



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



MARIA MAIANY DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*
POR MEIO DO MÉTODO SCALP E INDUÇÃO DO AUMENTO
DA VARIABILIDADE GENÉTICA PELO USO DE
MUTAGÊNICO QUÍMICO E DA TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA EM BANANEIRA (*Musa* spp., AAB).**

MARIA MAIANY DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*
POR MEIO DO MÉTODO *SCALP* E INDUÇÃO DO AUMENTO
DA VARIABILIDADE GENÉTICA PELO USO DE
MUTAGÊNICO QUÍMICO E DA TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA EM BANANEIRA (*Musa spp.*, AAB).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Dr. Nataniel Franklin de Melo

Feira de Santana - BA
2017

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado

O48o Oliveira, Maria Maiany de

Otimização do sistema de multiplicação *in vitro* por meio do método *Scalp* e indução do aumento da variabilidade genética pelo uso de mutagênico químico e da transformação genética em bananeira (*Musa spp.*, AAB) / Maria Maiany de Oliveira. - 2017.
90 f.: il.

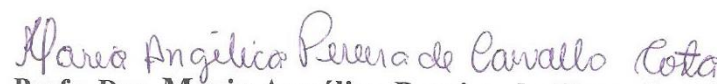
Orientador: Nataniel Franklin de Melo.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2017.

1. Bananeira - Melhoramento genético. 2. Plantas - Propagação *in vitro*. I. Melo, Nataniel Franklin de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 581.1

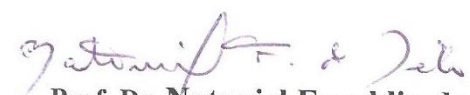
BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)


Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)


Prof. Dr. José Raniera Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)


Profa. Dra. Adriana Rodrigues Passos
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)


Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo
(Embrapa Semiárido)
Orientador e Presidente da Banca

Aos meus pais, Maria Salete de Oliveira e Francisco Pedro de Oliveira, por terem sempre priorizado a formação acadêmica de seus filhos e as minhas irmãs que tanto amo Renata, Erika e Jéssica;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Deixo expressos meus sinceros agradecimentos as seguintes instituições e pessoas, sem as quais o presente trabalho não teria sido desenvolvido:

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Ferira de Santana (UEFS);

À Embrapa Semiárido por fornecer toda a sua infraestrutura para desenvolvimento da tese;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa;

Ao meu orientador Dr. Nataniel Franklin de Melo pela oportunidade de orientação, confiança e pelas suas valiosas contribuições para o desenvolvimento do trabalho e do meu crescimento profissional;

A todos os professores do programa de Recursos genéticos Vegetais que contribuíram para meu crescimento científico, intelectual e profissional;

Um agradecimento especial aos meus pais Pedro e Salete pelos seus difíceis caminhos percorridos e dedicação incondicional que tiveram em dar, a preciosa, oportunidade de estudo para seus filhos, por sempre apoiarem minha trajetória acadêmica.

Aos meus irmãos: Sérgio, Renata, Jucelino, Erika, Jéssica, e por todo carinho, estímulo constante e apoio em todas as etapas da minha vida acadêmica. Muitíssimo obrigada!

A Gledson, pelo apoio, incentivo, compreensão e afeto, demonstrados nessa jornada e aos meus adorados cunhados, que os tenho como irmãos, Juscelino, Vinícius e Diana pelo estímulo e imenso carinho que sempre demonstraram por mim;

Aos meus adorados sobrinhos Marcus, Alexandre, **Heitor** e Benjamim pelo carinho, afeto e, principalmente, por terem a ingênua capacidade de tornarem meus dias mais alegres.

Aos meus amigos pela troca de conhecimento e experiências e pelos bons momentos de convivência em especial: Janáira, Rafaella, Regina Célia, Lívia, Carla Maria, Hugo Leonardo, Larisse, Vandeilson, Rita Mércia, Airla, Rafael, Gabriela, Rúbia, Irlane, Simone, Bruna, Evelin e Larissa.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido em especial Ângela, Francisco e Elenício por todos os ensinamentos e por sempre estarem disponíveis para me auxiliar;

A todos que aqui não foram mencionados, mas que contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito obrigada!

"Saber muito não lhe torna inteligente.
A inteligência se traduz na forma que você
recolhe, julga, maneja e, sobretudo,
onde e como aplica esta informação."

Carl Sagan

RESUMO

A banana (*Musa* spp.) é considerada um dos mais importantes frutos no comércio mundial em virtude seu potencial nutritivo e econômico. Mas, apesar de existir um grande número de variedades no mercado, a bananeira ainda é acometida por muitas doenças. A aplicação do método de cruzamentos nesta espécie é muito difícil, pois a maioria das variedades cultivadas é triploide apresentando baixa fertilidade. Nesse caso, faz-se necessário o uso da biotecnologia e de suas ferramentas aplicadas ao melhoramento genético não convencional para desenvolver novas variedades que tenham resistência aos seus diferentes tipos de patógenos. Este trabalho foi realizado com os objetivos de adaptar a técnica de obtenção de calos embriogênicos de bananeira por meio do método *Scalp* nas cvs. Maçã e Pacovan, ajustando os processos de indução de estruturas polimeristemáticas e de multiplicação de brotos e induzir o aumento da variabilidade genética por meio da mutagênese *in vitro* com o uso do agente químico etilmetanosulfonato e, da transformação genética pelo bombardeamento de micropartículas. Foram avaliados os calos formados, o efeito do mutagênico no cultivo *in vitro* de brotos e, os efeitos da transformação genética quanto à resistência dos brotos em meio de seleção contendo o herbicida Imazapyr. Os resultados mostraram que as estruturas polimeristemáticas obtidas têm capacidade de originar calos com apenas um mês de cultivo e, ambas as cultivares desenvolveram calos friáveis com rendimentos médios acima de 90%. A eficiência desse método foi comprovada pela alta capacidade de indução de calos friáveis nas duas cultivares avaliadas, como também pela rapidez no processo de obtenção de calos, sendo este o primeiro estudo de adaptação da metodologia para as cultivares Maçã e Pacovan. Por outro lado, a avaliação da indução de mutação permitiu concluir que a sobrevivência e a capacidade de formação de brotos diminuíram em função do aumento da concentração e do tempo de imersão no etilmetanosulfonato. As plantas sobreviventes passaram por uma triagem com o agente seletivo ácido fusárico na qual, foi possível regenerar plantas *in vitro* das cultivares submetidas ao tratamento com o mutagênico e selecionar possíveis mutantes com resistência ao ácido fusárico para as cvs. Maçã e Pacovan. O método da transformação genética mostrou-se eficiente na regeneração dos brotos resultando em altos valores de sobrevivência e multiplicação, onde possíveis plantas transgênicas de bananeira cv. Maçã foram obtidas, após a seleção de resistência ao herbicida. Portanto, conclui-se que todo material produzido, tanto na fase mutagênica quanto na transformação genética, apresenta uma maior variabilidade genética potencialmente aplicável ao melhoramento da bananeira.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, estruturas polimeristemáticas, embriogênese somática, mutação, transformação genética.

ABSTRACT

Banana (*Musa* spp.) is considered one of the most important fruits in world trade due to its nutritional and economic potential. But although there is a large number varieties on the market, the banana is still affected by many diseases. The application of the method of crosses in this species is very difficult because the majority of cultivated varieties is triploid presenting low fertility. In this case, it is necessary to use biotechnology and its tools applied to non-conventional genetic improvement to develop new varieties that have resistance to their different types of pathogens. This work was carried out with the objective of adapting the technique of obtaining embryogenic callus of banana by means of the *Scalp* method in cultivars Brazilian Maçã and Pacovan, adjusting the processes of induction of meristematic structures and multiplication of shoots and induce increased genetic variability by *in vitro* mutagenesis using the chemical agent ethylmethanesulfonate and, of the genetic transformation by the bombardment of microparticles. Was evaluated the callus formation, the effect of mutagenic in the *in vitro* cultivation of shoots and the effects of genetic transformation on shoot resistance in selection medium containing the herbicide Imazapyr. The results showed that the meristematic structures obtained have the capacity to origin callus with only one month of cultivation, and both cultivars developed friable callus with average values above 90%. The efficiency of this method was evidenced by the high capacity of induction of friable callus in the two evaluated cultivars but also by the rapidity in the process of obtaining calluses, being the first study of adaptation of the methodology for Brazilian banana cultivars. On the other hand, the evaluation of the mutation induction allowed to conclude that the survival and the capacity of bud formation decreased as a function of the increase of the concentration and the immersion time in the ethyl methane sulfonate. The surviving plants underwent a sorting with the fusaric acid selective agent in which it was possible to regenerate *in vitro* plants of the cultivars submitted to treatment with the mutagen and to select possible mutants with fusaric acid resistance for cultivars Maçã and Pacovan. And the genetic transformation method proved efficient in the regeneration of shoots resulting in high values of survival and multiplication, where possible transgenic plants of banana cv. Maçã were obtained after selection of resistance to the herbicide. Therefore, it is concluded that all the material produced, both in the mutagenic phase and in the genetic transformation, presents a greater genetic variability potentially applicable to the banana improvement.

