mu\text{m}$  e na face abaxial no sistema SS com 1,62  $\mu\text{m}$ . A variedade 'Thap Maeo' apresentou comportamento semelhante e médias variaram de 0,84  $\mu\text{m}$  em SS a 1,02  $\mu\text{m}$  em BIT na face adaxial, e na face abaxial variou de 1,29 a 1,11  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Há evidências de que a relação entre os diâmetros estomáticos polares e equatoriais é importante para determinar o momento de transferir bananeiras do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* sendo verificado por ROCHA, 2005 que estômatos com valores médios para a relação DP/DE em torno de 1,80  $\mu\text{m}$  são considerados estômatos funcionais e, portanto,

evita-se sobremaneira a excessiva perda de água, o que contribui para que as plantas sejam facilmente adaptadas às novas condições.

Avaliações realizadas nas seções transversais das folhas de bananeira mostraram que diferenças na espessura da epiderme da face adaxial foram observadas apenas na variedade 'Thap Maeo' entre os sistemas de cultivo, onde a média foi de 14,42  $\mu\text{m}$  em SS e 10,75  $\mu\text{m}$  em BIT. Para variedade 'Preciosa' maior espessura da epiderme foi de 15,09  $\mu\text{m}$  em plantas do sistema SS. Já na face abaxial houveram diferenças entre os sistemas para ambas as variedades analisadas, onde para 'Preciosa' o sistema BIT foi o que apresentou maior valor médio para espessura da epiderme 2,54  $\mu\text{m}$  enquanto que para a 'Thap Maeo' comportamento oposto ocorreu, ou seja, o maior valor médio para espessura da epiderme foi observado em SS.

De modo geral, a epiderme da face adaxial apresentou sempre maior espessura que a epiderme da face abaxial, conforme já reportado por Costa et al. (2009) em bananeiras e ainda por Pereira (2004) em plantas micropropagadas de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa*. Rocha (2005) correlaciona essa característica ao fato de serem as células da epiderme adaxial quem recebe a maior irradiância.

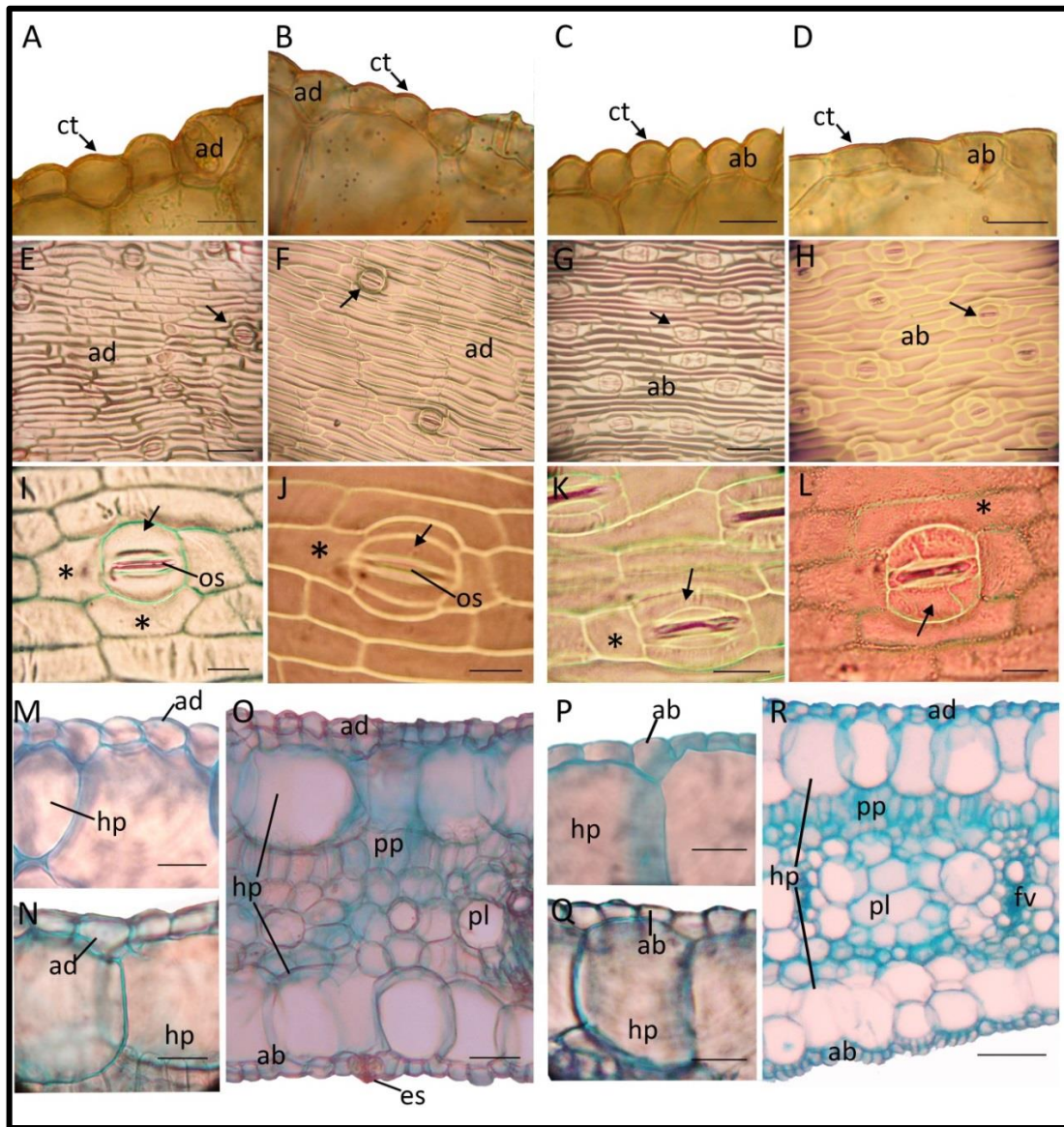
Quanto à espessura da hipoderme foram verificadas diferenças tanto da face adaxial quanto da abaxial em ambas as variedades, onde as maiores médias foram detectadas em sistema de cultivo BIT com médias de 82,33  $\mu\text{m}$  na face adaxial e 58,94  $\mu\text{m}$  na face abaxial para 'Preciosa e 63,59  $\mu\text{m}$  na face adaxial e 52,22  $\mu\text{m}$  na face abaxial em 'Thap Maeo'. Tal incremento para o tamanho das células hipodérmicas nesse sistema pode estar relacionado com a consistência do meio de cultura. Meio de consistência líquida proporciona maior acúmulo de água nas células contribuindo, com isso, para o seu aumento. Costa et al. (2014) relataram em seus estudos com abacaxizeiro cultivado em meio líquido, incremento no tamanho das células de alguns tecidos dentre os quais, a hipoderme.

Para a espessura do parênquima paliçádico não foram observadas diferenças significativas entre os sistemas de cultivo em 'Preciosa'. Enquanto que em 'Thap Maeo' o sistema BIT foi o que apresentou maior espessura do parênquima paliçádico, 29,27  $\mu\text{m}$ . Já para a espessura do parênquima esponjoso não foram detectadas diferenças estatísticas para nenhuma das

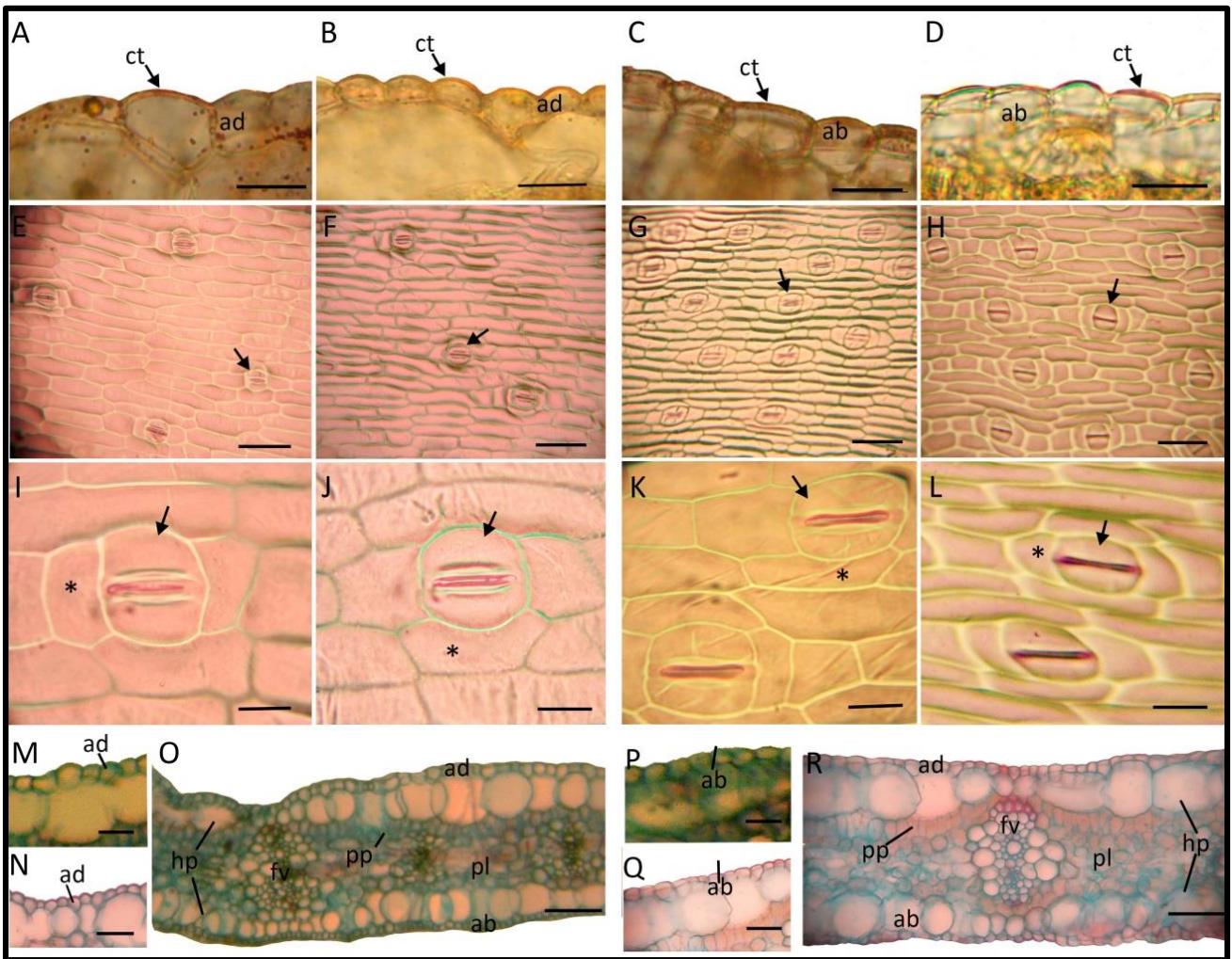


variedades estudadas em nenhum dos sistemas de cultivo utilizado. Muito embora essas diferenças estatísticas não tenham ocorrido entre os tecidos parenquimáticos, quando o limbo foliar foi medido observou-se diferença na sua espessura total quando comparou-se os sistemas cultivo utilizado para variedade 'Preciosa'.

Analisando visualmente as características das estruturas do limbo foliar verificou-se que independentemente do sistema de cultivo, tanto a 'Preciosa' (Figura 3 O e R) quanto a 'Thap Maeo' (Figura 4 O e R), apresentaram parênquimas com células uniformes e organizadas com pouco ou nenhum espaço inter-celular.



**FIGURA 3** Fotomicrografia de folhas de bananeira variedade 'Preciosa'. Seções transversais para análise da cutícula: A. Face adaxial de folhas em sistema SS; B. Sistema BIT; C. Face abaxial de folhas em sistema SS; D. Sistema BIT; Epiderme em vista frontal: E. Face adaxial em sistema SS; F. Sistema BIT e abaxial; G. Sistema SS; H. Sistema BIT. Aspecto anatômico de estômatos em detalhe, da face adaxial: I. Sistema SS; J. Sistema BIT e abaxial; K. Sistema SS; L. Sistema BIT. Seções transversais obtidas da região da lâmina foliar para observação do arranjo celular dos tecidos foliares: M e N. face adaxial em Sistema SS; O e R. faces adaxial e abaxial em sistema BIT; P e Q - face abaxial em sistema SS. Legenda: ct – cutícula; ad – adaxial; ab – abaxial; seta – estômato; os – ostíolo; \* - células subsidiárias; ep – epiderme; hp – hipoderme; pp – parênquima paliçádico; pl – parênquima lacunoso; fv – feixe vascular; es – Estômato. (Escala em A, B, C, D, I, J, K, L, M, N, O, P equivalem à 20 µm; e em E, F, G, H, Q, R equivalem a 50 µm).



**FIGURA 4** Fotomicrografia de folhas de bananeira variedade 'Thap Maeo'. Seções transversais para análise da cutícula: A. Face adaxial de folhas em sistema SS; B. Sistema BIT; C. Face abaxial de folhas em sistema SS; D. Sistema BIT; Epiderme em vista frontal: E. Face adaxial em sistema SS; F. Sistema BIT e abaxial; G. Sistema SS; H. Sistema BIT. Aspecto anatômico de estômatos em detalhe, da face adaxial: I. Sistema SS; J. Sistema BIT e abaxial; K. Sistema SS; L. Sistema BIT. Seções transversais obtidas da região da lâmina foliar para observação do arranjo celular dos tecidos foliares: M e N. face adaxial em sistema SS; O e R. Faces adaxial e abaxial em sistema BIT; P e Q - face abaxial em sistema SS. Legenda: ct – cutícula; ad – adaxial; ab – abaxial; seta – estômato; os – ostíolo; \* - células subsidiárias; ep – epiderme; hp – hipoderme; pp – parênquima paliçádico; pl – parênquima lacunoso; fv – feixe vascular; es – Estômato. (Escala em A, B, C, D, I, J, K, L, M, N, O, P equivalem à 20 µm; e em E, F, G, H, Q, R equivalem a 50 µm).