Keywords: Tissue culture, meristematic structures, somatic embryogenesis, mutation, genetic transformation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Respostas da multiplicação *in vitro* de duas cultivares de banana do grupo AAB ao uso de benzilaminopurina (BAP) na presença ou ausência de luz. 38

Figura 2: Análise histológica das estruturas polimeristemáticas de Bananeira da cv. Maçã cultivada em meio MS suplementado com 100 µM de BAP. 39

Figura 3. Distribuição de frequência (%) de classes de níveis de oxidação para a interação entre calos e concentrações de 2,4-D (5 µM e 10 µM), calos de bananeiras cvs. Maçã e Pacovan, aos 30 dias de cultivo *in vitro* no escuro. 40

Figura 4. Resposta *in vitro* da indução de calos em *Musa* spp. 46

CAPÍTULO 2

Figura 1. Aspecto geral de plantas de bananeira pré-tratadas com etilmetanosulfonato (EMS) e cultivadas em meio de cultura seletivo contendo 100 µM de ácido fusárico, após 60 dias de cultivo. 67

CAPÍTULO 3

Figura 1: Efeito de diferentes concentrações do herbicida Imazapyr sobre o desenvolvimento de brotos de bananeira cv. Maçã com 30 dias de cultivo. 81

Figura 2: Etapas da transformação genética. 85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Número médio de brotos (MNB/explante) e média do comprimento de brotos (em mm) (MCB/explante) de bananeiras das cvs. Maçã e Pacovan cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com 10 µM de benzilaminopurina (BAP) aos dois meses de cultivo. 35

Tabela 2. Número médio de estruturas polimeristemáticas/explante (EPM) e comprimento médio das estruturas polimeristemáticas/explante (CEPM, em mm) das cvs. Maçã e Pacovan cultivados *in vitro* em meio MS suplementado com 100 µM de benzilaminopurina (BAP), após um mês de cultivo na ausência de luz. 37

Tabela 3. Percentagens de sobrevivência de calos de bananeiras das cultivares Maçã e Pacovan, em resposta a duas concentrações de 2,4-D (5µM e 10 µM), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio ZZ sob a condição de ausência de luz (escuro). 41

Tabela 4. Caracterização morfológica de calos de bananeiras (AAB) das cultivares Pacovan e Maçã quanto às percentagens de calos compactos (C), friáveis (F) e embriogênicos (E) aos 60 dias de cultivo *in vitro*. 43

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Efeito da concentração e do tempo de exposição ao etilmetanosulfonato (EMS) na sobrevivência de explantes de bananeira (brotos) das cvs. Pacovan e Maçã cultivadas *in vitro*. 60

Tabela 2: Efeito do tempo de exposição na CFB (capacidade de formação de brotos), MCB (média do comprimento de brotos) e CRE (crescimento dos brotos tratados) em função das concentrações do etilmetanosulfonato sobre o desenvolvimento dos explantes nas cvs. Maçã e Pacovan, 30 dias após a inoculação *in vitro*. 63

Tabela 3: Efeito da concentração do etilmetanosulfonato na CFB (capacidade de formação de brotos), MCB (média do comprimento de brotos) e CRE (crescimento dos brotos tratados) em função dos tempos de exposições sobre o desenvolvimento dos explantes de bananeira cvs. Maçã e Pacovan, 30 dias após a inoculação *in vitro*. 63

Tabela 4: Sobrevivência e desenvolvimento de plantas de bananeira cvs. Maçã e Pacovan tratadas com etilmetanosulfonato (EMS) em meio de seleção com 100 µM de ácido fusárico, avaliados após 60 dias de cultivo *in vitro*. 66

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Avaliação da sobrevivência e do desenvolvimento de bananeira cv. 82 Maçã transformada por biobalística, após 30 dias de cultivo em meio de seleção suplementado com 2,0 μM e 3,0 μM do herbicida Imazapyr.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 1 - OTIMIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM CULTIVARES DE BANANEIRA (AAB) MAÇÃ E PACOVAN A PARTIR DO MÉTODO SCALP	27
1.1 Introdução	30
1.2 Material e Métodos	32
1.2.1 Indução e multiplicação de estruturas polimeristemáticas	32
1.2.1.2 Análise histológica das estruturas polimeristemáticas	33
1.2.2 Indução e formação de calos	33
1.2.3 Análises dos dados	34
1.3 Resultados e Discussão	35
1.4 Conclusões	47
REFERENCIAS	48
CAPÍTULO 2 - EFEITO DO ETILMETANOSULFONATO (EMS) E DO ÁCIDO FUSÁRIO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE BANANEIRA (<i>Musa spp.</i>, AAB)	51
2.1 Introdução	54
2.2 Material e Métodos	57
2.2.1 Estabelecimento do sistema de multiplicação de brotos	57
2.2.2 Indução de mutação em brotos de bananeira e determinação da DL ₅₀ do mutagênico químico EMS para as cultivares estudadas	57
2.2.3 Efeito da toxicidade e seleção de plantas tolerantes o ácido fusárico nas cultivares de bananeira	58
2.3 Resultados e Discussão	60
2.4 Conclusões	69
REFERENCIAS	70
CAPÍTULO 3 - EFICIÊNCIA DO MÉTODO SCALP NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BANANEIRA cv. MAÇÃ (AAB) VIA BIOBALÍSTICA	73
3.1 Introdução	76
3.2 Material e Métodos	78
3.2.1. Multiplicação das estruturas polimeristemáticas via <i>Scalp</i>	78
3.2.2. Teste de sensibilidade e determinação da concentração ótima do herbicida Imazapyr	78
3.2.3. Estrutura do plasmídeo	79
3.2.4 Transformação genética pelo método biobalística	79
3.2.5 Regeneração e seleção dos brotos	79
3.3 Resultados e Discussão	81
3.4 Conclusões	86

REFERÊNCIAS	87
CONCLUSÃO GERAL	89

INTRODUÇÃO GERAL

O processo evolutivo da maioria das cultivares de bananeira ocorreu no continente asiático. Da mesma forma, essa também é a região do centro de origem da maior parte do germoplasma das espécies de *Musa*. Os centros secundários ocorrem na África Oriental, em algumas ilhas do Pacífico, com uma considerável diversidade genética, e na África Ocidental (DANTAS et al. 1997).

As cultivares existentes apresentam diferentes níveis de autoploidia (di, tri ou tetraploides), com 22, 33 ou 44 cromossomos. As variedades que são usadas para a produção comercial são predominantemente triploides ($2n = 3x = 33$) que evoluíram de cruzamentos dentro e entre diversos acessos de duas espécies ancestrais diploides: *Musa acuminata* Colla (genoma A) e *Musa balbisiana* Colla (genoma B). Acredita-se que a triploidia tenha sido estabelecida em decorrência da seleção humana para os caracteres vigor e tamanho dos frutos (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955; TENKOUANO E SWENNEN, 2004).

As bananas e plátanos são culturas de importância econômica na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo. A banana está, juntamente com o arroz, o trigo e o milho, entre as culturas alimentares mais importantes do mundo (PERRIER et al. 2011; ORTIZ e SWENNEN, 2014), e ocupa o primeiro lugar na produção mundial de frutas com 144 milhões de toneladas produzidas, seguida pela Melancia com 111 milhões de toneladas de acordo com a última atualização FAO em 2014 (FAOSTAT, 2017).

A bananeira é cultivada em 107 países, distribuídos em todos os continentes, com uma área de plantio estimada em 5,3 milhões de hectares e uma produção de 114 milhões de toneladas. Entre os continentes, tem-se o Asiático e o Americano como os maiores produtores, com 55,8% e 24,7%, respectivamente, de bananas. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana e, em uma área de aproximadamente 478,7 mil hectares, produziu 6,95 milhões de toneladas no ano de 2014, superado, somente, pela Índia, China e Filipinas (FAOSTAT, 2017).

Segundo as projeções contidas no relatório de Perspectivas Agrícolas da OCDE-FAO 2015-2024 (OCDE-*Organisation for Economic Co-operation and Development* e FAO-*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a produção da banana no Brasil deve continuar aumentando como resultado dos

ganhos de produtividade, e pode atingir 7,8 milhões de toneladas nos próximos oito anos. Esse relatório ainda traz as perspectivas para o mercado externo e aponta que, mesmo com as exportações baixas na década passada, devido à importância do mercado interno, um aumento nas vendas para mercados estrangeiros poderá ocorrer como resultado da reorganização da indústria e a abertura de novos canais de comércio (OECD-FAO, 2015).

Porém, vale a pena ressaltar que mesmo com toda a importância da bananicultura, os melhoristas relatam que ainda são poucas as cultivares que estão disponíveis para exploração comercial, ou seja, que apresentam potencial agrônomo, tolerância às pragas e doenças, e frutos com boas características de mercado (SILVA et al. 2013).

Ortiz e Swennen (2014), também alertaram que, mesmo a banana estando entre os dez alimentos básicos mais importantes, ainda são poucos os programas ativos de melhoramento de *Musa*. Entre eles, estão o do Brasil, Camarões, Costa do Marfim, Guadalupe, Honduras, Índia, Nigéria, Tanzânia e Uganda. O programa mais antigo em operação é o de Honduras - *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola* (FHIA), cujo foco inicial era as bananas de consumo *in natura*, e posteriormente foram incluídas os demais tipos de banana, como os plátanos. A partir desse, outros programas de melhoramento foram surgindo e, ampliando as pesquisas em diversas áreas.

Nos programas de melhoramento de bananeira têm sido empregadas hibridações diversas, para integrar genes de interesse com o objetivo de conhecer, classificar, caracterizar, avaliar e desenvolver novas cultivares com tolerância aos mais variados tipos de estresses. Mesmo com tantos anos de estudos e pesquisas de melhoramento genético da bananeira, que já tem quase um século de pesquisas (ORTIZ e SWENNEN, 2014), tais problemas ainda são recorrentes. Rai et al. (2011), relataram que os danos causados por esses estresses, bióticos e abióticos, são responsáveis por enormes perdas econômicas em todo o mundo, pois a produção e a produtividade de várias culturas continuam sendo afetadas negativamente.

A cultura da bananeira sofre pela ação de várias doenças, que em sua maioria são devastadoras. Os problemas fitossanitários são causados por diversos fitopatógenos, entre eles os fungos, bactérias, vírus e nematoides, com destaque para os fungos, que assumem a maior importância, tanto do ponto de vista numérico, quanto do ponto de vista prático, devido à grande capacidade desses

organismos em causar perda na qualidade e na produtividade da banana produzida no país e no mundo. As doenças fúngicas de maior relevância da bananeira são a Sigatoka amarela, causada por *Mycosphaerella musicola*, Leach, Sigatoka negra por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, e Mal do Panamá ou Fusariose, causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Smith (CORDEIRO, 1999; YOKOMIZO, 2011).

As cultivares de maiores aceitações no mercado interno brasileiro e, conseqüentemente, mais usadas pelos agricultores, são a Prata, Pacovan, Maçã, Grande Naine e Terra. Estas são muito suscetíveis à Sigatoka negra e, à exceção da Terra e Maçã, são também suscetíveis à Sigatoka amarela. Com relação à Fusariose a Grande Naine e a Terra são resistentes, a Maçã é altamente suscetível, e as demais cultivares são medianamente suscetíveis (SILVA et al. 2013). As perdas no rendimento provocadas pelas doenças podem alcançar 100%, uma vez que as alternativas de controle apresentam-se pouco eficientes e de custo elevado (SILVA et al. 2011), o que acarreta grandes problemas de manutenção e expansão das áreas de cultivo devido à falta de cultivares resistentes (FILIPPI et al. 2001; YOKOMIZO, 2011). A Fusariose foi considerada a doença mais desastrosa na bananeira e na história agrícola mundial e ainda é a mais séria doença que ameaça muitas cultivares atuais (LI et al. 2013; ELAYABALAN E KALAIMUGHILAN, 2013; KUMARI e KUMAR, 2015).

É nessa conjuntura que o melhoramento genético entra com seu papel de desenvolver novas cultivares. No entanto, no caso específico da bananeira, existem alguns obstáculos no melhoramento genético, entre eles, a elevada esterilidade feminina e o reduzido número, ou até mesmo a ausência, de sementes (MAY et al. 1995; TENKOUANO e SWENNEN, 2004; HESLOP-HARRISON e SCHWARZ ACHER, 2007; AMORIM et al. 2012) nas cultivares comerciais.

Para contornar problemas desta natureza estratégias alternativas, como o uso de biotecnologia, têm sido empregadas para criação de novas cultivares, de forma que venha complementar e dar suporte às atividades convencionais de melhoramento (SANTOS-SEREJO et al. 2006). Assim, técnicas não convencionais de melhoramento vêm sendo desenvolvidas com o passar do tempo, a exemplo das transformações genéticas, indução de mutação, hibridação somática e duplicação do número de cromossomos dos diploides (YOKOMIZO, 2011; SILVA et al. 2013). A biotecnologia tem sido largamente utilizada como ferramenta auxiliar aos programas

de melhoramento genético, acelerando os resultados das pesquisas e contribuindo para o desenvolvimento de novas cultivares.

Técnicas de engenharia genética, associadas à cultura de tecidos, vêm sendo utilizadas no melhoramento desta espécie com a obtenção de cultivares resistentes a doenças e agronomicamente melhoradas. Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática tem sido um importante sistema de obtenção de plantas, e o entendimento desse processo pode servir como base para futuros trabalhos de melhoramento genético (RIBEIRO et al. 2010).

A embriogênese somática serve como base para outras técnicas dentro da cultura de tecidos e da biotecnologia, como: a culturas de calos embriogênicos, que podem ser utilizadas diretamente para a micropropagação de alguns genótipos que não respondem bem ao cultivo de meristemas, ou ainda, se cultivadas em meio líquido, para obtenção de suspensões celulares, as quais têm diferentes aplicações, como: transformação genética; fusão de protoplastos; mutagênese; criopreservação; micropropagação e indução de variação somaclonal (SANTOS-SEREJO et al. 2006).

Contudo, para que estas tecnologias possam ser aplicadas, é necessário que haja um sistema de cultivo *in vitro* eficiente e, para isso, obter protocolos confiáveis e eficientes para a cultura da bananeira. Com a embriogênese somática eficientemente desenvolvida é possível adquirir inúmeros propágulos a partir de um pequeno número de explantes (FILIPPI et al. 2001; KHALIL et al. 2002).

Mas, ainda existe a dificuldade de obter o tipo de explante apropriado para a técnica de embriogênese somática (RIBEIRO et al. 2012), principalmente a partir de tecidos meristemáticos e de inflorescências masculinas, como no caso da bananeira. De forma diferente, o método de *Scalp* que foi desenvolvido por Dhed'a (1992), e tem como principal vantagem à utilização de tecidos meristemáticos derivados de brotos laterais cultivados *in vitro*, que garante a independência da manutenção do material em campo e da sazonalidade, e pode ainda ser aplicado em várias cultivares de bananeiras e plátanos (STROSSE et al. 2006).