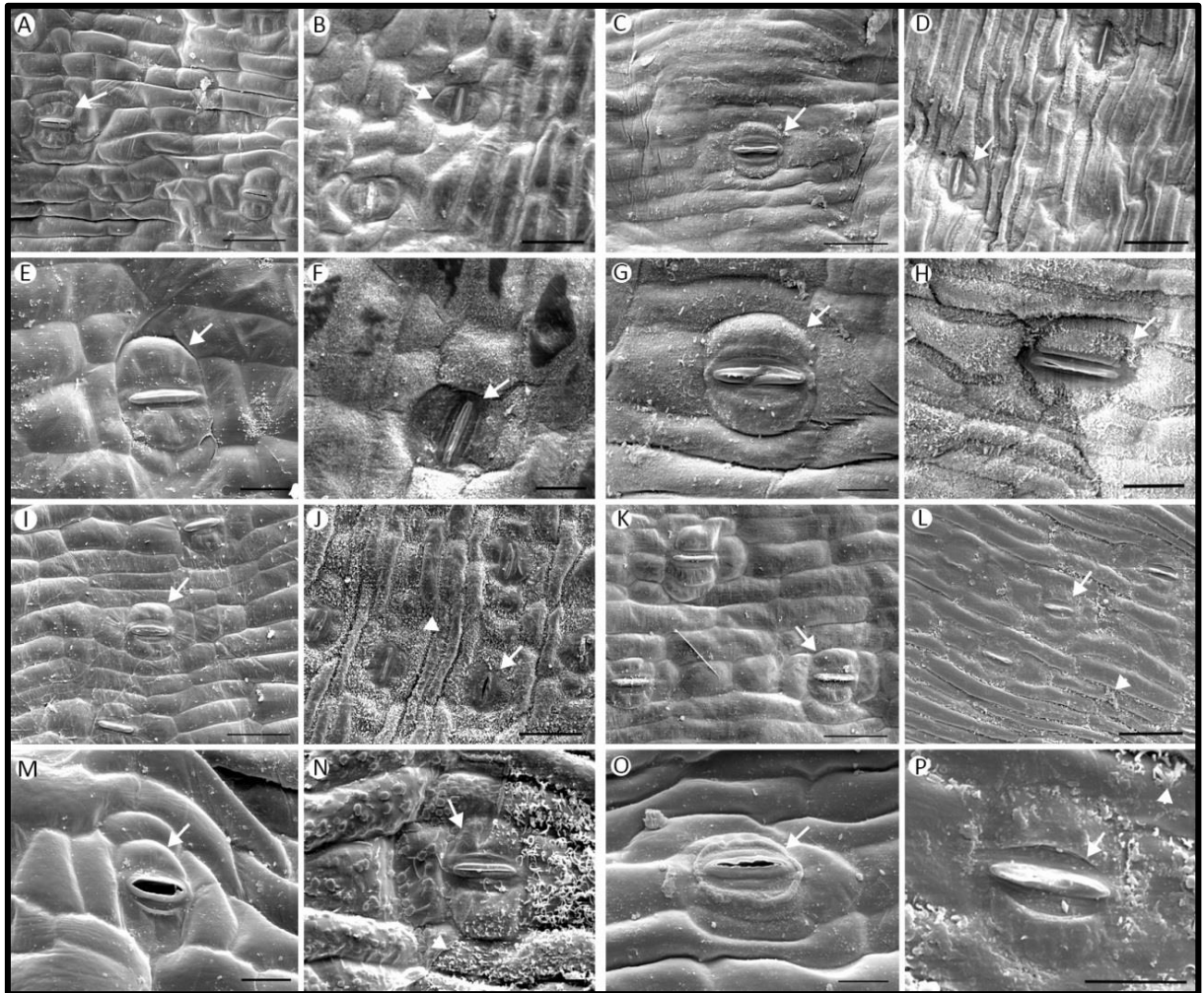
### 3.4 Caracterização morfo-anatômica via microscopia eletrônica de varredura de folhas de bananeira durante a fase *in vitro* e *ex vitro*, após o cultivo em sistemas de micropropagação convencional e Biorreator de Imersão Temporária

Observações visuais quanto a morfologia e o aspecto das folhas de bananeira das variedades 'Preciosa' e 'Thap Maeo' produzidas em sistema SS e BIT, sob condições *in vitro* e após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação podem ser observadas na Figura 5 e 6.

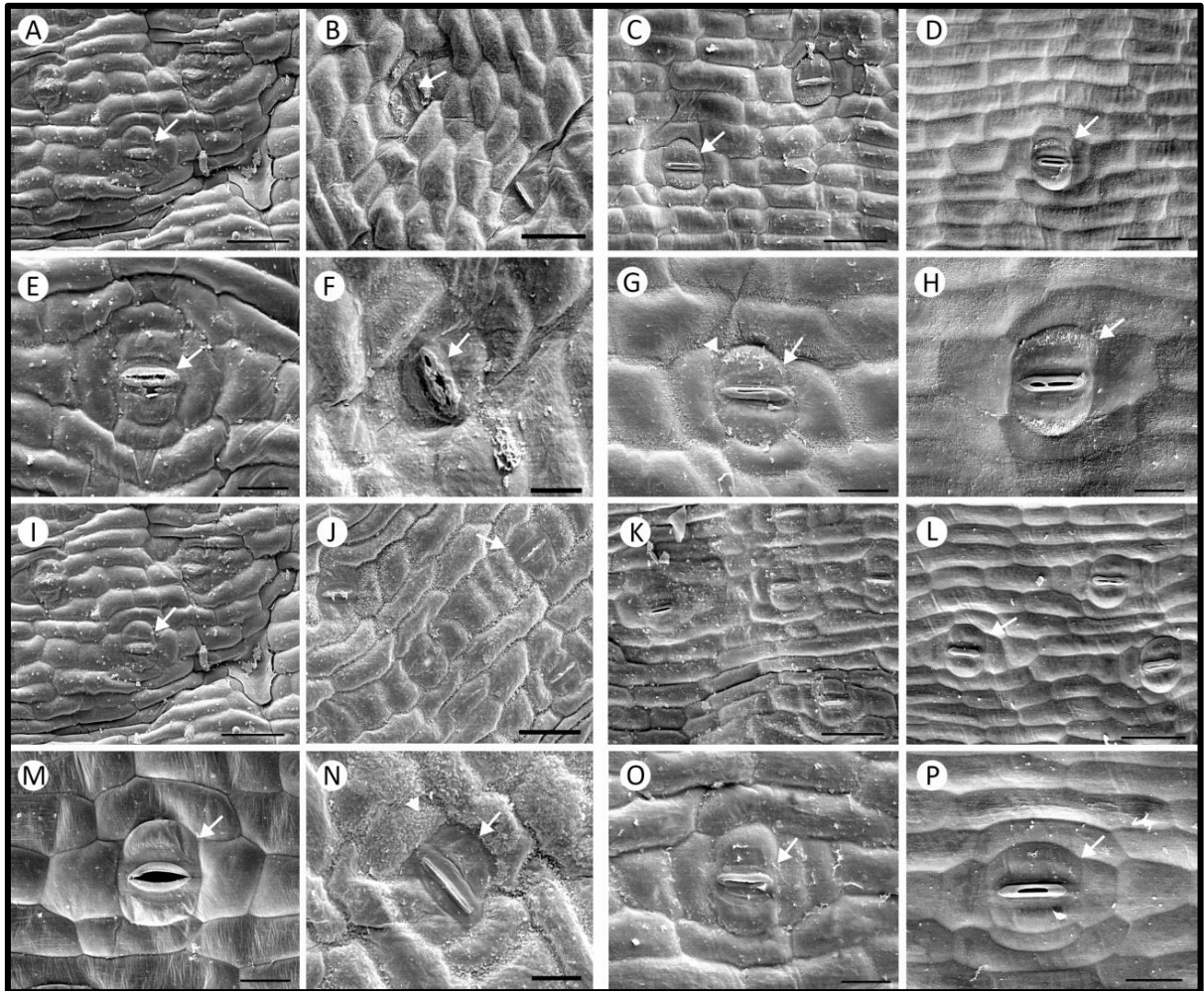
Visualmente, não foram detectadas diferenças na morfologia de células e estômatos para nenhuma das variedades e sistemas de cultivo, independentemente do período em que foram avaliadas.

De modo geral observou-se que tanto para variedade 'Preciosa' (Figura 5) quanto para 'Thap Maeo' (Figura 6), houve maior acúmulo de cera epicuticular nas folhas já durante a aclimatização. A quantidade de cera epicuticular é um parâmetro importante durante a aclimatização, uma vez que essa camada recobre a cutícula e protege a folha, ajudando a minimizar a perda de água por transpiração. Entretanto, Hazakira (2003) afirma que não apenas a quantidade de cera como também a sua composição química pode ser responsável pela perda de água de plantas micropropagadas. A cera cuticular das plantas cultivadas *in vitro* possuem altas proporções de ésteres e compostos polares com cadeias de hidrocarbonetos menores do que as folhas de plantas *ex vitro* (COSTA, 2012).

Além disso, pode-se observar ainda que nas Figuras 5 e 6 que os estômatos apresentam-se ligeiramente deprimidos em relação à superfície foliar, independentemente do ambiente de cultivo. Rocha (2005) também verificou esta característica em folhas de bananeira durante a micropropagação quando usou luz artificial e correlacionou esta característica como sendo indicativo de boa funcionalidade dos estômatos. Contudo, é importante destacar que os explantes em fase de multiplicação necessitam de ótimos níveis de atividades metabólicas para que ocorram as maiores taxas de multiplicação *in vitro*. Neste sentido, o aspecto da maior densidade estomática participa com maior importância nesta etapa do que a funcionalidade estomática, haja vista que no interior dos frascos de cultura a umidade relativa é de 100%, e não ocorrem perdas de explantes por dessecação (ROCHA, 2005).



**FIGURA 5** Eletromicrografia de varredura da epiderme em vista frontal de folhas de bananeira da variedade 'Preciosa'. Face adaxial: Sistema SS A. após cultivo *in vitro* e B. após 30 dias em casa de vegetação; Sistema BIT C. após cultivo *in vitro* e D. após 30 dias em casa de vegetação. Estômatos em maior detalhe: Face adaxial do sistema SS E. após o cultivo *in vitro* e F. após 30 dias em casa de vegetação; Face adaxial do sistema BIT G. após o cultivo *in vitro* e H. após 30 dias em casa de vegetação. Face Abaxial: Sistema SS I. após cultivo *in vitro* e J. após 30 dias em casa de vegetação; Sistema BIT K. após cultivo *in vitro* e L. após 30 dias em casa de vegetação. Estômatos em maior de detalhe: Face abaxial do sistema SS M. após o cultivo *in vitro* e N. após 30 dias em casa de vegetação; Face abaxial do sistema BIT O. após o cultivo *in vitro* e P. após 30 dias em casa de vegetação. (Escala em A, B, C, D, I, J, K, L equivalem à 50  $\mu\text{m}$ ; e em E, F, G, H, M, N, O, P equivalem a 20  $\mu\text{m}$  ).



**FIGURA 6** Eletromicrografia de varredura da epiderme em vista frontal de folhas de bananeira da variedade 'Thap Maeo'. Face adaxial: Sistema SS A. após cultivo *in vitro* e B. após 30 dias em casa de vegetação; Sistema BIT C. após cultivo *in vitro* e D. após 30 dias em casa de vegetação. Estômatos em maior detalhe: Face adaxial do Sistema SS E. após o cultivo *in vitro* e F. após 30 dias em casa de vegetação; Face adaxial do Sistema BIT G. após o cultivo *in vitro* e H. após 30 dias em casa de vegetação. Face Abaxial: Sistema SS I. após cultivo *in vitro* e J. após 30 dias em casa de vegetação; Sistema BIT K. após cultivo *in vitro* e L. após 30 dias em casa de vegetação. Estômatos em maior de detalhe: Face abaxial do sistema SS M. após o cultivo *in vitro* e N. após 30 dias em casa de vegetação; Face abaxial do sistema BIT O. após o cultivo *in vitro* e P. após 30 dias em casa de vegetação. (Escala em A, B, C, D, I, J, K, L equivalem à 50  $\mu\text{m}$ ; e em E, F, G, H, M, N, O, P equivalem a 20  $\mu\text{m}$ ).

Comparando-se as características morfológicas das folhas de plantas cultivadas em sistema SS e BIT durante o cultivo *in vitro* e de folhas produzidas após 30 dias de aclimatização, observou-se dentro de cada sistema diferenças estatísticas quanto a influência do ambiente (Tabela 5).

Para variedade 'Preciosa', verificou-se que apenas no sistema BIT houve um aumento significativo da densidade estomática em ambas as faces da folha quando as mudas passaram do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. Silva et al. (2010) também verificaram incremento na densidade estomática em plantas de bananeira ao longo das fases de desenvolvimento *in vitro*, aclimatização e campo.

Já Costa et al. (2009) também trabalhando com bananeira e avaliando esse material por até 120 dias da aclimatização, observaram um decréscimo na frequência estomática das plantas. Vários outros autores também tem reportado a redução na densidade estomática com o incremento do período de aclimatização também em outras espécies (Pereira, 2004), sendo essa característica inclusive relatada como sendo um processo característico da fase da aclimatização (LEE et al., 1988).

De acordo com Braga (2006), o decréscimo no número de estômatos por  $\text{mm}^2$  ocorre devido ao fato de as células da epiderme, bem como as dos demais tecidos foliares, apresentarem elevada taxa de crescimento e divisão durante o período de aclimatização. Neste estudo e para ambas as variedades, o tempo de avaliação (30 dias) não foi suficiente para se observar aumento nos níveis de crescimento e divisão das células, sugerindo que avaliações em diferentes períodos de aclimatização sejam realizadas para melhor caracterizar este processo.

Para a 'Thap Maeo' diferenças significativas quanto a densidade estomática da face adaxial, apenas foi observada entre os sistemas de cultivo durante período *in vitro*. Onde o sistema SS apresentou maior densidade estomática (27,8 estômato/ $\text{mm}^2$ ) em relação ao BIT (22,2 estômato/ $\text{mm}^2$ ). Enquanto que comportamento oposto foi observado na face abaxial, onde maior densidade estomática foi verificada em ambiente *ex vitro*. Nestas condições também verificou-se maior número de estômatos em sistema SS (85,9 estômato/ $\text{mm}^2$ ) quando comparado com o sistema BIT (65,6 estômato/ $\text{mm}^2$ ) (Tabela 5).

Quando os sistemas foram analisados individualmente, observou-se que apenas em SS houve influência do ambiente de cultivo apenas na face adaxial, onde a para 'Thap Maeo' foi verificado decréscimo do número de estômatos quando as plantas passaram do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*.

Na face adaxial das plantas da variedade 'Preciosa' observaram-se diferenças significativas em relação diâmetro equatorial dos estômatos entre os ambientes apenas no sistema BIT de cultivo, sendo verificado maior diâmetro equatorial em plantas durante o cultivo *in vitro* (48,0  $\mu\text{m}$ ). Já na face abaxial maior diâmetro equatorial dos estômatos foi observado durante a fase *in vitro* tanto em sistema SS (42,7  $\mu\text{m}$ ) quanto em BIT (42,4  $\mu\text{m}$ ). Individualmente não houve diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo independentemente do ambiente.

Já na 'Thap Maeo', apenas na face abaxial foi observada diferenças quanto ao diâmetro equatorial do estômato, sendo maior durante a aclimatização. Este resultado corrobora com os obtidos por Silva et al. (2010), estes autores também descrevem maior diâmetro equatorial em plantas de bananeira durante a aclimatização, o que deve estar relacionado com a maior funcionalidade dos estômatos e conseqüente adaptação das plantas a nova condição.

Para o diâmetro polar dos estômatos na variedade 'Preciosa' em sistema SS não foi verificada diferenças significativas entre os ambientes de cultivo, em nenhuma das faces analisadas. Assim, as médias da face adaxial foram de 31,5  $\mu\text{m}$  durante ambiente *in vitro* e 32,2  $\mu\text{m}$  em ambiente *ex vitro* e na face abaxial foi de 34,4  $\mu\text{m}$  *in vitro* e 30,1  $\mu\text{m}$  *ex vitro*.

Já em BIT foi observada influência do ambiente de cultivo em ambas as faces. De modo geral, o diâmetro polar foi maior em ambiente *in vitro* onde os valores foram de 42,5  $\mu\text{m}$  e 40,9  $\mu\text{m}$  nas faces adaxial e abaxial, respectivamente.

Na variedade 'Thap Maeo', comportamento oposto foi constatado, onde maior diâmetro polar foi observado no sistema SS foi observado em ambas as faces durante a aclimatização (35,3  $\mu\text{m}$  face adaxial e 34,4  $\mu\text{m}$  face abaxial). Já em BIT, maior diâmetro polar da face adaxial foi observado em ambiente *in vitro*, enquanto que na face abaxial comportamento oposto foi observado, sendo verificado maior diâmetro polar do estômato (30,7  $\mu\text{m}$ ) na fase de aclimatização. Costa et al. (2009) também relataram maior diâmetro polar em mudas durante a aclimatização apresentando valores médios em torno de 35,9  $\mu\text{m}$  face adaxial e 36,6  $\mu\text{m}$  face abaxial.

De modo geral, a relação entre diâmetro polar e equatorial apresentou aumento quando as plantas passaram do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* no sistema SS em ambas as variedades. Apenas para 'Thap Maeo' verificou-se que na face adaxial o diâmetro polar foi menor durante a aclimatização. Entretanto, os valores observados para esta variável, independentemente da face ou sistema de cultivo,



variou de 0,6 a 1,0  $\mu\text{m}$ , enquanto que Costa et al. (2009), aferiram valores superiores a 1,0  $\mu\text{m}$  quando compararam o material de banana em ambiente *in vitro* e *ex vitro* por até 120 dias.

Rocha (2005) considera que apenas a análise da densidade estomática não seja um parâmetro confiável para verificação da adaptabilidade anatômica durante o processo de aclimatização. Esse autor indica que o formato das células guarda e o estudo da relação entre o diâmetro polar e equatorial dos estômatos seja um parâmetro capaz de indicar, de maneira segura, a funcionalidade estomática. Segundo os estudos relatados por Khan et al. (2002), quanto maior a relação diâmetro polar/equatorial, mais elipsóide será o formato do estômato. Estes autores afirmam que estômatos que apresentam essa característica elíptica em seu formato são mais funcionais, enquanto que àqueles que apresentam formas arredondadas estão associados com a pouca ou nenhuma funcionalidade dos mesmos.

Ainda quanto a forma dos estômatos, Desjardins et al. (1995) também observaram em seus estudos que estômatos de vitroplantas são mais circulares que elípticos, o que dificulta o seu fechamento quando necessário, como por exemplo, durante a aclimatização, justificando com isso, sua baixa funcionalidade.

Neste estudo, tanto visualmente (Figura 5 e 6 A a P) quanto pela relação diâmetro polar/equatorial, pode-se observar estômatos com formato mais arredondados, o que pode indicar a pouca funcionalidade dos mesmos. Este fato pode inclusive, justificar a baixa taxa de sobrevivência de algumas plantas durante a aclimatização.

Costa et al. (2009) também verificaram pouca ou quase nenhuma alteração entre plantas *in vitro* com àquelas com 21 e 42 dias de aclimatização, para algumas características anatômicas de folhas de bananeira. Romano e Martins-Loução (2003) também observaram que algumas características verificadas em folhas *in vitro* persistiam nas primeiras folhas desenvolvidas *ex vitro*, chamadas folhas de transição.

**TABELA 5** Características morfométricas de folhas de bananeira das variedades ‘Preciosa’ e ‘Thap Maeo’ cultivadas em sistemas Semi-Sólido (SS) e Biorreator de Imersão Temporária (BIT) durante diferentes etapas do processo: *in vitro* e *ex vitro*

Período	‘PRECIOSA’		Média	‘THAP MAEO’		Média
	SS	BIT		SS	BIT	
<b>Densidade Estomática da face adaxial (mm<sup>2</sup>)</b>						
<i>In vitro</i>	13,1aA	5,6bB	9,3b	27,8aA	22,2aB	25,0a
<i>Ex vitro</i>	13,5aB	19,3aA	16,4a	15,4bA	18,8aA	17,1b
<b>Média</b>	13,2A	12,4A		21,6A	20,5A	
<b>CV (%)</b>	13,4			16,3		
<b>Densidade Estomática da face abaxial (mm<sup>2</sup>)</b>						
<i>In vitro</i>	45,9aA	38,6bA	42,2b	82,1aA	74,4aA	78,2a
<i>Ex vitro</i>	45,4aB	70,5aA	58,0a	85,9aA	65,6aB	75,7a
<b>Média</b>	45,6A	54,5A		84,0A	70,0B	
<b>CV (%)</b>	19,8			17,5		
<b>Diâmetro Equatorial do estômato da face adaxial (µm)</b>						
<i>In vitro</i>	42,2aA	48,0aA	45,1a	36,6bB	40,6aA	38,6b
<i>Ex vitro</i>	37,9aA	32,2bA	35,0b	40,9aA	42,3aA	41,6a
<b>Média</b>	40,0A	40,1A		38,7B	41,45A	
<b>CV (%)</b>	12,9			5,0		
<b>Diâmetro Equatorial do estômato da face abaxial (µm)</b>						
<i>In vitro</i>	42,7aA	42,4aA	42,5a	33,5bA	38,8aA	36,1a
<i>Ex vitro</i>	28,2bA	32,5bA	30,3b	39,4aA	38,8aA	39,1a
<b>Média</b>	35,4A	37,4A		36,4A	38,8A	
<b>CV (%)</b>	10,2			11,2		
<b>Diâmetro Polar do estômato da face adaxial (µm)</b>						
<i>In vitro</i>	31,5aB	42,5aA	37,0a	26,9bB	30,8aA	28,8b
<i>Ex vitro</i>	32,2aB	37,4bA	34,8b	35,3aA	27,5bB	31,4a
<b>Média</b>	31,8B	39,9A		31,1A	29,1A	
<b>CV (%)</b>	5,8			8,0		
<b>Diâmetro Polar do estômato da face abaxial (µm)</b>						
<i>In vitro</i>	34,4aB	40,9aA	37,5a	23,8bA	25,2bA	24,5b
<i>Ex vitro</i>	30,1aA	33,1bA	31,6b	34,4aA	30,7aB	32,5a
<b>Média</b>	32,2B	37,0A		29,1A	27,9A	
<b>CV (%)</b>	11,8			9,5		
<b>Diâmetro Polar/Diâmetro Equatorial do estômato da face adaxial (µm)</b>						
<i>In vitro</i>	0,7aA	0,8bA	0,7b	0,7bA	0,7aA	0,7a
<i>Ex vitro</i>	0,8aB	1,1aA	0,9a	0,8aA	0,6bB	0,7a
<b>Média</b>	0,7B	0,9A		0,7A	0,6B	
<b>CV (%)</b>	11,7			9,4		
<b>Diâmetro Polar/Diâmetro Equatorial do estômato da face abaxial (µm)</b>						
<i>In vitro</i>	0,8bA	0,9aA	0,8b	0,7bA	0,6bA	0,6b
<i>Ex vitro</i>	1,0aA	1,0aA	1,0a	0,8aA	0,7aA	0,7a
<b>Média</b>	0,9A	0,9A		0,7A	0,6B	
<b>CV (%)</b>	13,9			10,0		

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade. SS= Sistema de cultivo em meio Semi-Sólido e BIT = Sistema de cultivo em Biorreator de Imersão Temporária. *In vitro*: folhas coletadas após 6 subcultivos; *Ex vitro*: folhas coletadas após 30 dias de aclimatização.

## 4 CONCLUSÕES

- Biorreator de Imersão Temporária proporciona maior incremento em altura em plantas de bananeira;
- Plantas produzidas em Biorreator de Imersão Temporária apresentam maior acúmulo de biomassa fresca e seca do que àquelas produzidas em sistema Semi-Sólido;
- Biorreator de Imersão Temporária proporciona menores taxas de multiplicação do que sistemas Semi-Sólidos e são mais indicados para serem utilizados durante as fases de alongamento/enraizamento de plantas de bananeira *in vitro*;
- Plantas produzidas em sistema de Biorreator de Imersão Temporária apresentam características morfo-anatômicas semelhantes àquelas produzidas em sistemas Semi-Sólido;
- A aclimatização incremento a formação de cera epicuticular em plantas das variedades 'Preciosa' e 'Thap Maeo' produzidas *in vitro* em sistemas Semi-Sólido e Biorreator de Imersão Temporária.

## REFERÊNCIAS

AFREEN, F. Temporary immersion bioreactor – Engineering considerations and applications in plant micropropagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, p. 187-201, 2006.

ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômico e agroindustriais**. 2 ed. Brasília, DF: EMBRAPA, 1999, 585 p.

ARIGITA, L. et al. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, n.1, p.166-173, 2002.

BRAGA, F. T. **Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema gradiflora* Tazvelev cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas**. 2006, 119 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, MG.

CARNEIRO, I. F.; ZICA, L. F.; CHAVES, L. J. Quebra da dominância apical, por processos físicos, em cultivo *in vitro* de bananeira-Maçã. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.29, n.2, p.51-57, 1999.

CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, O. J. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 62, p. 68-78, 2002.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S. Y.; ALI, M. A. SHIN, K. S.; PAEK, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, Canadá, v. 26, p. 377-388, 2005.

COSTA, S. M.; FRÁGUAS, C. B.; PRADO, D. Z. do; LIMA, G. P. P. Ácido 2,3,5-tri-iodobenzoico (Tiba) na micropropagação de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 440-448, 2014.

COSTA, D. A. **Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar sob o cultivo *in vitro* em diferentes microambientes**. 2012, 82 p. Tese (Doutorado em Botânica) pela Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 2012.

COSTA, F. H. da S.; CASTRO, E. M. de; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OLIVEIRA, C. de. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, v.39, n. 2, 2009.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; ROCHA, H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; CASTRO, E. M. de; MIYATA, L. Y. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.2, p.303-311, 2009a.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; RODRIGUES, F. A.; MIYATA, L. Y. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.30, n.1, p.31-37, 2008.

DESJARDINS, Y.; HDIDER, C.; RIEK, J. Carbon nutrition *in vitro* – regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; LILA-SMITH, M. (Eds.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.371-403.

GASPAR, T. et al. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, v. 1, p. 152-166, 1987.

GASPAR, T. Vitrification in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry – High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, v. 17, p. 116-126, 1991.

IQBAL, M. M.; MUHAMMAD, A.; USSAIN, I.; BILAL, H. Optimization of *in vitro* micropropagation protocol for banana (*Musa sapientum* L.) under different hormonal concentrations and growth media. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 2, n. 1, p. 23-27, 2013.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v.27, p.137-138, 1965.

KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-146, 2002.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the in vitro culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.55, n.2, p.141-14, 1999.

LAMHAMEDI, M. et al. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. **Physiologia Plantarum**, v.118, p.554-561, 2003.

LAI, C. C.; LIN, H. M.; NALAWADE, S. M.; FANG, W.; TSAY, H. S. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 355-361, 2005.

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of in vitro-and in vivo developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, 1988.

LEMOS, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana CV. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.482-487, 2001.

LEMOS, E.E.P. **Experimentos em micropropagação e organogênese na graviola (A. muricata L.)**. Maceió: EDUFAL, 1996. 43p.

LIMA, E. da C. A. **Propagação clonal *in vitro* de abacaxizeiros em sistema dupla-fase e conservação de germoplasma sob regime de crescimento mínimo.** 2009, 82p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma - Produção Vegetal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2009.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A. Morfoanatomia das folhas do porta-enxerto de videira VR043-43' (*Vitis vinifera* L. × *Vitis rotundifolia* michx.) em diferentes condições de cultivo. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambiental**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2011.

MAJADA, J. P.; TADEO, F.; FAL, M. A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 207-214, 2000

McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P. BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 347-358, 2005.

MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v.2, n.15, p.107-112, 2003.

OLIVEIRA, M. L. de; XAVIER, A.; PANCHEL-FILHO, R. M.; REIS, J. P. dos. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 37-45, 2014.

OLIVEIRA, R. P. de. Concentração de bap e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia agrícola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.73-78, 2001.

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 199-205, 2004.

PEREIRA, M. R. **Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação de bananeira cv. WilliAms.** 2014, 102p. Dissertação (Mestrado em produção vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goyatazes – RJ, 2014.

PEREIRA, R. de C. A. **Anatomia foliar comparada de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. e *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemerr & Schultes) como subsídio ao estudo de micropropagação *in vitro*.** 2004. 133f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Biologia vegetal.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. (Ed.). **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells.** New York: Elsevier, 1978. p. 343-444.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”: alterações morfoanatômicas.** 2005, 98p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, 2005.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; Ambrosano, G. M. B. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, p. 57-66, 2005.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of Cork Oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, n.616, p.439-442, 2003.



SANTOS, J. de A. dos; SILVA C. R. de R. E., CARVALHO, J. G. de, NASCIMENTO, T. B. do. Efeito do calcário dolomítico e nitrato de potássio no desenvolvimento inicial de mudas da bananeira 'prata-anã' (AAB), provenientes de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.150-154, 2004.

SATHYANARAYANA, B. N.; VARGHESE, D. B. **Plant tissue culture**: practices and new experimental protocols. New Delhi: International Publishing House Pvt Ltd, 2007. 292 p.

SCARANARI, C. **Aclimação de mudas micropropagadas de bananeira (Musa spp.) cv. Grande Naine**. 2006. Doutorado (Programa de pós-graduação em Engenharia agrícola). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP - Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas-SP, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FRANÇA, R. B. de; DANTAS, A. C. de M.; FORTES, G. R. L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.86-89, 2005.

SILVA, J. de O. C.; LACERDA, G. A.; CASTRO, E. M. de; CHALFUN-JUNIOR, A.; PAIVA, L. V.; OLIVEIRA, C. de. Aplicação de ácido giberélico (AG3) e anatomia da epiderme foliar visando à detecção de variantes somaclonais de bananeira Musa sp. Colla cv. Prata-anã (Musaceae). **Acta Botânica Brasilica**, Brasília, v. 24, n.1, p. 47-52, 2010.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de propagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, set. 2007.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais – produção de mudas em larga escala. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, V. 4, n. 24, p. 36-41, 2002.

VASCONCELOS, A. G. V. de; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: Uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p.837-844, 2012.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.5-69, 1991.

### CAPÍTULO III

---

## COMPORTAMENTO EM CAMPO E CONTEÚDO DE DNA EM PLANTAS DE BANANEIRA PRODUZIDAS EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

### RESUMO

O aumento no uso de mudas micropropagadas na bananicultura tem despertado a necessidade de se otimizar o processo de produção por meio das técnicas da cultura de tecidos. Atualmente, os biorreatores têm contribuído fortemente com o aumento na produção de mudas de banana. Entretanto, os trabalhos relacionados às mudas produzidas por este sistema são restritos apenas ao laboratório, geralmente excluindo-se a parte de campo. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar em campo o comportamento de mudas de bananeiras micropropagas por meio de Biorreator de Imersão Temporária (BIT), bem como identificar possíveis instabilidades genômicas deste material por citometria de fluxo. O trabalho foi conduzido no campo experimental da Embrapa Acre, em Rio Branco - Acre e no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, em Brasília – DF. Utilizaram-se mudas das variedades 'Maravilha', 'Japira', 'Preciosa', 'Pacovan Ken', 'Thap Maeo' multiplicadas em dois sistemas de cultivo: Biorreatores de Imersão Temporária e em sistema de Propagação Convencional. Após estabelecidas em campo, as variáveis analisadas foram: altura (m), diâmetro do pseudocaule (cm), número de folhas vivas durante a floração e colheita, número de dias da floração a colheita, massa do cacho e do fruto (g), número de pencas por cacho e número total de frutos durante dois ciclos de produção. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições e seis plantas por parcela, no esquema de faixas. Para análise de citometria de fluxo foram coletadas dez mudas do tipo chifrinho de cada genótipo em estudo de ambos os sistemas de produção. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade. De modo geral as mudas produzidas em BIT apresentaram comportamento semelhante quando comparadas àquelas produzidas em sistema convencional de cultivo para todas as variáveis analisadas, independentemente do ciclo de produção e do genótipo avaliado. Quanto aos

dados da análise de citometria de fluxo não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de DNA entre os sistemas de cultivo utilizados para nenhuma das variedades estudadas. Conclui-se portanto, que o sistema de produção de mudas por BIT pode ser uma alternativa para propagação massal de mudas de bananeira.