A variação genética é o pilar que os melhoristas de plantas utilizam para produzir cultivares novas e melhoradas. Em casos em que há limitações na variabilidade genética natural, ou dificuldades de trabalhar com os métodos tradicionais de melhoramento, a indução de mutação vem sendo utilizada como uma importante ferramenta para obter novas características e superar estas barreiras (PESTANA et al. 2010).

As mutações induzidas têm desempenhado um papel significativo em face aos desafios relacionados com a segurança nutricional e alimentação mundial, por meio do melhoramento de germoplasma, e a sua utilização para o desenvolvimento de novas variedades de mutantes (SUPRASANNA et al. 2015), a exemplo plantas mais produtivas ou com maior potencial nutritivo .

As pesquisas que utilizam indução de mutação atrelada a outras ferramentas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, têm sido largamente aplicadas em vegetais de várias espécies cultivadas, tanto pelo uso de método físico quanto pelo o de método químico.

Os agentes mutagênicos são classificados como físicos e químicos que diferem no seu modo de ação. Os agentes mutagênicos físicos são: a luz ultravioleta, raios-X, raios gama e feixes de baixa e alta energia de nêutrons. Os químicos normalmente utilizados para mutagênese de plantas cultivadas são: o etilmetanosulfonato (EMS), dietilsulfato (dES), etilenoimina (EI), etilnitrosouretano (ENU), etilnitrosoureia (ENH) e metilnitrosoureia (MNH). A seleção do mutagênico depende muito do tipo do material vegetal utilizado, que pode ser órgãos como brotos, meristemas, gemas axilares, suspensão celular ou protoplastos (JAIN, 2010).

As populações submetidas à mutação podem ser criadas com um custo relativamente baixo (PARRY et al. 2009). Alguns autores como Rai et al. (2011) e Jain (2010), consideram os mutagênicos químicos mais fáceis de manusear, pois não necessitam de equipamentos especiais como os usados nos tratamentos com radiação, e ainda podem ser desenvolvidos sob condições controladas de espaço e tempo.

O etilmetanosulfonato - EMS é um dos principais agentes químicos utilizados no melhoramento genético vegetal para obter variabilidade. Essa substância é também muito utilizada na cultura da bananeira (*Musa spp.*), a exemplo de estudos realizados por alguns autores como Omar et al. (1989), Bhagwat e Duncan (1998), Musoke, et al. (1999), Bidabadi et al. (2011 e 2012a), Jankowicz-Cieslak et al. (2012), e Chen et al. (2013).

De acordo com a Agência Internacional de Energia Atômica (*International Atomic Energy Agency - IAEA*), a aplicação de técnicas de mutação tem gerado um grande aumento na variabilidade genética e tem desempenhando um papel significativo nos estudos de melhoramento genético de plantas e de avançados estudos de genoma, com a geração de milhares de novas variedades em centenas

de espécies cultivadas. No entanto, no banco de dados da FAO/IAEA-variedades mutantes (*Joint FAO/IAEA Mutant Variety Database*), apenas três cultivares de bananeira foram desenvolvidas por essa técnica, ou seja, a '*Klue Hom Thong KU1*' com elevada massa do cacho, que foi desenvolvida na Tailândia e inscrita na IAEA no ano de 1985, a segunda, em 1993 na Malásia, foi a '*Novaria*' com amadurecimento precoce e boa qualidade dos frutos, e mais recentemente, no ano de 2007 no Sudão, a '*Al-beely*' caracterizada pelo alto rendimento (FAO/IAEA, 2016). Porém, é importante ressaltar que essas cultivares foram estabelecidas por meio da mutação física, com radiação gama, e não há registros oficiais de variedades mutantes obtidas pelo método químico. Isso reforça ainda mais a necessidade de se ampliar as pesquisas com a indução de mutação química e explorar todas as suas potencialidades.

Nesse sentido, os estudos com EMS vêm sendo realizados para gerar variabilidade genética com foco na seleção de mutantes para diversos caracteres, entre eles a tolerância ao estresse hídrico (BIDABADI et al. 2011 e 2012b) e, principalmente, a resistência a Fusariose (BHAGWAT e DUNCAN, 1998; CHEN et al. 2013; KRISHNA et al. 2013). Existem, também, estudos de genômica funcional (JANKOWICZ-CIESLAK, et al. 2012). Foi possível observar, nesses trabalhos, que os resultados adquiridos foram satisfatórios e atenderam bem as perspectivas dos seus objetivos.

Estes resultados reafirmam a citação de Santos-Serejo et al. (2006), que chamou a atenção para o potencial do emprego da indução de mutação *in vitro* no melhoramento de bananeira, visando à obtenção de características agrônômicas desejáveis.

A possibilidade de mutação dirigida, usando mutagênicos e certos pré-tratamentos químicos, deve ajudar a alcançar bons resultados. Isso porque as mutações induzidas podem desempenhar um papel mais significativo no futuro próximo (SUPRASANNA et al. 2015). No entanto, o sucesso da mutagênese *in vitro* depende muito da disponibilidade de protocolos eficientes de mutagênese e regeneração de alto rendimento, com métodos eficazes de rastreios fenotípicos para mutações desejadas. Dessa forma, a mutagênese pode ser mais útil no melhoramento das plantas cultivadas (JAIN, 2010; SUPRASANNA et al. 2015).

Em relação ao método de rastreio para identificar se a variabilidade genética foi gerada é possível direcionar essa busca por meio de estudos específicos, de

acordo com o objetivo desejado, entre eles os genéticos e fenotípicos e as respostas fisiológicas das plantas tratadas utilizando-se substâncias químicas como agentes de seleção, a exemplo o ácido fusárico.

O ácido fusárico é uma toxina não específica produzida pela maioria dos *Fusarium* spp., em altas concentrações causa alterações como, na permeabilidade da membrana, na atividade mitocondrial e conseqüentemente inibindo a síntese de ATP (BOUIZGARNE et al. 2006). A tolerância ao ácido fusárico pode não estar diretamente relacionada a um determinado tipo específico de raça do *Fusarium*, mas pode atrasar o avanço do fungo dentro da planta (MATSUMOTO et al. 1995). Essa toxina foi utilizada com sucesso na seleção de plantas resistentes ao *Fusarium* em bananeira cv. Maçã por Matsumoto et al. (1995), em gladiolus (planta ornamental) por Remotti et al. (1997) e por Flores e Bruckner (2014), no maracujazeiro amarelo.

De outro modo tem-se a tecnologia da engenharia genética que é potencialmente um caminho mais curto para o melhoramento de plantas e animais domesticados, principalmente porque ela pode ignorar barreiras reprodutivas para recombinação e troca genética entre espécies não relacionadas através da criação de genes (HOLST-JENSEN, 2009).

A engenharia genética fornece uma ferramenta complementar aos melhoristas de *Musa* que hoje podem introduzir transgenes capazes de conferir resistência a bactérias, fungos e nematóides, ou melhorar seu potencial nutritivo. Países como a Austrália, Bélgica, Índia, Quênia, Malásia e Uganda têm se destacado pelo empenho nas pesquisas com engenharia genética nessa espécie (ORTIZ e SWENNEN, 2014).

A introdução de genes exógenos deve ser incorporada aos programas de melhoramento convencional de bananeiras e plátanos quando não há variação natural para o caráter estudado ou para a melhoria genética de cultivares estéreis. Empregar resistência induzida é uma das estratégias que consiste em aumentar a imunidade natural da planta e para isso, existem as defensinas que estão presentes nas plantas atuando no seu sistema de defesa (BURKETOVÁ et al., 2015). Nos vegetais as defensinas são compostas de pequenos peptídeos catiônicos ricos em cisteína que podem estimular o sistema imune da planta e inibir o desenvolvimento dos micro-organismos (MENEZES, 2009). As funções biológicas publicadas sobre defensinas de plantas incluem atividades antifúngicas, antibacterianas, proteinase e inibidores de amilase de insetos (NAWROT et al. 2014).

A primeira transformação genética utilizando uma defensina foi feita na batata, onde foi possível desenvolver uma planta com resistência ao fungo *Verticillium dahliae* (GAO et al, 2000). Estudos de Transformação genética, utilizando defensinas, estão sendo cada vez mais empregados. Em *Musa*, plantas transformadas com defensinas foram desenvolvidas com atividades antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (GHAG et al, 2012 e 2014).