**Palavras-Chave:** *Musa* spp., Micropropagação, Biorreator de Imersão Temporária, Produção em Campo, Citometria de fluxo.

## CHAPTER III

---

### FIELD BEHAVIOR AND DNA CONTENT IN BANANA PLANTS PRODUCED IN TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR

#### ABSTRACT

The increase in the use of micropropagated plantlets in the banana cultivation has aroused the need to optimize the production process through tissue culture techniques. Actually, plant bioreactors have strongly contributed with the increase on production of banana plantlets. However, the related works to produced plantlets by this system are restricted only to the laboratory, usually excluding field performance. The objective of this study is to evaluate the field behavior of banana plantlets produced through Temporary Immersion Bioreactor (TIB), and to identify possible genomic instabilities of this material by flow cytometry. The study was conducted on the Experimental field of Embrapa Acre, Rio Branco, Acre, and in the Tissue Culture Laboratory II of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia, Distrito Federal. Plantlets of the varieties 'Maravilha', 'Japira', 'Preciosa', 'Pacovan Ken', 'Thap Maeo' were used for *in vitro* multiplication studies in two culture systems: TIB and in semi-solid conventional micropropagation system (SS). Then, after *in vitro* multiplication and established in the field, the follow plants characteristics were analyzed: height (m), pseudostem diameter (cm), number of live leaves during the flowering and harvest, number of days from flowering to harvest, bunch and fruit fresh mass (g), number of hands per bunch and total number of fruits during two production cycles. The experiment was conducted using a randomized block design, with strip plots and four replications with six plants by plot. . For the flow cytometry analysis it was ten sword suckers of each genotype produced in both propagation systems. It was observed that plantlets produced in TIB presented similar behavior when compared to those produced in SS system for all analyzed variables, independently of the production cycle and genotype. As to flow cytometry analysis none significant differences were observed in the DNA content of the plants. Therefore It was concluded that plantlets production through TIB can be an alternative for mass propagation of banana plantlets.

**Keywords:** *Musa* spp., Micropropagation, Bioreactor of Temporary Immersion, field production, Flow Cytometry.

## 1 INTRODUÇÃO

A baixa taxa de propagação de bananeiras em campo tem demandado um grande interesse para o desenvolvimento de pesquisas visando obter métodos de propagação vegetativa mais rápidos e eficientes (SCARPARE FILHO et al., 1998; AL-AMIN et al., 2009). Dentre esses métodos, destacam-se o fracionamento do rizoma, a multiplicação rápida *in vivo* e a micropropagação ou propagação *in vitro* (SOUZA et al., 2000; ALVES et al., 2004). Embora os dois primeiros métodos apresentem bom rendimento quando comparado ao sistema convencional, não são totalmente eficientes no que se refere à sanidade e uniformidade das mudas obtidas (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

Assim, a utilização de mudas micropropagadas na bananicultura tem se tornado uma prática cada vez mais presente nos sistemas de produção, devido aos fatores de qualidade fisiológica, genética e fitossanitária dos materiais propagados, além da possibilidade de rápida multiplicação e uniformidade da lavoura (NOMURA et al., 2008).

Nesse sentido, várias estratégias na cultura de tecidos têm sido utilizadas visando acelerar ainda mais a propagação de mudas de banana e outras espécies. Atualmente, tem-se aumentado o uso dos chamados biorreatores. Tais equipamentos, em especial os de imersão temporária (BIT), têm se tornado a grande promessa para atender a demanda por mudas de qualidade, com economia de tempo, mão-de-obra e custos com meio de cultura, já que usa meios de consistência líquida (TEIXEIRA, 2002; DEBIASI, 2011; CABRAL, 2011; RODRIGUES, 2011; BARROS, 2011). No que se refere à bananeira, os biorreatores de imersão temporária têm apresentado importantes resultados, especialmente aqueles relacionados com as etapas de alongamento e enraizamento das mudas durante o cultivo (LEMOS et al., 2001; TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA; CID, 2010).

Neste sistema, espera-se que as plantas micropropagadas possam constituir réplicas exatas da planta mãe, pois a multiplicação celular *in vitro* e sua regeneração em plantas completas é um processo assexual, envolvendo somente divisões mitóticas que, teoricamente, não causam nenhuma variação genética nas plantas (BAIRU et al., 2010).

Embora comprovada a eficiência da cultura de tecidos no que se refere à produção massal de plantas *in vitro*, tal técnica pode apresentar limitações na qualidade genética do material produzido, em razão do tipo de método utilizado. Assim, não são raros os trabalhos que mostram algum tipo de variação genética em diferentes espécies de plantas durante o processo de cultivo *in vitro* (SANTOS et al., 2004; REZENDE et al., 2008; SANTANA et al., 2008; LIMA et al., 2008). Esse fenômeno é normalmente chamado de variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981), o qual é caracterizado por ser uma variação fenotípica de origem genética, que pode se tornar herdável, ou epigenética, que pode originar uma variação transitória, devido ao estresse fisiológico que o material sofre, quando submetido ao cultivo *in vitro* (ILLG, 1990). Ambas origens caracterizam as variações existentes entre somaclones (soma = vegetativo; clone = cópia idêntica) (GUIMARÃES et al., 2009).

Algumas estratégias podem ser usadas para detecção da variação somaclonal durante o cultivo, tais como o uso de marcadores moleculares ou então uso de técnicas citogenéticas. Os marcadores moleculares, como *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Simple Sequence Repeat* (SSR), têm sido usados com sucesso nas últimas décadas para vários tipos de estudos genéticos. No entanto, apesar do grande progresso, sistemas moleculares são bem desenvolvidos para espécies de plantas diploides, em que o fundamento teórico para a análise e interpretação dos resultados já está bem estabelecido. No entanto, essas ferramentas são menos desenvolvidas para espécies de ploidia mais complexa, como a própria bananeira (SAHIJRAM et al., 2003). Por outro lado, a investigação citogenética da bananeira utilizando técnicas microscópicas é muitas vezes difícil e complexa, devido ao número e tamanho pequeno de seus cromossomos (GUIMARÃES et al., 2009).

Estes inconvenientes podem ser contornados utilizando citometria de fluxo, desde que seja suficientemente sensível para detectar as diferenças no conteúdo de DNA causada pela presença ou ausência de um único cromossomo. Neste sentido, a técnica de citometria de fluxo tem ganhado atenção especial, uma vez que permite estimar a quantidade relativa de DNA nuclear de células vegetais de forma rápida e com alta precisão, além de poder indicar possíveis alterações genéticas no material multiplicado (JIN et al., 2008; MSOGOYA et al., 2011). Para a bananeira, até a presente data, ainda são relativamente poucos

os trabalhos que relatam o uso citometria de fluxo em plantas regeneradas *in vitro* sendo que trabalhos neste sentido com outras espécies já foram realizados onde a citometria foi utilizada para avaliação da estabilidade genômica de *Pennisetum* sp. (CAMPUS et al., 2009). Além disso, em se tratando da bananeira, até o momento, não há relatos, sobre análises de plantas adultas sob condições de produção em campo, após passarem por sistemas de micropropagação em Biorreatores de Imersão Temporária.

Já quanto a propagação e o comportamento, no Brasil, existem algumas publicações sobre a produção *in vitro* da bananeira (COSTA, 2007; OLIVEIRA; SHERWINSKI-PEREIRA, 2011; OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2008 e 2008a), mas são raros os dados sobre o comportamento das mudas micropropagadas em campo, especialmente quanto a características de crescimento e produção.

Autores como Teixeira e Bertiol Neto (2011) avançaram em seus estudos avaliando o comportamento agrônomo de plantas de bananeira produzidas por meio de três sistemas: Convencional, micropropagadas em meio semi-sólido e micropropagadas em meio líquido estacionário, entretanto biorreatores não foram empregados em seus estudos. Estes mesmos autores relatam que plantas micropropagadas tanto em meio semi-sólido quanto em meio líquido apresentaram comportamento superior no que se refere ao seu crescimento e desenvolvimento vigoroso e precocidade para emissão do cacho em relação às mudas convencionais.

Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar em campo o comportamento agrônomo e a produção de mudas de bananeira micropropagadas em de Biorreator de Imersão Temporária (BIT), bem como identificar possíveis instabilidades genômicas deste material por meio da análise de citometria de fluxo.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Campo Experimental da Embrapa Acre, em Rio Branco, AC. O Município está a 9°58'22"S, 67°48'40"W e altitude de 160 m. O solo da área experimental foi classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico abrupto típico. O clima é do tipo AWI (quente e úmido), conforme a classificação de Köppen, com temperatura média de 25,8°C, precipitação anual de 1.648,94 mm e umidade relativa de 83% (AGRITEMPO, 2013).

### 2.1 Obtenção do material vegetal

Para este estudo foram utilizadas mudas das variedades 'Maravilha', 'Japira', 'Preciosa', 'Pacovan Ken' e 'Thap Maeo', obtidas de dois diferentes sistemas de cultivo: Biorreatores de Imersão Temporária e sistema de Propagação Convencional.

#### 2.1.1 Mudanças obtidas em Biorreatores de Imersão Temporária - BIT

As plantas de bananeira foram produzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF.

Para a multiplicação do material foram utilizados Biorreatores de Imersão Temporária – BIT, modelo desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (TEIXEIRA, 2002).

Para tanto, as plantas foram mantidas, sem subdivisão, durante seis subcultivos, em frascos plásticos de 5.000 mL de capacidade, contendo 400 mL de meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 2,5 mg/L<sup>-1</sup> de N<sup>6</sup>-Benzilaminopurina (BAP) e de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose apresentando consistência líquida. O sistema de imersão era acionado por meio de um Timer® e os explantes imersos no meio a cada 6 horas por período de 3 minutos. Para cada subcultivo foi considerado um período de 30 dias, quando então o meio de cultura era substituído e adicionado ao sistema.

Ao final de seis subcultivos, as plantas formadas foram mantidas no biorreator para seu enraizamento e alongamento. Para tanto, uma nova formulação do meio de cultura de MS, idêntico ao de multiplicação, mas desprovido do regulador de crescimento BAP foi adicionado.

Após aproximadamente 30 dias em meio de enraizamento e alongamento, as plantas foram aclimatizadas em condições de casa de vegetação, onde foram mantidas em tubetes plásticos (180 mm<sup>3</sup>) preenchidos com substrato comercial Plantmax®, sendo irrigadas manualmente e diariamente durante 120 dias.

Decorrido o período de aclimatização, as plantas foram retiradas do substrato, identificadas e acondicionadas em recipiente de isopor sendo em seguida enviadas para Embrapa Acre para plantio em campo.

### 2.1.2 Mudanças obtidas por sistema de propagação convencional

Com o auxílio de uma pá reta, foram coletadas mudas do tipo chifre das variedades em estudo. As mudas foram cuidadosamente desprendidas da base da planta matriz mantendo a integridade do seu rizoma e parte aérea. Posteriormente foram transportadas para Embrapa Acre onde foram transferidas para campo. Para a uniformização do plantio, as plantas de ambos os sistemas de cultivo foram cortadas deixando-se aproximadamente, 30 cm de pseudocaule para rebrota.

## 2.2 Condução do experimento em Campo

O plantio das mudas em campo foi conduzido em espaçamento de 3,0 x 3,0 m, sem irrigação e com os tratos culturais recomendados para a cultura da bananeira conforme Silva et al., (2011). As adubações foram feitas com base na análise de solo (BORGES et al., 1999). Como bordadura foram utilizadas as mudas excedentes de todas as variedades trabalhadas.

As características agrônômicas foram avaliadas por 2 ciclos consecutivos de produção, onde foram consideradas: precocidade de produção (plantio à colheita, em dias), altura de plantas (m), diâmetro do pseudocaule (cm), número de folhas vivas na floração e na colheita, ciclo de formação do cacho (floração à colheita, em dias), número de pencas por cacho e total de frutos, massa do fruto (g) e do cacho (kg).

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições e seis plantas por parcela, em esquema de faixas. Os tratamentos constaram de cinco genótipos de bananeira dentro das parcelas, e

nas faixas constaram os sistemas de cultivo BIT e Convencional.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias foram submetidas ao teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

### 2.3 Análise da estabilidade genômica por meio da Citometria de Fluxo

Para avaliar possíveis alterações das plantas em razão do tipo de sistema de cultivo, análises de citometria de fluxo das plantas foram realizadas.

#### 2.3.1 Coleta do material

Foram coletadas dez mudas de bananeira do tipo chifrinho de cada uma das cinco variedades em estudo, de ambos os métodos de propagação: o convencional e em Biorretores de Imersão Temporária. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificadas e mantidas em embalagem com isolamento térmico na presença de gelo até o momento das análises.

As amostras coletadas foram enviadas e avaliadas no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genético e Biotecnológico, em Brasília – DF.

#### 2.3.2 Determinação do conteúdo de DNA nuclear

Para a determinação do conteúdo relativo de DNA nuclear, aproximadamente 70 mg de tecido foliar aclorofilado de plantas de bananeira foram triturados em placa de Petri, contendo 1,0 mL do tampão de extração Galbraith (0,0427 g.100mL<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 0,0265 g.100mL<sup>-1</sup> de Citrato de sódio, 2,0925 g.100mL<sup>-1</sup> MOPS, 0,05g.mL<sup>-1</sup> de Triton, pH 7,0, filtragem em millipore de até 45 µm) resfriado para liberação do núcleo (DOLEZEL et al., 1989). A suspensão de núcleos foi aspirada com auxílio de uma pipeta Pasteur e filtrada através de uma malha de 50 µm para um microtubo com 2,0 mL de capacidade. Posteriormente, as amostras foram coradas com 25 µL de uma solução de 1,0 mg/mL de Iodeto de Propídeo e armazenadas no escuro por aproximadamente cinco minutos. Todo o processo, até então descrito, foi realizado sobre um recipiente contendo gelo triturado.

Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se escala logarítmica. A análise foi realizada em citômetro Accuri C6 (Becton Dickinson) e os histogramas obtidos analisados pelo software *BD Accuri Cflow Plus*.

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) da amostra pelo pico G1 do padrão de referência (*Pisum sativum*), multiplicando-se pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg). A avaliação da estabilidade genômica dos materiais foi determinada em pelo menos 10 repetições de cada variedade e duas leituras por tubo, sendo cada amostra representada por uma planta, selecionada ao acaso.

As médias de intensidade de fluorescência foram comparadas pelo teste de Tuckey, ao nível de 5% de probabilidade através do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Comportamento agrônômico de mudas produzidas em BIT**

Não se observou diferenças significativas entre os sistemas de cultivo e os genótipos, em nenhum dos dois ciclos de avaliação (Tabela 1). A média de dias para o primeiro ciclo de produção foi de 496,0, 456,7, 503,8, 456,4, 464,3 para as variedades 'Maravilha', 'Preciosa', 'Japira', 'Thap Maeo' e 'Pacovan Ken', respectivamente (Tabela 1). Leonel et al. (2004) também observaram médias superiores a 400 dias para o primeiro ciclo de produção quando avaliaram o comportamento de mudas micropopagadas das variedades 'Maça', 'Prata-anã' e 'Nanicão' em campo.

Já no segundo ciclo de produção as variedades apresentaram uma média geral de 743,4 dias (Tabela 1). O início da formação do cacho, independentemente da variedade, foi de aproximadamente 350 dias para plantas produzidas em ambos os sistemas de cultivo (Tabela 1) e a velocidade de maturação do cacho foi de 127,8 dias para plantas produzidas em BIT e 124,1 dias para àquelas produzidas em sistema convencional.

Para a variável altura de plantas foi observado diferença estatística entre os sistemas de cultivo apenas no primeiro ciclo e para as variedades 'Maravilha' e 'Japira'. A variedade 'Maravilha' apresentou média de 2,3 e 3,0 m para os sistemas BIT e Convencional, respectivamente. E enquanto que para 'Japira' o comportamento foi inverso, ou seja, o tratamento BIT foi o que proporcionou maior altura (3,3 m) em relação ao convencional (2,8 m).

Apesar deste comportamento, quando as médias dos sistemas de cultivo foram analisadas individualmente dentro de cada ciclo de produção, observou-se um aumento gradativo em altura, do primeiro para o segundo ciclo, independentemente da variedade estudada. Este resultado corrobora com Silva et al. (2002) e com os obtidos por Oliveira et al. (2008b), onde estes autores afirmam haver um aumento na altura das plantas do primeiro para o segundo ciclo de produção em bananeiras.

Em relação ao diâmetro do pseudocaule não houve interação significativa sendo que, independentemente da variedade e do ciclo de produção, os valores médios do diâmetro variaram entre 20,8 a 21,8 cm no BIT e de 20,0 a 22,9 cm para sistema Convencional. Quando as médias de cada ciclo de produção das variedades foram analisadas individualmente, observou-se aumento do diâmetro do primeiro para o segundo ciclo de produção para as plantas obtidas em ambos os sistemas de cultivo. De acordo com Silva et al. (2003), esta característica está relacionada com o vigor da planta, além de refletir a capacidade de sustentação do cacho e a não suscetibilidade à tombamentos.

Quanto ao número de folhas vivas, tanto na floração quanto na colheita, também não foi observada interação significativa para estas variáveis, embora o maior número de folhas vivas na floração tenha sido observado no primeiro ciclo para as variedades 'Maravilha' (11,0) e 'Japira' (10,3), quando obtidas em BIT e 'Thap Maeo' (10,6) quando obtidas em sistema convencional (Tabela 1).

As variedades 'Preciosa' e 'Pacovan Ken' apresentaram aumento do número de folhas vivas na floração do primeiro para o segundo ciclo, passando de 7,3 para 8,9 folhas/planta e 7,5 para 7,9 folhas/planta, respectivamente, quando obtidas em BIT. Comportamento semelhante foi observado em sistema convencional para 'Maravilha' com valores de 8,8 para 9,0 folhas/planta, 'Japira' de 8,1 para 8,5 folhas/planta, e a 'Pacovan Ken' de 7,8 para 8,5 folhas/planta (Tabela 1).

Durante a colheita, a variedade 'Maravilha' não apresentou folhas vivas no sistema convencional de cultivo em nenhum ciclo de produção avaliado (Tabela 2). Apesar de esta ser uma variedade que apresenta maior resistência/tolerância ao fungo causador da Sigatoka-negra, observou-se em campo plantas apresentando sintomas da doença, fato não observado em plantas produzidas em BIT, as quais foram capazes de tolerar a ocorrência da doença em campo, apresentando, durante a colheita, maior número médio de folhas vivas 4,2 folhas/planta quando comparadas com as demais variedades produzidas em BIT.

Segundo Teixeira e Bettioli Neto (2011), o ritmo de emissão de folhas reflete o vigor das plantas e é importante para a produção de fotossintetizados. Além do número de folhas vivas representar resistência das plantas a doenças, Oliveira et al. (2008b) avaliaram o comportamento agrônomo de mudas de bananeira durante três ciclos de produção e relataram estreita relação entre o número de folhas e a produtividade das mudas. Leonel et al. (2004) também evidenciaram em seus estudos correlações positivas entre o número de folhas vivas, altura e diâmetro do pseudocaule com a massa fresca do cacho e número de pencas e frutos.

**TABELA 1** Análise conjunta do efeito da interação entre dois ciclos vegetativos e os diferentes sistemas de obtenção de mudas para cada variedade de bananeira estudada em condições de campo

CICLOS	Número de dias do plantio à colheita			Número de dias do plantio à emissão do cacho		Altura da planta (m)		Diâmetro do pseudocaule (cm)			Número de folhas vivas na floração		
	*BIT	CON	Média	BIT	CON	BIT	CON	BIT	CON	Média	BIT	CON	Média
<b>'MARAVILHA'</b>													
1º C	484,4A	519,2A	501,8b	342,8bA	382,6bA	2,3bB	3,0aA	19,0	18,6	18,8b	11,0	8,8	9,9a
2º C	777,6A	802,0A	789,8a	635,4aA	698,0aA	2,8aA	3,2aA	24,6	22,8	23,7a	9,6	9,0	9,3a
<b>Média</b>	631,0A	660,6A	-	489,1A	540,3A	2,5B	3,1A	21,8A	20,7A	-	10,3A	8,9A	-
<b>'PRECIOSA'</b>													
1º C	436,2B	477,2A	456,7b	324,6bA	351,5bA	2,8bA	3,1bA	16,8	17,6	17,2b	7,3	9,7	8,5a
2º C	711,7A	724,9A	718,3a	583,8aA	592,3aA	4,3aA	4,4aA	24,8	24,8	24,8a	8,9	8,5	8,7a
<b>Média</b>	573,9A	601,0A	-	454,2A	471,9A	3,5A	3,7A	20,8A	21,2A	-	8,1A	9,1A	-
<b>'JAPIRA'</b>													
1º C	520,1A	487,5A	503,8b	383,1bA	363,9bA	3,3bA	2,8bB	18,6	18,7	18,6b	10,3	8,1	9,2a
2º C	769,1A	720,4A	744,7a	614,4aA	586,1aA	4,1aA	4,2aA	22,9	25,6	24,2a	9,0	8,5	8,7a
<b>Média</b>	644,6A	603,9A	-	498,7A	475,0A	3,7A	3,5A	20,7A	22,1A	-	9,7A	8,3B	-
<b>'THAP MAEO'</b>													
1º C	486,4A	426,3B	456,3b	366,5bA	314,1bA	2,8bA	2,7bA	18,2	18,2	18,2b	10,2	10,6	10,4a
2º C	748,3A	646,0A	697,1a	629,0aA	501,0aB	3,6aA	4,2aA	24,7	27,7	26,2a	8,5	9,0	8,7b
<b>Média</b>	617,35A	536,1B	-	497,7A	407,5B	3,2A	3,4A	21,4A	22,9A	-	9,5A	10,3A	-
<b>'PACOVAN KEN'</b>													
1º C	465,3A	463,2A	464,2b	335,0bA	338,7bA	3,2bA	3,3bA	18,5	19,2	18,8b	7,5	8,1	7,8a
2º C	766,3A	740,4A	753,3a	644,3aA	601,2aA	4,7aA	4,4aA	26,1	26,5	26,3a	7,9	8,8	8,3a
<b>Média</b>	615,8A	601,8A	-	489,6A	469,9A	3,9A	3,8A	22,3A	22,8A	-	7,7A	8,5A	-
<b>CV1 (%)</b>	17,1			20,6		15,0		15,3			13,5		
<b>CV2 (%)</b>	6,4			9,1		7,6		7,7			11,4		

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, dentro de cada variedade, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.  
\*BIT = Biorreator de Imersão Temporária; CON = Convencional. 1º C = primeiro ciclo; 2º C = segundo ciclo.

Quanto ao ciclo de formação do cacho (número de dias entre a emissão e colheita), observaram-se para todas as variedades, médias de 126,4 dias para o primeiro ciclo e 133,7 dias para o segundo ciclo de produção (Tabela 2). Oliveira et al. (2008b), relataram comportamento semelhante para plantas de bananeira prata que apresentaram um ciclo de formação de 120 dias em média, mantendo o comportamento durante três ciclos de produção, quando trabalharam nas mesmas condições climáticas descritas neste estudo. Segundo Moreira (1999) e Donato (2003), o ciclo do cacho, da floração à colheita, é dependente das condições climáticas da região como temperatura, umidade e precipitação para o bom desenvolvimento da planta.

O menor ciclo para formação do cacho pode estar relacionado à precocidade do material e, embora muitos autores afirmem que mudas micropropagadas possam apresentar precocidade em relação às mudas produzidas por sistemas convencionais de propagação (DREW; SMITH, 1990; TEIXEIRA; BERTIOL NETO, 2011), neste estudo, quando se utilizou Biorretor de Imersão Temporária tal comportamento não foi observado. Este resultado está de acordo com os obtidos por Souza et al. (2000) que também observaram comportamento semelhante entre mudas micropropagadas e convencionais quanto a precocidade. Entretanto, este comportamento pode ser explicado pelo fato de as mudas terem sido podadas antes do plantio para manter a mesma relação de altura entre elas.

Teixeira e Bertiol Neto (2011), quando trabalharam com mudas convencionais e micropropagadas da cultivar 'Prata-Anã' em meio de cultura semi-sólido e líquido, confirmaram comportamento precoce das mudas micropropagadas. Estes autores justificaram que tal resultado pudesse estar relacionado com a limitada atividade fisiológica que as mudas convencionais apresentaram logo após o plantio. Segundo eles, isto ocorre devido ao fato do sistema radicular deste tipo de muda, geralmente, ser danificado durante o plantio, ao passo que as mudas micropropagadas são plantadas em campo com seu sistema radicular relativamente preservado, o que possibilita a estas, manter seu ritmo fisiológico em maior atividade.

Corroborando com estes autores, pode-se dizer que a poda realizada nas mudas antes do plantio pode ter acarretado na redução na velocidade do ritmo fisiológico de ambos os tipos de mudas. Ao passo que as plantas micropropagadas, além da energia concentrada para regeneração de sua parte aérea, também



precisou passar por um processo de adaptação as condições de campo, tal qual as mudas convencionais que, embora já adaptadas as condições de campo, também tiveram que regenerar sua parte aérea e reestabelecer seu sistema radicular. Esse fato, possivelmente, deixou ambos os tipos de mudas em condições fisiológicas equivalentes para o início de seu desenvolvimento em campo.

A variável massa do cacho não diferiu estatisticamente dentro de cada sistema de cultivo, durante nenhum ciclo de produção. Embora tenha ocorrido diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo durante o primeiro ciclo na variedade 'Thap Maeo', onde foi observado os maiores valores no sistema convencional, com média de 18,7 kg, e a mesma tendência no segundo ciclo, com peso médio em torno de 23,1 kg (Tabela 2).

Outra variedade que também apresentou diferenças estatísticas para massa fresca do cacho foi a 'Maravilha', onde maiores valores foram observados quando esta foi cultivada em BIT com médias de 14,5 kg para o primeiro ciclo e de 19,4 kg para segundo ciclo. Entretanto, para esta mesma variedade foi observado, no tratamento convencional, o menor valor médio para esta variável em torno de 6,6 kg (Tabela 2). Esse fato, coincide com os menores valores médios para número de folhas vivas na colheita, o que não permitiu a formação completa do cacho, e implicou na produção de frutos sem padrão comercial.

Embora a variedade 'Maravilha' esteja entre os cinco genótipos considerados tolerantes à sigatoka–negra, o que pode ser inferido a partir destes resultados é que o período de maior incidência e contato desta cultura com o agente causal da doença pode trazer prejuízos fitossanitários no plantio, sendo então recomendado que mudas com certificação de qualidade sejam utilizadas.

Quanto ao número de pencas por cacho, observou-se diferença significativa entre os sistemas de cultivo e os ciclos de produção, apenas para as variedades 'Thap Maeo' e 'Pacovan Ken', onde foi observado aumento do número de pencas do primeiro para o segundo ciclo para ambas as variedades. Produzidas em sistema BIT a 'Thap Maeo' passou de 8,6 para 16,3 pencas por cacho, enquanto que a 'Pacovan ken' passou de 5,1 para 7,5. Já no sistema convencional, o mesmo comportamento só foi observado na variedade 'Thap Maeo' onde o número de pencas passou de 10,4 no primeiro ciclo para 15,0 no segundo. Flores (2000), Silva et al. (2006) e Lessa (2007) ressaltam o caráter número de pencas como de grande

interesse para o produtor e fundamental para o melhoramento genético da bananeira, uma vez que a penca constitui-se na unidade comercial.

Para o número de frutos também foi observada interação significativa entre os sistemas e os ciclos de produção para as variedades 'Thap Maeo' e 'Pacovan Ken'. Assim, houve aumento do número de frutos do primeiro para o segundo ciclo no sistema BIT, que passaram de 127,4 para 249,7 frutos para a 'Thap Maeo' e 60,7 para 106,2 para a 'Pacovan Ken'. Já no sistema convencional, apenas a 'Thap Maeo' apresentou a mesma tendência de aumento (145,4 no primeiro ciclo para 262,0 frutos no segundo) (Tabela 2). Devido ao aumento do número de pencas observado para as mesmas variedades nas mesmas condições de tratamentos, esse comportamento do aumento do número de frutos já era esperado.

Quando avaliou-se a massa média dos frutos, não observou-se interação significativa entre os sistemas e os ciclos de produção para nenhuma das variedades analisadas. Entretanto, os maiores valores médios para esta variável foi obtido para 'Maravilha' e 'Preciosa', quando cultivadas em BIT apresentando, respectivamente, valores médios de 146,6 e 145,2 g por fruto (Tabela 2).

Para a maioria das variedades estudadas, plantas produzidas pelo sistema convencional houve uma tendência de redução da massa do fruto do primeiro para o segundo ciclo. Isso possivelmente se deve ao fato de as mudas convencionais terem apresentado maior suscetibilidade ao avanço de doenças que atingiu a cultura e ao ataque de broca, observado durante a condução do experimento, uma vez que, estas já podem ter vindo infectadas durante sua transferência de uma área, supostamente afetada, para outra.

A maioria das variedades independentemente do sistema de produção de mudas, apresentou uma massa superior a 100 g para seus frutos, tanto no primeiro quanto no segundo ciclo. Oliveira et al. (2008b) também observaram valores semelhantes para a maioria das variedades avaliadas, nas mesmas condições, as quais foram submetidos os materiais estudados neste trabalho.

É importante ressaltar que as mudas oriundas do sistema de propagação convencional utilizadas neste estudo tiveram origem de material já adaptado as condições climáticas da região. Já as mudas oriundas de BIT passaram por processo de aclimatização em viveiro, em condições climáticas de uma região diferente daquela onde foi levada a campo. Pode-se dizer que esse material passou então por dois processos de adaptação: o primeiro quando foi retirando do ambiente

*in vitro* para o *ex vitro*, e o segundo quando foi levada para plantio em uma região com condições climáticas distintas daquela onde foram aclimatizadas. Com isso, pode-se constatar a resistência e plasticidade do material produzido em BIT, já que durante todo o período de condução do experimento este material não apresentou comportamento inferior para nenhuma das variáveis analisadas, mesmo quanto ao aspecto visual (Figura 1 A, D e E).