Dada à relevância do estudo da bananeira, este trabalho teve como propósito adaptar a técnica do método *Scalp* no estudo de embriogênese somática em duas cultivares de banana (*Musa* spp. AAB), e induzir variabilidade genética por meio da mutagênese com o uso do agente químico EMS e da transformação genética.

REFERENCIAS

- AMORIM, E. P.; PESTANANA, R. K. N.; SILVA, S. O.; NETO, A. T. Caracterização agrônômica de mutantes de bananeira obtidos por meio da radiação gama. **Bragantia**, v. 71, n. 1, p. 8-14, 2012.
- BHAGWAT, B.; DUNCAN, E. J. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* using chemical mutagens. **Scientia Horticulturae**, v. 73, n. 1, p. 11–22, 1998.
- BIDABADI, S. S., MEON, S.; WAHAB, Z.; SUBRAMANIAM, S.; MAHMOOD, M. Induced mutations for enhancing variability of banana (*Musa* spp.) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS). **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 3, p. 391-401, 2012a.
- BIDABADI, S. S.; MAHMOOD, M.; MEON, S.; WAHAB, Z.; GHOBADI, C. Evaluation of *in vitro* Water Stress Tolerance among EMS – Induced Variants of Banana (*Musa* spp., AAA), Using “Morphological, Physiological and Molecular” Traits. **Journal Crop Science Biotechnology**. v. 14, n. 4, p. 255-263, 2011.
- BIDABADI, S. S.; MEON, S.; WAHAB, Z.; SUBRAMANIAM, S.; MAHMOOD, M. *In vitro* selection and characterization of water stress tolerant lines among ethyl methanesulphonate (EMS) induced variants of banana (*Musa* spp., with AAA genome). **Australian Journal of Crop Science** v. 6, n.3, p. 567-575, 2012b.
- BOUIZGARNE, B. et al. A Putative Role for Fusaric Acid in Biocontrol of the Parasitic Angiosperm Orobanche ramosa. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 5, p. 550–556. 2006.
- BURKETOVÁ, L.; TRDA, L.; OTT, P. G.; VALENTOVA, O. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens . **Biotechnology Advance**, v. 33, n. 6, p. 994-1004, 2015.
- CHEN, Y. R.; CHEN, W.; HUANG, X.; HU, X.; ZHAO, J. T.; GONG, Q.; LI, X. J.; HUANG, X. L. Fusarium wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-cross-section cultural system. **Plant Pathology**, v. 62, n.1, p. 112–119, 2013.
- CORDEIRO, Z. J. M. Doenças. In: ALVES, E. J. **A cultura da banana**. Aspectos Técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. 2 ed. Brasília: Embrapa-SPI/Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1999. p. 353-406.
- DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. O.; FILHO SOARES, W. S. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E. J. (org.) **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília, DF: Embrapa SPI; Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1997, p. 27-43.

DHED'A D. Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et régénération en plantules par embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain *Musa* spp. **Tropicultura**, v. 10, n. 4, p. 152-154, 1992.

ELAYABALAN, S.; KALAIMUGHILAN, K. Genetic engineering in Banana and Plantain. **Advancements in Genetic Engineering** v. 2, n. 2, p.1-4, 2013.

FAO/IAEA. **Mutant variety Darabase**. 2016. Disponível em: <[https://mvd.iaea.org/#!/Search?Criteria\[0\]\[val\]=banana](https://mvd.iaea.org/#!/Search?Criteria[0][val]=banana)> Acesso em: 30 maio, 2016.

FAOSTAT- **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division**. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 27. abril. 2017.

FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.711-716, 2001.

FLORES, P. S.; BRUCKNER, C. H. Raios gama na sobrevivência de maracujazeiro amarelo inoculados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae*. **Ciência Rural**, v. 144, n. 4, p. 639-644, 2014.

GAO, A.; HAKIMI, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y.; WOERNER, B. M.; STARK, D. M.; SHAH, D. M.; LIANG, J.; ROMMENS, C. M. T. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v. 18, n.12, p. 1307–1310, 2000.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of Fusarium Wilt resistance in transgenic banana plants. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. 1-11, 2012.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Transgenic banana plants expressing a *Stellaria media* defensin gene (Sm-AMP-D1) demonstrate improved resistance to *Fusarium oxysporum*. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 119, n. 2, p. 247–255, 2014.

HOLST-JENSEN, A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 1071–1082, 2009.

HESPOL-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, Genomics and the Future for Banana. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5. p. 1073-1084, 2007.

JAIN, S. M. *In vitro* mutagenesis in banana (*Musa* spp.) improvement. **Acta Horticulturae**, v. 879, n. 67, p. 605-614, 2010.

JANKOWICZ-CIESLAK, J.; HUYNH, O. A.; BRONZYNSKA, M.; NAKITANDWE, J.; TILL, B. J. Induction, rapid fixation and retention of mutations in vegetatively propagated banana. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 9, p. 1056–1066, 2012.

- KHALIL, S. M.; CHEAH, K. T.; PEREZ, E. A.; GASKILL, D. A.; HU, J. S. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. **Plant Cell Report**, v. 20, n. 12, p.1128-1134, 2002.
- KRISHNA, V. V.; KUMAR, K. G.; PRADEEPA, K.; KUMAR, S. E. S.; KUMAR, R. S. Biochemical markers assisted screening of *Fusarium* wilt resistant *Musa paradisiaca* (L.) cv. Puttabale micropropagated clones. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n.7, p. 531-542, 2013.
- KUMARI, A.; KUMAR, H. Association of nonpathogenic *fusarium oxysporum* species with cultured shoot apices of banana (*Musa acuminata*) cultivars. **The bioscan**, v. 10, n. 2, p. 629-633, 2015.
- LI, C.; et al. Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium f. sp. cubense*. **Plos One**, v. 8, n. 7. p. 1-11. 2013.
- MATSUMOTO, K.; BARBOSA, M. L.; SOUSA, L. A. C.; TEIXEIRA, J. B. Race 1 *Fusarium* wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. **Euphytica**, v. 84, n.1, p. 67–71, 1995.
- MAY, G. D.; AFZA, R.; MASON, H. S.; WIECKO, A.; NOVAK, F. J.; ARNTZEN, C. J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Bio/Technology**, v.13, n.5, p. 486-492, 1995.
- MENEZES, H. Imunidade inata e específica em plantas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, n. 2, p. 195-212, 2009.
- MUSOKE, C.; RUBAIHAYO, P. R.; MAGAMBO, M. Gamma Rays and Ethylmethane Sulphonate *In Vitro* Induced *Fusarium* Wilt Resistant Mutants in Bananas. **African Crop Science Journal**, v. 7, n. 4, p. 313-320, 1999.
- NAWROT, R.; BARYLSKI, J.; NOWICKI, G.; BRONIARCZYK, J.; BUCHWALD, W.; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, A. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 181-196, 2014.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015), OECD-FAO Agricultural Outlook 2015, OECD Publishing, Paris. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en> Acesso em: 10. Jan. 2016.
- OMAR, M. S.; NOVAK, F. J.; BRUNNER, H. *In Vitro* Action of Ethylmethanesulphonate on Banana Shoot Tips. **Scientia Horticulturae**, v. 40, n. 4, p. 283-295, 1989.
- ORTIZ, R.; SWENNEN, R. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. **Biotechnology Advances**, v. 32, n.1, p. 158–169, 2014.
- PARRY, M. A. J. et al. Mutation discovery for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 10, p. 2817–2825, 2009.

PERRIER, X. et al. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa spp.*) domestication. **PNAS**, v. 108, n. 28, p. 11311–11318, 2011.

PESTANA, R. K. N.; AMORIM, E. P.; SILVA, S. O.; NETO, A. T. Irradiação gama para mutagênese *in vitro* em bananeira 'Terra Maranhão'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.10, p.1328-1330, 2010.

REMOTTI, P. C.; Löffler, H. J. M.; VLOTEN-DOTING, L. V. Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus x grandiflorus* cv.'Peter Pears'. **Euphytica**, v. 96, n. 2, p. 237-245, 997.