**TABELA 2** Análise conjunta do efeito da interação entre os ciclos e os tratamentos para cada variedade estudada, da emissão do cacho a colheita

CICLOS	Número de dias da emissão do cacho a colheita			Número de folhas vivas na colheita			Massa do cacho (kg)	Número de pencas por cacho		Número de frutos/Cacho		Massa média do fruto (g)				
	*BIT	COM	Média	BIT	CON	Média	BIT	CON	BIT	CON	BIT	CON	BIT	CON	Média	
<b>'MARAVILHA'</b>																
1º C	141,6	136,5	139,0a	4,0	0,0	2,0a	14,5aA	7,4aB	7,2aA	5,6aA	91,6aA	60,9aA	142,0	102,9	122,45a	
2º C	142,2	104,0	123,1a	4,4	0,0	2,2a	19,4aA	4,9aB	8,2aA	4,0aA	110,2aA	40,0aB	151,1	97,7	124,4a	
<b>Média</b>	141,9A	120,25 A	-	4,2A	0,0B	-	16,9A	6,1B	7,7A	4,8B	100,9A	50,4B	146,5A	100,3A	-	
<b>'PRECIOSA'</b>																
1º C	111,6	124,0	117,8a	1,1	1,0	1,1a	12,1aA	11,0aA	5,2aA	6,0aA	57,6aA	68,9aA	184,1	127,5	155,8a	
2º C	127,8	132,6	130,2a	1,2	2,9	2,0a	9,2aA	12,0aA	6,1aA	6,9aA	74,1aA	87,5aA	106,3	129,0	117,6a	
<b>Média</b>	119,7A	128,3A	-	1,1A	1,9A	-	10,6A	11,5A	5,6A	6,4A	65,8A	78,2A	145,2A	128,2A	-	
<b>'JAPIRA'</b>																
1º C	137,0	123,5	130,2a	1,4	1,2	1,3a	8,7aA	8,6aA	6,1aA	6,2aA	68,4aA	69,7aA	112,0	106,5	109,2a	
2º C	154,7	134,2	144,5a	2,4	1,1	1,7a	10,7aA	10,1aA	6,5aA	7,1aA	86,0aA	93,8aA	114,4	95,0	104,7a	
<b>Média</b>	145,8A	128,8A	-	1,9A	1,1A	-	9,7A	9,3A	6,3A	6,6A	77,2A	81,7A	113,2A	100,7A	-	
<b>'THAP MAEO'</b>																
1º C	119,8	112,2	116,0a	3,2	4,2	3,7a	12,6aB	18,7aA	8,6bA	10,4bA	127,4bA	145,4bA	91,4	117,9	104,6a	
2º C	119,3	145,0	132,1a	2,5	5,0	3,7a	14,6aA	23,1aA	16,3aA	15,0aA	249,7aA	262,0aA	53,8	83,6	68,7a	
<b>Média</b>	119,5A	128,6A	-	2,8B	4,6A	-	13,6B	20,9A	12,4A	12,7A	188,5A	203,7A	72,6A	100,75A	-	
<b>'PACOVAN KEN'</b>																
1º C	130,2	124,5	127,3a	0,0	1,8	0,9a	7,9aA	10,5aA	5,1bA	5,8aA	60,7bA	66,5aA	112,5	141,4	126,9a	
2º C	122,0	139,2	130,6a	1,0	1,4	1,2a	11,6aA	10,8aA	7,5aA	7,1aA	106,2aA	96,2aA	97,0	105,0	101,0a	
<b>Média</b>	126,1A	131,8A	-	0,5B	1,6A	-	9,7A	10,6A	6,3A	6,4A	83,4A	81,3A	104,7A	123,2A	-	
<b>CV1 (%)</b>	22,5			43,2			33,5			6,0		6,98		29,2		
<b>CV1 (%)</b>	18,5			52,4			32,1			17,9		24,1		34,4		

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

\*BIT = Biorreator de Imersão Temporária; CON = Convencional. 1º C = primeiro ciclo; 2º C = segundo ciclo.

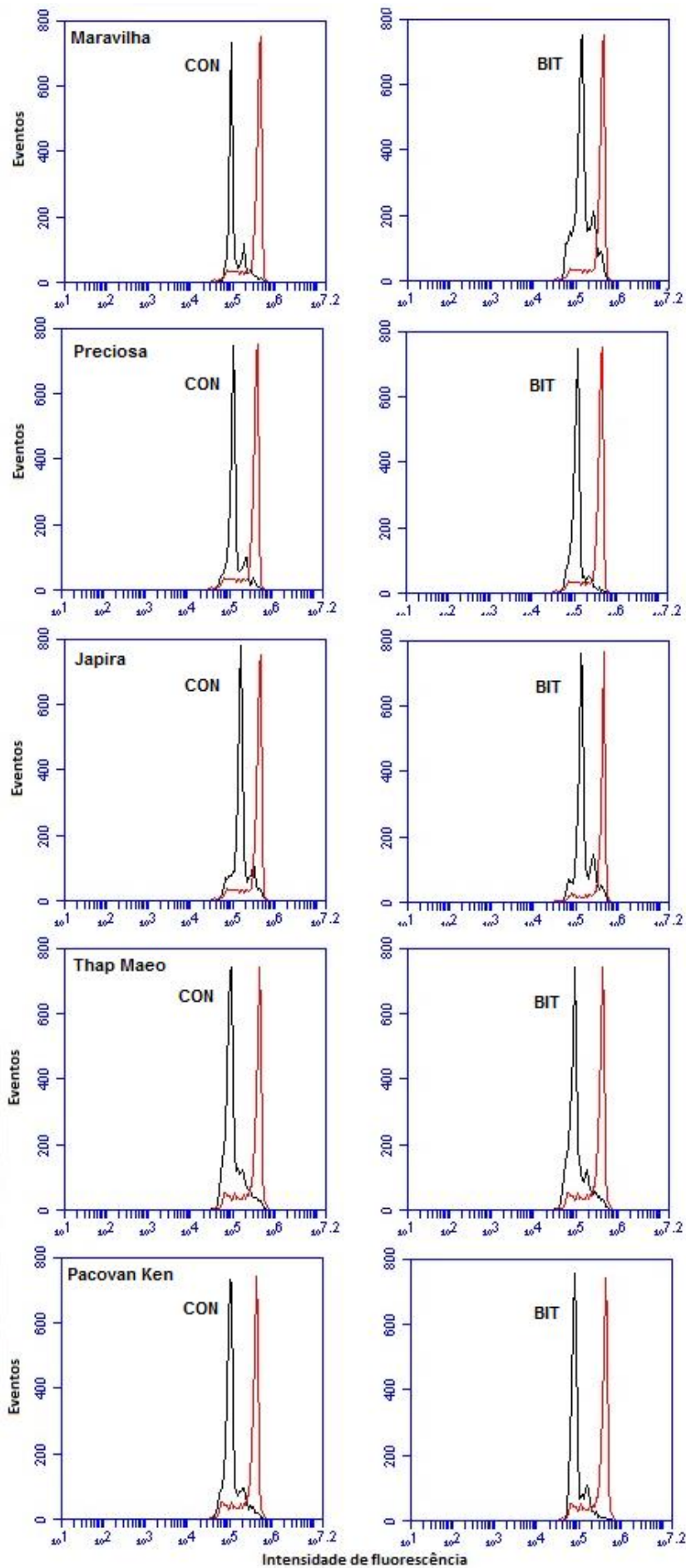


**FIGURA 1** Aspecto das plantas de bananeira durante avaliação em campo: A. Com um mês após o plantio; B e C Mudas de bananeira obtidas por meio de propagação convencional e BIT, respectivamente, com dois meses após o plantio; D. Aspecto do bananal aos 6 meses e, E. Após 8 meses; F. Planta produzida em BIT com aspecto vigoroso e apresentando início da produção e G. Planta de bananeira perdida por tombamento.

### 3.2 Análise da estabilidade genômica por Citometria de Fluxo

Quanto à análise da estabilidade genômica das amostras de bananeira coletadas, pode-se verificar que esta resultou em picos G1 de DNA afilados, o que indica alta confiabilidade dos resultados apresentados e coeficiente de variação (CV) inferior a 5%. Os valores do CV representam a confiabilidade na estimativa de DNA por meio da citometria de fluxo, e o valor obtido neste trabalho está de acordo com Dolezel e Bartos (2005), que indicam valores de CV de até 5% como sendo considerados aceitáveis em estudos de citometria de fluxo vegetal.

Histogramas representativos das cinco variedades de bananeiras produzidas em dois sistemas de cultivo (Convencional e Biorreator de Imersão Temporária) são apresentados na Figura 2.



**FIGURA 2:** Histogramas relativos à análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA de cinco variedades de bananeiras obtidos usando o tampão Galbraith. O primeiro pico de cada sistema (CON= Convencional e BIT= Biorreator de Imersão Temporária) corresponde ao ciclo G1 das amostras em estudo; o segundo pico corresponde ao padrão de Referência Ervilha (*Pisum sativum*).

De um modo geral, as cinco variedades estudadas não apresentaram variações na quantidade relativa de DNA nuclear durante o ciclo de produção no campo. Esse fato indica que o sistema de produção por meio de Biorreatores de Imersão Temporária não contribuíram para o aparecimento de variantes somaclonais nas plantas produzidas, mesmo após estas permanecerem por até 6 subcultivos neste sistema (Tabela 3).

As variedades apresentaram valores médios de DNA nuclear variando de 1,96 a 2,62 pg em sistema convencional e de 2,05 a 2,62 pg em BIT. Estes valores estão relativamente próximos aos valores atualmente disponíveis na literatura descrito por Msogoya et al. (2011), que observaram valores para o tamanho do genoma em torno de 1,81 pg em mudas micropropagadas e 1,82 pg para mudas convencionais.

Individualmente, independentemente do sistema de cultivo, a variedade ‘Thap Maeo’ foi a que apresentou uma menor quantidade de DNA nuclear em torno de 1,96 a 2,05 pg enquanto as demais variedades apresentaram valores superiores a 2,38 pg. Isso porque a Variedade ‘Thap Maeo’ é a única variedade triploide do grupo avaliado enquanto que todas as demais variedades são tetraploides. Jesus et al. (2013) usando a citometria para determinação da ploidia de aproximadamente 215 acessos de bananeiras, Também relataram valores semelhantes para o tamanho do genoma de bananas triploides como a com média em torno de 1,93 pg e para tetraploides médias em torno de 2,45 pg.

**TABELA 3** Conteúdo médio relativo de DNA (pg) de variedades de bananeiras ao longo do segundo ciclo de produção em campo

Variedades	Sistema de cultivo	Média do pico	Quantidade de DNA (pg)	CV (%)
<b>Maravilha</b>	Convencional	124,22	2,47 a	4,79
	Biorreator	132,44	2,62 a	4,66
<b>Preciosa</b>	Convencional	127,03	2,38 a	4,61
	Biorreator	128,72	2,43 a	4,50
<b>Japira</b>	Convencional	139,77	2,62 a	4,89
	Biorreator	140,33	2,63 a	4,74
<b>Thap Maeo</b>	Convencional	98,16	1,96 a	4,93
	Biorreator	102,62	2,05 a	4,62
<b>Pacovan</b>	Convencional	128,84	2,47 a	4,78
<b>Ken</b>	Biorreator	124,82	2,39 a	4,64

Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

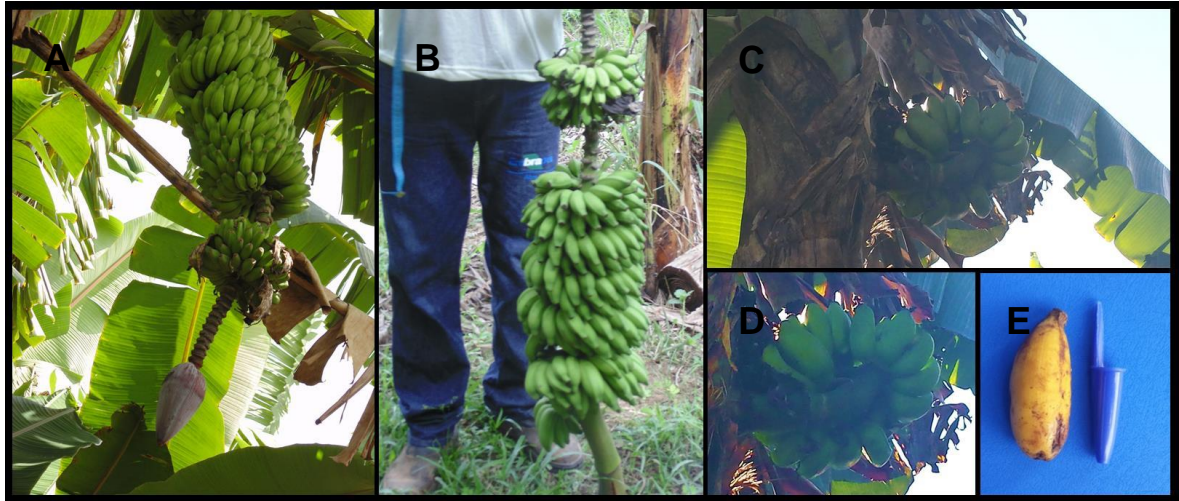
A análise de citometria de fluxo em banana tem sido utilizada como ferramenta auxiliar em estudos da variação somaclonal (MSOGOYA et al., 2011) e também para ajudar a determinar a qualidade do fruto a ser consumido, quando as plantas apresentam algum tipo de variação (MSOGOYA; GROUT, 2012).

Embora as detecções de variações morfológicas por meio de observações em campo possam ser utilizadas como parâmetro para distinção de plantas anormais a serem selecionadas para fins de estudos de variação somaclonal (MSOGOYA; GROUT, 2011), Loureiro et al. (2007) demonstraram que nem sempre variações morfológicas estão diretamente relacionadas com mudanças genéticas. Estes autores verificaram que plantas micropropagadas de *Juniperus phoenicea*, embora apresentassem morfotipos distintos, não diferiram na quantidade de DNA.

Neste estudo, um fenômeno interessante relacionado aos frutos pôde ser observado em alguns cachos que apresentaram floração fora do ápice da planta, bem como apresentaram tamanhos anormais, com frutos de aproximadamente 2 cm (Figura 3). Este fenômeno foi relatado apenas para algumas plantas da variedade 'Thap Maeo' e ao longo dos dois ciclos de avaliação sendo observado em ambos os sistemas de cultivo. Entretanto, não foram constatadas diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo quanto à quantidade de DNA nuclear obtido para estas plantas.

Assim, a análise de citometria apresentou resultados que corroboram com Loureiro et al. (2007), comprovando a estabilidade do material durante o seu segundo ciclo de produção. Oliveira et al. (2008b) indicam que a estabilidade do material se dá a partir do segundo ciclo de produção, sendo que, variáveis como número de folhas vivas na floração, ciclo de formação do cacho dentro outros aspectos apresentam estabilidade já no primeiro ciclo de produção, enquanto que altura, diâmetro do pseudocaule e produtividade, por exemplo, podem apresentar aumento do primeiro para o segundo ciclo, mantendo o mesmo comportamento no terceiro ciclo.





**FIGURA 3** Aspecto dos cachos da variedade 'Thap Maeo' ao longo do segundo ciclo de produção. A- Cacho associado a planta, ainda em desenvolvimento após aproximadamente 42 dias de sua emissão; B- Apresentando mesmo cacho ainda não totalmente desenvolvido colhido após 48 dias de sua emissão por tombamento da planta; C- Cacho com emissão deficiente apresentando-se em posicionamento e tamanho anormal; D- Cacho anormal em detalhe; E- Fruto maduro colhido de cacho com aspecto de desenvolvimento anormal.

## 4 CONCLUSÕES

- Em campo, plantas de bananeira das variedades 'Thap Maeo', 'Prata', 'Maravilha', 'Preciosa', 'Japira' e 'Pacovan Ken' produzidas em Biorreator de Imersão Temporária apresentam comportamento semelhante às obtidas por meio de propagação convencional;
- As plantas produzidas por meio de Biorreator de Imersão Temporária apresentam crescimento e desenvolvimento vigoroso;
- As plantas da maioria das variedades produzidas por sistema de Biorreator de Imersão Temporária apresentam maior número de frutos e cachos mais pesados do que as produzidas por sistema convencional;
- O número de dias do plantio a colheita, o diâmetro do pseudocaule, o número de folhas vivas na floração, o tempo de maturação do cacho da emissão a colheita e a massa dos frutos não variam em função do tipo de sistema de produção das mudas;
- Sistema de Imersão Temporária não induzem alterações genômicas nas plantas produzidas;
- Plantas produzidas em sistema de Biorreator de Imersão Temporária não apresentam variação somaclonal quando subcultivadas por até seis vezes.

## REFERÊNCIAS

AGRITEMPO. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. 2013. Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br/>>. Acesso em: 24 out 2013.

AL-AMIN, M. D.; KARIM, M. R.; AMIN, M. R.; RAHMAN, S.; MAMUN, A. N. M. *In vitro* micropropagation of banana (*Musa* spp.). **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, Bangladesh, v. 34, n. 4, p. 645-659, 2009.

ALVES, É. J.; BEZERRA, M. L.; SANTOS-SEREJO, J. A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Org.). *A cultura da bananeira*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 59-86, 2004.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J. R.; BOLLAMMA, K. T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.) **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.39, n. 6, p. 551–556, 2003.

BAIRU, M. W.; AREMO, A. O.; STADEN, J. V. (2010). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**. DOI 10.1007/s10725-010-9554-x. Disponível em <http://www.springerlink.com/content/01t677688j110j15/> Acesso em: 12 de setembro de 2014.

BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G.; SOUZA, L. S. Solos, nutrição e adubação. In: ALVES, E.J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2.ed. rev. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPMF, 1999. p.197-260.

BARROS, A. C. B. Biorreator de imersão temporária aplicado na biofabricação de cana-de-açúcar. In: **BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PLANTAS IN VITRO**. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 51-69, 2011.

CABRAL, J. B. Sistema de imersão temporária (SIT) na produção em larga escala de vitroplantas. In: **BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO**

INDUSTRIAL DE PLANTAS IN VITRO. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 71-87, 2011.

CAMPOS, J. M. S. de; CALDERANO, C. de A.; PEREIRA, A. V.; DAVIDE, L. C.; VICCINI, L. F.; SANTOS, M. de O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.1, p.38-44, 2009.

COSTA, F. H. da S. **Micropropagação da bananeira: características fitotécnicas, fisiológicas e anatômicas**. 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, 2007.

DEBIASI, C. Utilização de biorreatores de imersão temporária em uma biofábrica de cultura de tecidos. In: BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PLANTAS IN VITRO. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 99-115, 2011.

DONATO, S. L. R.; SILVA, S. de O.; PASSOS, A. R.; LIMA NETO, F. P.; LIMA, M. B. Avaliação de variedades e híbridos de bananeira sob irrigação. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 348-351, 2003.

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

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 31, p. 113-120, 1989.

DREW, R. A.; SMITH, M. K. Field evaluation of tissue-cultured bananas in South-Eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Collingwood, v. 30, n. 4, p. 569-574, 1990.

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

FLORES, J.C. de O. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira (*Musa* spp.) em quatro ciclos de produção em Cruz das Almas-BA. **2000. 109p. Dissertação**

**(Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.**

GUIMARÃES, N. C. C.; TORGA, P. P.; RESENDE, A. C. J. PAIVA, E.; PAIVA, L. V. Identificação de Variantes somaclonais em bananeiras 'Prata Anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.33, n. 2, p. 448-454, 2009.

ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/EMBRAPA, p. 287-295, 1990.

JESUS, O. N. de; SILVA, S. de O. e; AMORIM, E. P.; FERREIRA, C. F.; CAMPUS, J. M. S. de; SILVA, G. de G.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in *ex situ* conservation. **Bio Med Central – Plant Biology**, v. 13, n. 41, p. 1-22, 2013.

JIN S.; MUSHKE, R.; ZHU, H.; TU L.; LIN, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1303–1316, 2008.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of genetic variability from cell cultures for improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, p. 197-214, 1981.

LEMOES, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, p. 482-487, 2001.

LEONEL, S.; GOMES, E. M.; PEDROSO, C. J. Desempenho agrônomico de bananeiras micropropagadas em Botucatu-SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 26, n.2, p. 245-248, 2004.

LESSA, L.S. **Avaliação agrônômica, seleção simultânea de caracteres múltiplos em híbridos diplóides (AA) e desempenho fisiológico de**

**cultivares de bananeira**. 2007. 83p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

LIMA, E. C.; PAIVA, R. NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, A. A. N. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* BAILL. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.

LOUREIRO, J.; CAPELO, A.; BRITO, G.; RODRIGUEZ, E.; SILVA, S.; PINTO, G.; SANTOS, C. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explant and analysis of ploidy stability using flow cytometry. *Biologia Plantarum*, Copenhagen, v. 51, n. 1, p. 7-14, 2007.

MOREIRA, R. S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. 2.ed. São Paulo: Fundação Cargill, 1999. (CD-ROM).

MSOGOYA, T. J.; GROUT, B. W. Altered fruit eating quality in tissue culture derived off-type banana (*Musa* spp.) **Journal of Applied Biosciences**, 2012. v. 49, p. 3388– 3393, <http://www.m.elewa.org>; ISSN 1997 – 5902.

MSOGOYA, T. J.; GROUT, B. W.; ROBERTS, A. Reduction in genome size and DNA methylation alters plant and fruit development in tissue culture induced off-type banana (*Musa* spp.). **Journal of Animal & Plant Sciences**, 2011. v. 11, n. 3, p. 1450-1456, <http://www.biosciences.elewa.org/JAPS>; ISSN 2071 – 7024.

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

NOMURA, E. S.; LIMA, J. D.; GARCIA, V. A.; RODRIGUES, D. S. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira, cv. Nanicão, em diferentes substratos e fontes de fertilizante. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.30, n.3, p.359-363, 2008.

OLIVEIRA, J. P. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Influência genotípica e clonal de genótipos de bananeiras micropropagados a partir de gemas florais

masculinas. **Revsta Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 558-563, 2011.

OLIVEIRA, J. P. de. **Produção de mudas *in vitro* e ocorrência de microrganismos endofíticos em bananeiras da Amazônia Sul-Occidental**. 2009. 122 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2009.

OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Occidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 459-465, 2008.

OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagación y estimativa de producción de mudas de bananos para la Amazonia Occidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1429-1432, 2008a.

OLIVEIRA, T. K. de; LESSA, L. S.; SILVA, S. O. e; OLIVEIRA, J. P. de. Características agronômicas de genótipos de bananeira em três ciclos de produção em Rio Branco, AC. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1003-1010, 2008b.

REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. DE. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n. 3, p.821-827, 2008.

RIBEIRO, A. P. **Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira**. 2012, 129 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/fitotecnia concentração em produção Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2013.

RODRIGUES, P. H. V. **Produção de mudas em biorreator de imersão temporária: um novo desafio para as biofábricas**. In: BIOFÁBRICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PLANTAS IN VITRO. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 89-97, 2011.

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

SANTANA, J. R. F. DE.; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M. DE.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento in vitro de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n. 2, p. 640-644, 2008.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; SOUZA, F. V. D.; JUGHANS, T. G.; LINO, L. S. M.; SOARES, T. L.; SOUZA, E. H. Micropropagação da bananeira. In: JUGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 237-255, 2009.

SANTOS, C. C. C. dos; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan, **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SCARPARE FILHO, J. A.; MINAMI, K.; KLUGE, R. A.; TESSARIOLI NETO, J. Estudo do primeiro ciclo produtivo da bananeira ‘Nanicão’ (*Musa* sp.) desenvolvida a partir de diferentes tipos de mudas. **Scientia Agricola**, v.55, n.1, p. 86-93, 1998.

SILVA, S. de O. e; PIRES, E. T.; PESTANA, R. K. N.; ALVES, J. S.; SILVEIRA, D. C. Avaliação de clones de banana Cavendish. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, p.832-837, 2006.

SILVA, S. de O. e; PASSOS, A. R.; DONATO, S. L. R.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V.; LIMA NETO, F. P.; LIMA, M. B. Avaliação de genótipos de bananeira em diferentes ambientes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.737-748, 2003.

SILVA, S. de O. e; FLORES, J.C.O.; LIMA NETO, F.P. Avaliação de cultivares e



híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.1567-1574, 2002.

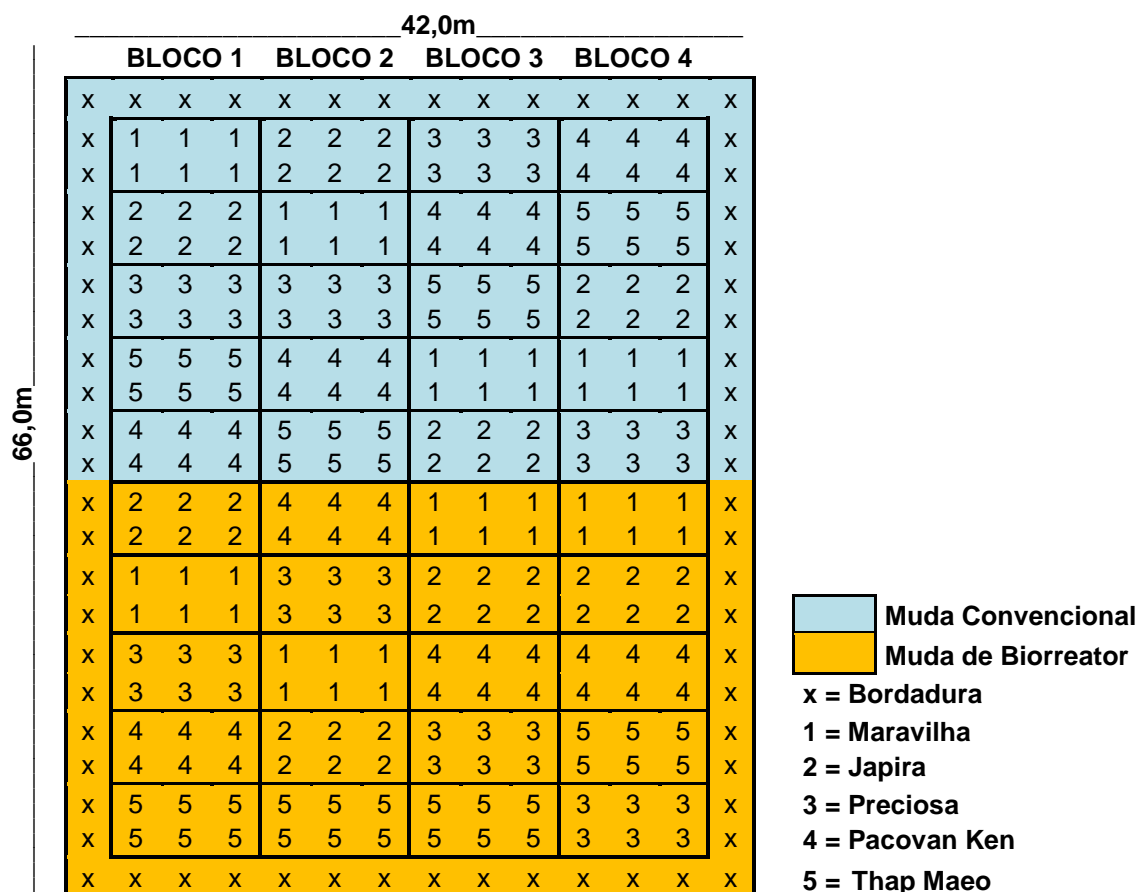
SOUZA, A da S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. Produção de mudas. In: CORDEIRO, Z.J.M (Org.). **Produção Banana**: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000, p. 39-46.

TEIXEIRA, L. A. J.; BETTIOL NETO, J. E. Comportamento agrônômico de bananeira 'Prata-anã' em função do tipo de muda. **Revista Brasileira de Fruticultura**. [online]. 2011, vol.33, n.1 ISSN 0100-2945. Acesso em: 10 de fevereiro de 2013.

TEIXEIRA, J. B.; CID, L. P. B.; Biorreatores para produção de mudas em Larga escala. IN: CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS. (Ed. Tec.) CID, L. P. B. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, p. 157-176, 2010.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais – produção de mudas em larga escala. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 24, p. 36-41, 2002.

## **APÊNDICE**



**APÊNDICE 1** Croqui apresentando a distribuição e organização do experimento de campo.

**APÊNDICE 2** Características químicas do solo Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico abrupto típico da área de implantação do Experimento

MO	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	S	CTC	V	
%		mg dm <sup>-3</sup>	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----									%
11,21	5,21	0,74	0,07	0,80	0,21	0,76	2,55	0,16	0,16	1,86	29,95	

**APÊNDICE 3** Comportamento agrônômico de bananeiras durante o primeiro ciclo de produção do plantio até a emissão do cacho

Genótipos	Número de dias do plantio a colheita		Altura da planta (m)		Diâmetro do Pseudocaule (cm)			Número de folhas vivas na floração	
	*BIT	CON	BIT	CON	BIT	CON	Média	BIT	CON
<b>Maravilha</b>	484,4abA	519,2aA	2,3bB	3,0aA	19,0	18,6	18,9a	11,0aA	8,8abB
<b>Preciosa</b>	436,2bB	477,2abA	2,8abA	3,1aA	16,8	17,6	17,2a	7,3bB	9,7abA
<b>Japira</b>	520,1aA	487,5abA	3,3aA	2,8aB	18,6	18,7	18,6a	10,3aA	8,1bB
<b>Thap Maeo</b>	486,4abA	426,3bB	2,8aA	2,7aA	18,2	18,2	18,2a	10,2aA	10,6aA
<b>Pacovan Ken</b>	465,3abA	463,2abA	3,2aA	3,3aA	18,5	19,2	18,9a	7,5bA	8,1bA
<b>Média</b>	478,5A	469,7A	2,9A	2,9A	18,2A	18,5A	-	9,3A	9,1A
<b>CV (%)</b>	8,8		9,1		6,3			10,6	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.  
 \*BIT = biorreator de imersão temporária; CON = convencional.