RAI, M. K.; KALIA, R. K.; SINGH, R.; GANGOLA, M. P.; DHAWAN, A. K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n.1, p. 89-98, 2011.

RIBEIRO, L. O.; PAIVA, L. V.; PÁDUA, M. S.; EVANGELISTA, E. T. S.; SANTOS, B. R. Análise morfológica de calos de bananeira, cv. Prata anã, provenientes da cultura de meristemas. In: XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 2010, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2010.

RIBEIRO, L. O.; PAIVA, L. V.; PÁDUA, M. S.; SANTOS, B. R.; ALVES, E.; STEIN, V. C. Morfological and ultrastructural analysis of various types of banana callus, cv. Prata anã. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 4, p. 423-429, 2012.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; MORAIS, L. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, F. V. D.; KOBAYASHI, A. K.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. de O. e. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17, 2006, Joinville. Bananicultura: um negócio sustentável: **Anais...** Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. V. 1, p. 10-23.

SILVA, O. S.; 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 casual do mal do Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 137-143, 2011.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: Estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The Journal of the Society of London**, v. 55, n. 359, p. 302-312. 1955.

STROSSE, H.; SCHOOF, H.; PANIS, B.; ANDRE, E.; REYNIERS, K.; SWENNEN, R. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa spp.*). **Plant Science**, v. 170, n.1, p. 104–112, 2006.

SUPRASANNA, P.; MIRAJKAR, S. J.; BHAGWAT, S. G. Induced Mutations and Crop Improvement. In: Bahadur, B.; JARAM, M. V.; SAHIJRAM, L.;

KRISHNAMURTHY, K. V. **Plant Biology and Biotechnology**. India: Springer India, p. 593-617, 2015.

TENKOUANO, A.; SWENNEN, R. Progress in breeding and delivering improved plantain and banana to African farmers, **Chronica Horticulturae** v. 44, n. 1, p. 9–15, 2004.

YOKOMIZO, G. K. Aspectos do melhoramento genético da bananeira. In: DIAS, J. do S. A.; BARRETO, M. C. **Aspectos agronômicos, fitopatológicos e socioeconômicos da sigatoka-negra na cultura da bananeira no Estado do Amapá**. 1 ed. Versão digital. Macapá: Embrapa Amapá, 2011. p. 22-40.

CAPÍTULO 1¹

OTIMIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM CULTIVARES DE BANANEIRA (AAB) MAÇÃ E PACOVAN A PARTIR DO MÉTODO *SCALP*

¹ Artigo a ser submetido ao periódico Plant Cell, Tissue and Organ Culture

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o propósito de otimizar por meio do método *Scalp* a técnica de obtenção de calos *in vitro* em bananeira nas cvs. Maçã e Pacovan, e ajustar os processos de multiplicação de brotos, estruturas polimeristemáticas e de indução de calos na presença dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Os calos foram caracterizados e quantificados morfolologicamente quanto ao nível de oxidação, cor, tipo de textura e diferenciação celular. A cv. Pacovan apresentou características superiores na etapa de multiplicação de brotos, com média de 4,45 brotos/explante em comparação com 3,12 brotos/explante obtidos na cv. Maçã. Indução de estruturas polimeristemáticas foi obtida em maior intensidade na cv. Maçã com 3,52% de estruturas por explante. Também foi observada a formação de dois tipos de calos (compactos e friáveis) em ambas as cultivares, com valores médios acima de 90% de calos friáveis nas duas concentrações estudadas de 2,4-D (5 μ M e 10 μ M). No entanto, a resposta embriogênica foi obtida somente na cv. Pacovan, obtendo-se um valor médio de 78,2% de calos embriogênicos em meio contendo 10 μ M de 2,4-D. As estruturas polimeristemáticas formadas com apenas um mês de cultivo já são capazes de gerar calos friáveis e embriogênicos. A adaptação do método *Scalp* permitiu acelerar a formação de calos embriogênicos nas bananeiras (AAB) Maçã e Pacovan.

Palavras-chave: *Musa* spp, cultura de tecidos, embriogênese somática.

ABSTRACT

This work was carried out with the purpose of adapting the technique of getting callus *in vitro* in banana through method *Scalp* in Maçã e Pacovan cultivars and adjusts the multiplication processes of sprouts, meristematic structures and callus induction in the presence of growth regulators 6-benzylaminopurine (BAP) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Callus tissues were characterized morphologically and quantified the level of oxidation, color, texture type and cell differentiation. The cv. Pacovan showed superior characteristics in shoot multiplication stage with an average of 4.45 shoots/explant compared to 3.12 shoots/explant obtained in cv. Maçã. meristematic structures induction were obtained in larger quantities in cv. Maçã with 3.52% of structures per plant. Also it was observed the formation of two types of callus (compact and friable) in both cultivars, with mean values above 90% of friable callus in the two tested concentrations of 2,4-D (5 μ M and 10 μ M). However, the embryogenic response was obtained only on cv. Pacovan, with this, as a highest value, 78.2% of average frequency of embryogenic callus at concentration 10 μ M of 2,4-D. The adaptation of the *Scalp* method allowed accelerate the formation of somatic embryogenesis in banana trees (AAB) Maçã and Pacovan. The meristematic structures formed with only one month of culture are already able of generating friable and embryogenic callus.

Keywords: *Musa* spp, tissue culture, somatic embryogenesis.

1.1 INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) é uma das mais importantes espécies de frutos comestíveis do mundo, com 80% de sua produção localizada nos continentes Asiático e Americano. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana, com produção de 6,95 milhões de toneladas no ano de 2014, atrás, somente, da Índia, China e Filipinas (FAO, 2017).

Os problemas fitossanitários constituem a maior ameaça para a cultura da bananeira, haja vista o cultivo restrito de algumas cultivares susceptíveis às principais pragas da cultura, fato que resulta em severas perdas no rendimento, que podem alcançar 100% nos casos mais drásticos (LÉDO et al. 2008). As alternativas de controle apresentam-se pouco eficientes e de custo elevado, como ocorre na cultivar Maçã (grupo AAB), que é altamente suscetível ao mal do Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Smith) (BORGES et al. 2009), e na cultivar Pacovan, que além de sua média suscetibilidade ao mal do Panamá, ainda é vulnerável às Sigatokas negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) e amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach).

O principal obstáculo existente no processo do melhoramento convencional da bananeira é a esterilidade na maioria das variedades que está relacionada à triploidia e ausência de sementes. As bananas e plátanos cultivados diferem de seus parentes silvestres por serem sem sementes e partenocárpicas (HESLOP-HARRISON e SCHWARZACHER, 2007). Vale salientar que algumas cultivares que não produzem sementes quando polinizadas, ou aquelas que as produzem em pequena quantidade, podem ser tanto diploides quanto triploides (TENKOUANO e SWENNEN, 2004).

A integração da biotecnologia, nos programas de melhoramento genético, pode fornecer ferramentas poderosas para superar essa limitação, pela introdução de alterações genéticas específicas que podem diminuir o tempo gasto nas etapas do melhoramento (KHALIL et al. 2002). Nesse caso, o uso da técnica de transformação genética constitui uma das estratégias adicionais para uso nesses programas. Contudo, para que esta tecnologia possa ser aplicada, é necessário que haja um sistema de cultivo *in vitro* eficiente. Dentre esses sistemas, a embriogênese

somática, se eficientemente desenvolvida, pode permitir a obtenção de inúmeros propágulos a partir de um pequeno número de explantes (FILIPPI et al. 2001).

Estas técnicas requerem métodos confiáveis de obtenção de plantas de bananeira, sejam a partir de calos embriogênicos ou de suspensões celulares (KHALIL et al. 2002; HOULLOU-KIDO et al. 2005), cultura de meristemas (RIBEIRO et al. 2012), inflorescência masculina (HOULLOU-KIDO et al. 2005; MORAIS-LINO et al. 2008; ELAYABALAN et al. 2013 e YOUSSEF et al. 2010), e partes do rizoma (SHIRANI et al. 2010).