**APÊNDICE 4** Comportamento agrônômico de bananeiras durante o primeiro ciclo de produção após a emissão do cacho a colheita

Genótipos	Número de dias da emissão do cacho a colheita			Número de folhas vivas na colheita		Peso do cacho (kg)		Número de pencas por cacho		Número de frutos		Peso médio do fruto (g)		
	*BIT	CON	Média	BIT	CON	BIT	CON	BIT	CON	BIT	CON	BIT	CON	Média
<b>Maravilha</b>	141,6	136,5	138,9a	4,0aA	0,0bB	14,5aA	7,4bB	7,2abB	5,6bA	91,6bA	60,9bB	142,0	102,9	129,0a
<b>Preciosa</b>	111,6	124,0	118,6a	1,1bA	1,0bA	12,1aA	11,0abA	5,2cA	6,0bA	57,6cA	68,9bA	184,1	127,5	155,9a
<b>Japira</b>	137,0	123,5	130,7a	1,4bA	1,2bA	8,7aA	8,6bA	6,1bcA	6,2bA	68,4cA	69,7bA	112,0	106,5	109,2a
<b>Thap Maeo</b>	119,8	112,2	116,0a	3,2aA	4,2aA	12,6aB	18,7aA	8,6aB	10,4aA	127,4aB	145,4aA	91,4	117,9	104,7a
<b>Pacovan Ken</b>	130,2	124,5	127,4a	0,0bB	1,8bA	7,9aA	10,5bA	5,1cA	5,8bA	60,7cA	66,6bA	112,5	141,4	127,0a
<b>Média</b>	128,1A	123,2A	-	1,9A	1,8A	11,1A	11,7A	6,5A	6,9A	81,1A	84,6A	128,4A	121,1A	-
<b>CV (%)</b>	16,7			41,2		30,7		11,1		10,4		38,63		

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

\*BIT = biorreator de imersão temporária; CON = convencional.

**APÊNDICE 5** Comportamento agrônômico de bananeiras durante o primeiro ciclo de produção do plantio até a emissão do cacho

Genótipos	Número de dias do plantio a colheita			Altura da planta (m)			Diâmetro do Pseudocaule (cm)			Número de folhas vivas na floração		
	**BIT	CON	Média	BIT	CON	Média	BIT	CON	Média	BIT	CON	Média
<b>Maravilha</b>	777,6	802,0	782,5a	2,8	3,2	2,9d	24,6	22,8	24,2a	9,6	9,0	9,5a
<b>Preciosa</b>	711,7	724,9	718,3a	4,3	4,4	4,3ab	24,8	24,8	24,8a	8,9	8,5	8,7a
<b>Japira</b>	769,1	720,4	744,7a	4,1	4,2	4,1b	22,9	25,6	24,3a	9,0	8,5	8,7a
<b>Thap Maeo</b>	748,3	646,0	722,7a	3,6	4,2	3,8c	24,7	27,7	25,4a	8,5	9,0	8,6a
<b>Pacovan Ken</b>	766,3	740,4	782,5a	4,7	4,4	4,5a	26,1	26,5	26,4a	7,9	8,8	8,5a
<b>Média</b>	753,6A	727,9A	-	3,8A	4,2A	-	24,4A	25,6A	-	8,9A	8,6A	-
<b>CV (%)</b>	7,1			4,4			8,6			8,4		

\*Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*\*BIT = Biorreator de Imersão Temporária; CON = Convencional.

**APÊNDICE 6** Comportamento agrônômico de bananeiras durante o primeiro ciclo de produção após a emissão do cacho a colheita

Genótipos	Número de dias da emissão do cacho a colheita			Número de folhas vivas na colheita		Peso do cacho (kg)		Número de pencas por cacho			Número de frutos			Peso médio do fruto (g)		
	BIT	CON	Média	BIT	CON	BIT	CON	BIT	CON	Média	BIT	CON	Média	BIT	CON	Média
<b>Maravilha</b>	142,2	104,0	134,6a	4,4aA	0,0bB	19,4aA	4,9bB	8,2	4,0	7,3b	110,2	40,0	96,1b	151,1	97,7	140,5a
<b>Preciosa</b>	127,8	132,6	130,2a	1,2abA	2,9abA	9,2aA	12,0abA	6,1	6,9	6,5b	74,1	87,5	80,8b	106,3	129,0	117,6a
<b>Japira</b>	154,7	134,2	144,5a	2,4abA	1,1abA	10,7aA	10,1abA	6,5	7,1	6,8b	86,0	93,8	89,9b	114,4	95,0	104,7a
<b>Thap Maeo</b>	119,3	145,0	125,7a	2,5abA	5,0aA	14,6aA	23,1aA	16,3	15,0	15,9a	249,7	262,0	252,8a	53,8	83,6	61,3b
<b>Pacovan Ken</b>	122,0	139,2	133,4a	1,0bA	1,4abA	11,6aA	10,8abA	7,5	7,1	7,2b	106,2	96,2	99,5b	97,0	105,0	102,3ab
<b>Média</b>	135,3A	133,8A	-	2,4A	1,9A	13,2A	11,4A	8,9A	8,0B	-	120,2A	100,9B		108,4A	106,9A	
<b>CV (%)</b>	19,4			66,8		32,2		24,8			33,5			22,1		

\*Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*\*BIT = Biorreator de Imersão Temporária; CON = Convencional.

**APÊNDICE 7** Tabelas de análise de Variância referentes ao experimento de avaliação do desempenho agrônomo das plantas de bananeira durante dois ciclos de produção em campo

**Variável analisada: Número de dias do plantio a colheita**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	5152.748104	1717.582701	0.165	0.9132
CULTIVO	1	8453.554408	8453.554408	0.814	0.4333
erro 1	3	31140.495169	10380.165056		
CICLO	1	1222959.569111	1222959.569111	848.492	0.0000
GEN	4	56180.435212	14045.108803	9.745	0.0000
GEN*CULTIVO	4	54289.361413	13572.340353	9.417	0.0000
GEN*CICLO	4	-2.600119742E+0004	-6.50029936E+0003	-4.510	1.0000
CICLO*CULTIVO	1	-2.660879710E+0003	-2.66087971E+0003	-1.846	0.9975
GEN*CICLO*CULTIVO	4	-3.147214731E+0004	-7.86803683E+0003	-5.459	1.0000
erro 2	43	61977.338543	1441.333454		
Total corrigido	68	1380019.277516			
CV 1 (%) =		17.13			
CV 2 (%) =		6.39			
Média geral:	594.5920290		Número de observações:	69	

**Variável analisada: Número de dias do plantio a emissão do cacho**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	6660.476960	2220.158987	0.242	0.8626
CULTIVO	1	5936.650958	5936.650958	0.648	0.4796
erro 1	3	27470.175289	9156.725096		
CICLO	1	1142981.550474	1142981.550474	644.900	0.0000
GEN	4	33336.167425	8334.041856	4.702	0.0031
GEN*CULTIVO	4	48449.860993	12112.465248	6.834	0.0002
GEN*CICLO	4	-1.306404984E+0004	-3.26601246E+0003	-1.843	1.0000
CICLO*CULTIVO	1	-1.322251182E+0003	-1.32225118E+0003	-0.746	0.9975
GEN*CICLO*CULTIVO	4	-2.361462692E+0004	-5.90365673E+0003	-3.331	1.0000
erro 2	43	76210.609250	1772.339750		
Total corrigido	68	1303044.563400			
CV 1 (%) =		20.59			
CV 2 (%) =		9.06			
Média geral:	464.8500000		Número de observações:	69	

**Variável analisada: Altura**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	4.683157	1.561052	5.995	0.0877
CULTIVO	1	0.695158	0.695158	2.670	0.2008
erro 1	3	0.781132	0.260377		
CICLO	1	20.306232	20.306232	306.117	0.0000
GEN	4	9.893687	2.473422	37.287	0.0000
GEN*CULTIVO	4	0.475026	0.118757	1.790	0.1483
GEN*CICLO	4	0.817891	0.204473	3.082	0.0256
CICLO*CULTIVO	1	0.564588	0.564588	8.511	0.0056
GEN*CICLO*CULTIVO	4	0.212633	0.053158	0.801	0.5311
erro 2	43	2.852403	0.066335		
Total corrigido	68	41.281907			
CV 1 (%) =		14.98			
CV 2 (%) =		7.56			
Média geral:	3.4055072		Número de observações:	69	



### Variável analisada: Diâmetro

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	118.956502	39.652167	3.739	0.1537
CULTIVO	1	4.029580	4.029580	0.380	0.5812
erro 1	3	31.812132	10.604044		
CICLO	1	749.724420	749.724420	277.534	0.0000
GEN	4	15.537946	3.884486	1.438	0.2379
GEN*CULTIVO	4	24.331392	6.082848	2.252	0.0792
GEN*CICLO	4	18.684678	4.671170	1.729	0.1611
CICLO*CULTIVO	1	6.606093	6.606093	2.445	0.1252
GEN*CICLO*CULTIVO	4	-8.665760995E+0000	-2.16644025E+0000	-0.802	1.0000
erro 2	43	116.159316	2.701379		
Total corrigido	68	1077.176299			
CV 1 (%) =	15.27				
CV 2 (%) =	7.71				
Média geral:	21.3201449		Número de observações:	69	

### Variável analisada: Número de Folhas vivas na Floração

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	4.234370	1.411457	0.949	0.5166
CULTIVO	1	0.604457	0.604457	0.407	0.5691
erro 1	3	4.460601	1.486867		
CICLO	1	2.753900	2.753900	2.585	0.1152
GEN	4	30.076729	7.519182	7.059	0.0002
GEN*CULTIVO	4	19.782317	4.945579	4.643	0.0033
GEN*CICLO	4	10.139344	2.534836	2.380	0.0665
CICLO*CULTIVO	1	0.091934	0.091934	0.086	0.7703
GEN*CICLO*CULTIVO	4	11.327764	2.831941	2.658	0.0455
erro 2	43	45.806204	1.065261		
Total corrigido	68	129.277620			
CV 1 (%) =	13.53				
CV 2 (%) =	11.45				
Média geral:	9.0137681		Número de observações:	69	

### Variável analisada: Número de dias da emissão do cacho a colheita

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	1486.994360	495.664787	0.583	0.6658
CULTIVO	1	221.822966	221.822966	0.261	0.6447
erro 1	3	2550.975786	850.325262		
CICLO	1	1352.330493	1352.330493	2.356	0.1322
GEN	4	3361.545940	840.386485	1.464	0.2298
GEN*CULTIVO	4	1923.500356	480.875089	0.838	0.5089
GEN*CICLO	4	442.155563	110.538891	0.193	0.9410
CICLO*CULTIVO	1	23.988257	23.988257	0.042	0.8390
GEN*CICLO*CULTIVO	4	1740.070901	435.017725	0.758	0.5585
erro 2	43	24685.414571	574.079409		
Total corrigido	68	37788.799191			
CV 1 (%) =	22.48				
CV 2 (%) =	18.47				
Média geral:	129.7417391		Número de observações:	69	

### Variável analisada: Número de folhas vivas da floração a Colheita

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	26.773513	8.924504	11.484	0.0375
CULTIVO	1	1.876896	1.876896	2.415	0.2180
erro 1	3	2.331470	0.777157		
CICLO	1	1.647140	1.647140	1.444	0.2361
GEN	4	59.465698	14.866424	13.029	0.0000
GEN*CULTIVO	4	53.834933	13.458733	11.796	0.0000
GEN*CICLO	4	6.660353	1.665088	1.459	0.2312
CICLO*CULTIVO	1	0.612559	0.612559	0.537	0.4677
GEN*CICLO*CULTIVO	4	3.741287	0.935322	0.820	0.5197
erro 2	43	49.062467	1.140988		
Total corrigido	68	206.006316			
CV 1 (%) =	43.26				
CV 2 (%) =	52.41				
Média geral:	2.0379710	Número de observações:	69		

### Variável analisada: Massa do cacho

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	309.216219	103.072073	6.525	0.0788
CULTIVO	1	4.916574	4.916574	0.311	0.6158
erro 1	3	47.387871	15.795957		
CICLO	1	16.973477	16.973477	1.172	0.2851
GEN	4	410.699452	102.674863	7.088	0.0002
GEN*CULTIVO	4	354.544684	88.636171	6.119	0.0005
GEN*CICLO	4	66.493884	16.623471	1.148	0.3472
CICLO*CULTIVO	1	22.654320	22.654320	1.564	0.2179
GEN*CICLO*CULTIVO	4	19.593434	4.898358	0.338	0.8507
erro 2	43	622.873401	14.485428		
Total corrigido	68	1875.353316			
CV 1 (%) =	33.52				
CV 2 (%) =	32.10				
Média geral:	11.8579710	Número de observações:	69		

### Variável analisada: Número de Pencas por Cacho

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	9.413192	3.137731	16.012	0.0237
CULTIVO	1	1.821896	1.821896	9.297	0.0555
erro 1	3	0.587897	0.195966		
CICLO	1	32.878623	32.878623	19.175	0.0001
GEN	4	283.937936	70.984484	41.399	0.0000
GEN*CULTIVO	4	18.773134	4.693284	2.737	0.0409
GEN*CICLO	4	93.502422	23.375606	13.633	0.0000
CICLO*CULTIVO	1	12.552453	12.552453	7.321	0.0097
GEN*CICLO*CULTIVO	4	-3.242842281E+0000	-8.10710570E-0001	-0.473	1.0000
erro 2	43	73.730452	1.714662		
Total corrigido	68	523.955165			
CV 1 (%) =	6.05				
CV 2 (%) =	17.90				
Média geral:	7.3134783	Número de observações:	69		

### Variável analisada: Número de Frutos por cacho

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	3716.654559	1238.884853	27.735	0.0108
CULTIVO	1	918.350551	918.350551	20.559	0.0201
erro 1	3	134.003920	44.667973		
CICLO	1	14004.677768	14004.677768	26.332	0.0000
GEN	4	93529.197900	23382.299475	43.963	0.0000
GEN*CULTIVO	4	5062.209271	1265.552318	2.379	0.0665
GEN*CICLO	4	30106.308048	7526.577012	14.152	0.0000
CICLO*CULTIVO	1	2049.063805	2049.063805	3.853	0.0562
GEN*CICLO*CULTIVO	4	-1.126680543E+0003	-2.81670136E+0002	-0.530	1.0000
erro 2	43	22869.855846	531.857113		
Total corrigido	68	171263.641125			
CV 1 (%) =		6.98			
CV 2 (%) =		24.10			
Média geral:	95.6850725		Número de observações:	69	

### Variável analisada: Massa média dos frutos

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLC	3	18649.737491	6216.579164	5.321	0.1016
CULTIVO	1	324.589444	324.589444	0.278	0.6346
erro 1	3	3504.758447	1168.252816		
CICLO	1	5054.118369	5054.118369	3.101	0.0853
GEN	4	19689.908281	4922.477070	3.021	0.0279
GEN*CULTIVO	4	10535.288183	2633.822046	1.616	0.1875
GEN*CICLO	4	8349.312908	2087.328227	1.281	0.2924
CICLO*CULTIVO	1	205.580677	205.580677	0.126	0.7242
GEN*CICLO*CULTIVO	4	5326.422857	1331.605714	0.817	0.5213
erro 2	43	70073.451836	1629.615159		
Total corrigido	68	141713.168496			
CV 1 (%) =		29.16			
CV 2 (%) =		34.44			
Média geral:	117.2256522		Número de observações:	69	