O método *Scalp* baseia-se em culturas de meristemas iniciadas a partir de brotos apicais, onde camadas superficiais de aproximadamente 3 mm (*scalp*) são excisados e cultivadas em meio de indução de calos. A técnica foi descrita pela primeira vez por Dhed'a (1992). Strosse et al. (2006) adaptaram esse método para desenvolver suspensões celulares embriogênicas derivadas de tecidos meristemáticos de brotos. Esses autores demonstraram que é possível aplicar o método *Scalp* para o estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas em um grande número cultivares de bananas e plátanos e que a principal vantagem deste procedimento é a independência de acesso em campo, ao contrário da maioria dos outros métodos.

Entretanto, apesar de eficiente, não há relatos sobre a utilização ou adaptação da técnica para cultivares Maçã e Pacovan de bananeira. Dessa forma, o presente trabalho tem como propósito avaliar o efeito do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na indução e formação de calos embriogênicos obtidos pelo método *Scalp* nas cultivares de banana Maçã e Pacovan.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Foi utilizado como explante brotos de plantas das cultivares Pacovan Maçã armazenadas *in vitro* em meio de manutenção, preparado de acordo com a formulação de sais inorgânicos e vitaminas MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 8,88 μM 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidone (PVP), 30 g L⁻¹ de sacarose, e solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar. Antes da autoclavagem, a 121 °C por 25 minutos, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9.

Em seguida, foram realizados dois experimentos interligados, sendo um referente a indução e multiplicação de estruturas polimeristemáticas, e o outro referente a indução de calos. O método *Scalp* foi adotado na realização desses experimentos seguindo a metodologia de Strosse et al. (2006) com adaptações na redução do tempo de cultivo, na fase de multiplicação, das estruturas polimeristemáticas.

1.2.1 Indução e multiplicação de estruturas polimeristemáticas

Para indução e multiplicação celular de estruturas polimeristemáticas, brotos obtidos das plantas estoque, foram inoculados em potes plásticos contendo 50 mL de meio cultura, P5, composto por sais e vitaminas MS suplementado com 10 μM de BAP, 1 μM de ácido indolacético (AIA), 0,1 g L⁻¹ de PVP, 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 5 g de ágar, sendo o pH ajustado para 6,2, antes da autoclavagem, conforme descrito por Strosse et al. (2006). As condições da sala crescimento, para as duas etapas citadas, foram controladas com temperatura entre 25 °C e 27 °C, umidade relativa de 60% e fotoperíodo de 16 horas. Após dois meses de cultivo os explantes foram avaliados, anotando-se as médias do número de brotos (MNB) e comprimento dos brotos (MCB) produzidos por explante.

Os brotos obtidos nessa etapa, com comprimento de aproximadamente 5 mm, foram individualizados e cultivados em meio de cultura P4, modificado apenas pela elevação da concentração de BAP para 100 μM , sendo mantidos no escuro por um

mês. Após esse período, realizou-se a avaliação do número médio (EPM) e comprimento médio (CEPM, em mm) das estruturas polimeristemáticas formadas por explante inoculado para as duas cultivares.

1.2.1.2 Análise histológica das estruturas polimeristemáticas

Análises histológicas das estruturas polimeristemáticas foram realizadas a partir de cortes das regiões central, lateral e superficial do tecido meristemático vegetal. Os cortes foram corados com Carmum Acético 2% e, em seguida, foram analisados com auxílio de um microscópio óptico (*Coleman*) sob a observação nas objetivas de 4x, 10x e 40x. O registro das imagens foi realizado com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, com sistema de captura de imagens integrado.

1.2.2 Indução e formação de calos

As estruturas com múltiplos meristemas, obtidas na fase escura de cultivo e com comprimentos padronizados de aproximadamente 5 mm, foram excisadas em duas partes com um corte central no sentido longitudinal, com o objetivo de quebrar a dominância apical. Posteriormente, os explantes foram transferidos para um meio de indução de calos (meio ZZ), composto por sais e vitaminas MS suplementado com 5 μM ou 10 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,1 g L⁻¹ de PVP, 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar, pH de 6,2, e foram cultivados no escuro.

Após um mês de cultivo avaliou-se, por observação visual, a oxidação dos explantes, atribuindo-se uma escala percentual de notas de oxidação para 5 tipos de classes (A- 0% a 20%; B- 21% a 40%; C- 41% a 60%; D- 61% a 80% e E- 81% a 100% de oxidação). Aos dois meses de cultivo, os calos foram avaliados quanto a: **cor**, conforme a Tabela de classificação de cores de Munsell (Munsell, 1977); **sobrevivência**; **número**; e **tipo** (compactos, friáveis, e/ou embriogênicos), conforme observação visual de diferenciação do calo.

1.2.3 Análises dos dados

Tanto na fase de multiplicação de brotos quanto na de multiplicação de estruturas polimeristemáticas foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado - DIC, com dois tratamentos e 30 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade pelo teste F. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SAS 9.2 (SAS Institute, 2009).

A etapa de indução de calos foi realizada em DIC, com duas cultivares (Pacovan e Maçã) e duas concentrações (5 μM e 10 μM de 2,4-D), totalizando quatro tratamentos com 20 repetições por tratamento.

As porcentagens das diferentes respostas *in vitro*, associadas com as variáveis mencionadas, foram calculadas com base em suas respectivas médias de acordo com as seguintes fórmulas:

- N de explantes por classe (a, b, c, d ou e) x 100 / N_0 de explantes;
- N_F de explantes sobreviventes x 100 / N_0 de explantes;
- N de calos formados x 100 / N_F de explantes;
- N de calos compactos x 100 / N_F de explantes;
- N de calos friáveis x 100 / N_F de explantes;
- N de calos embriogênicos x 100 / N de calos friáveis.

Onde N: número de explantes, N_0 : inicial de explante e N_F o número final de explantes.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento de multiplicação de brotos são apresentados na Tabela 1. Observa-se que não houve diferença significativa para variável comprimento médio dos brotos, cujos valores foram de 4,15 mm e 4,75 mm nas cultivares Maçã e Pacovan, respectivamente. Para a variável número médio de brotações houve diferença significativa, destacando-se a cv. Pacovan com uma taxa média de 4,45 brotações por planta, quando comparada com a cv. Maçã que obteve 3,12 brotações.

TABELA 1: Número médio de brotos (MNB/explante) e média do comprimento de brotos (em mm) (MCB/explante) de bananeiras das cvs. Maçã e Pacovan cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com 10 μ M de benzilaminopurina (BAP) aos dois meses de cultivo.

Cultivar	BAP (10 μ M)	
	MNB	MCB ^{NS}
Maçã	3,12 B	4,15 A
Pacovan	4,45 A	4,75 A
CV (%)	20,4	39,3

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a $p > 0,01$ de probabilidade, ^{NS} não significativo.

O genótipo é um fator muito importante na técnica de cultura de tecidos, pois pode interferir significativamente na taxa de multiplicação das diferentes cultivares como observado nas bananeiras. Para maximizar a eficiência do cultivo *in vitro* na multiplicação de plantas é necessário ajustar as metodologias de acordo com a cultivar a ser estudada, pois as pequenas diferenças observadas na capacidade de proliferação entre os tratamentos podem estar associadas à interação genótipo e citocinina (COSTA et al. 2006).

No presente trabalho, variação nessa interação foi observada para o número médio de brotações em função da concentração da citocinina (10 μ M de BAP), onde embora as duas cultivares pertençam ao mesmo grupo genômico (AAB), foi possível observar um comportamento de crescimento diferente entre elas, onde a cv. Pacovan apresentou média de multiplicação cerca de 45% maior do que a da cv.

Maçã (Figura 1- A e B). Este resultado corrobora o estudo de Lima e Moraes (2006), que também encontraram variações na taxa de multiplicação em diferentes genótipos de bananeira, a exemplo as cvs. Thap maeo (AAB) e Caipira (AAA), com taxas médias de multiplicação de 3,12 e 3,60, respectivamente, em meio contendo concentrações de BAP semelhantes às deste estudo. Por outro lado, os resultados obtidos foram maiores que o obtido por Oliveira et al. (2011), para as cvs. Caipira (2,40 brotos/explante) e Thap maeo (2,81 brotos/explante) com mesmo processo de micropropagação.

Na etapa de multiplicação de estruturas polimeristemáticas foi possível obter cultivos de tecidos meristemáticos mais homogêneos com o aumento da concentração de BAP para 100 μ M (meio P4) e na ausência de luz, o que reduziu a diferenciação desse tecido em rizomas e folhas, conforme relatado também por Strosse et al. (2006). Para essa etapa, foi necessário apenas um cultivo neste meio para obtenção e multiplicação dessas estruturas polimeristemáticas, diferentemente do processo relatado por Strosse et al. (2006), que realizaram entre 7-11 subcultivos em meio P4 para variedades do mesmo grupo genômico (AAB) aqui estudadas. Esse fator foi muito relevante, pois reduz significativamente o tempo de cultivo, assim como, os custos de manutenção.

De forma diferente da fase de multiplicação de brotos, a cv. Maçã obteve a maior média de formação de estruturas polimeristemáticas (EPM), com valores médios de 3,5 meristemas/explante, em relação à cv. Pacovan que apresentou 2,2 meristemas/explante (Tabela 2 e Figura 1- C e D). No entanto, o mesmo não aconteceu para a variável CEP, onde se obteve uma diferença significativa no crescimento das estruturas polimeristemáticas da cv. Pacovan, com comprimento médio de 5,57 mm, enquanto a cv. Maçã formou estruturas com comprimentos médios de apenas 2,82 mm. Porém, considerou-se a resposta na cv. Maçã como mais eficiente para multiplicação dessas estruturas, quando comparada a da cv. Pacovan, devido ao seu maior número de multiplicação de estruturas polimeristemáticas e ao seu menor comprimento, já que o alongamento dessas estruturas indicam diferenciação do tecido, sendo este indesejado para o processo de indução de calos (Tabela 2, Figura 1 E e F).

TABELA 2: Número médio de estruturas polimeristemáticas/explante (EPM) e comprimento médio das estruturas polimeristemáticas/explante (CEPM, em mm) das cvs. Maçã e Pacovan cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com 100 μ M de benzilaminopurina (BAP), após um mês de cultivo na ausência de luz.

Cultivar	BAP 100 μ M ¹	
	EPM	CEPM
Maçã	3,52 A	2,82 B
Pacovan	2,20 B	5,57 A
CV (%)	18,9	23,9

¹Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a $p > 0,05$.

A mudança no comportamento de multiplicação *in vitro* entre as cultivares após o aumento da concentração de BAP e cultivo na ausência de luz, mostrou que a cv. Maçã teve um aumento significativo como resposta para indução de novos brotos. Isto pode estar relacionado, principalmente, ao fator oxidativo de compostos fenólicos liberados pelo tecido injuriado durante a manipulação (VAN WINKLE et al. 2003), os quais interferem negativamente na taxa de multiplicação dos explantes (OLIVEIRA et al. 2001). A presença da luz também pode ter favorecido a produção desses compostos, que interferem na atuação do regulador, o que justificaria a mudança do comportamento de multiplicação entre as cultivares na fase de cultivo no escuro, haja vista que entre as duas cultivares estudadas, a Maçã é a que apresenta mais transtornos com oxidação.

Vale destacar que os valores moderadamente elevados dos coeficientes de variação observados se explicam devido à complexidade da padronização dos explantes utilizados, que resultaram do desenvolvimento de estruturas com muitas variações, principalmente, em forma e tamanho. Essa hipótese também foi admitida por Oliveira et al. (2001), que obtiveram um CV mínimo de 21% no estudo de concentrações de BAP na eficiência de micropropagação de bananeira. Da mesma forma, valores de CV de cerca de 17,6% foram obtidos por Camolesi et al. (2007), ao estudarem a propagação *in vitro* da bananeira Maçã, como também, por Oliveira et al. (2011), na avaliação da multiplicação de cinco cultivares bananeira, onde foi encontrado variação no CV de 15% a 30%.

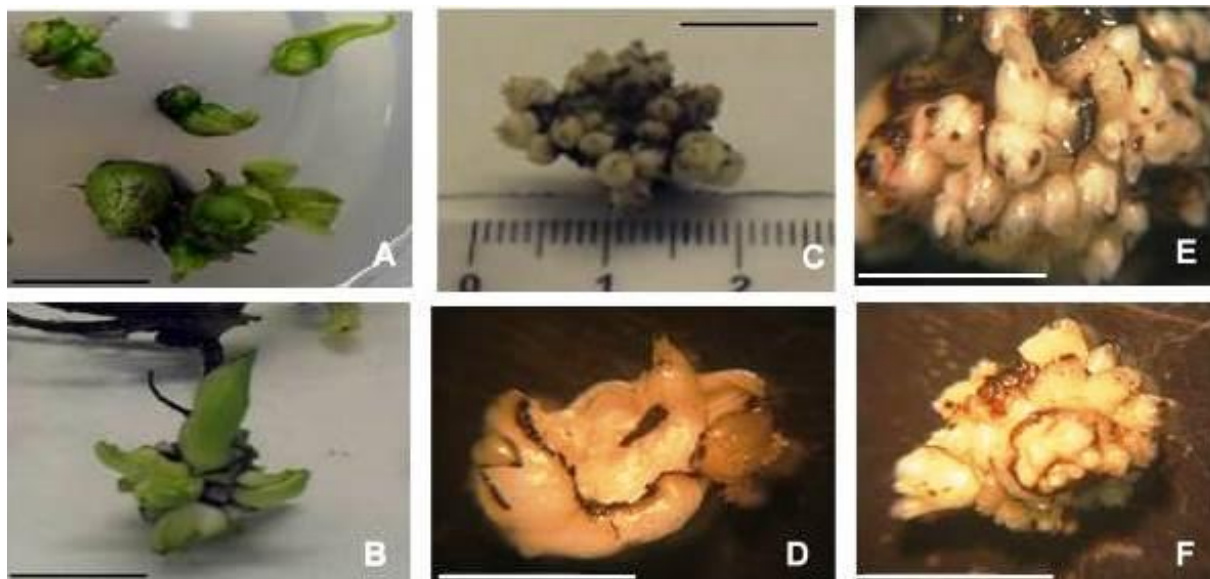


FIGURA 1: Respostas da multiplicação *in vitro* de duas cultivares de bananeira do grupo AAB ao uso de benzilaminopurina (BAP) na presença ou ausência de luz. (A) e (B) brotos das cvs. Maça e Pacovan aos 60 dias de cultivo em meio P5, suplementado com 10 μ M de BAP na presença de luz, respectivamente. (C) e (E) estruturas polimeristemáticas da cv. Maça e (D) e (F) da cv. Pacovan, 30 dias após a transferência para o meio P4 suplementado com 100 μ M de BAP e cultivadas no escuro. Escala = 1 cm.

Na Figura 2 é possível observar a análise histológica das estruturas polimeristemáticas aos 30 dias de cultivo em meio P4 (100 μ M de BAP) da cv. Maça. Nos cortes histológicos, verificou-se a presença de células pequenas e organizadas, com formatos isodiamétricos e com intensas divisões celulares, indicando a formação de centros meristemáticos (Figura 2- B, C e D). O corte realizado na parte mais superficial do explante evidenciou um maior número de centros meristemáticos, os quais se expandem para a região lateral da estrutura, onde irão emergir em forma de protuberâncias que, possivelmente, formarão brotos laterais em seu curso normal de desenvolvimento (crescimento e diferenciação celular) (Figura- E e F, respectivamente). Para Ribeiro et al. (2012) o formato isodiamétrico dessas células é característico de células meristemáticas. Trevizam et al. (2011) observaram ainda que células isodiamétricas e com relação núcleo-citoplasma elevada, revelam intensa atividade meristemática e elevada indiferenciação celular.

O desenvolvimento das estruturas polimeristemáticas derivadas de pequenos brotos é atribuído a uma acelerada metabolização da citocinina (BAP) utilizada, que em concentração elevada proporcionou um grande aumento nas divisões celulares,

conseqüentemente, com obtenção de um maior número de centros meristemáticos, que se tornaram em estruturas ricas em células meristemáticas.

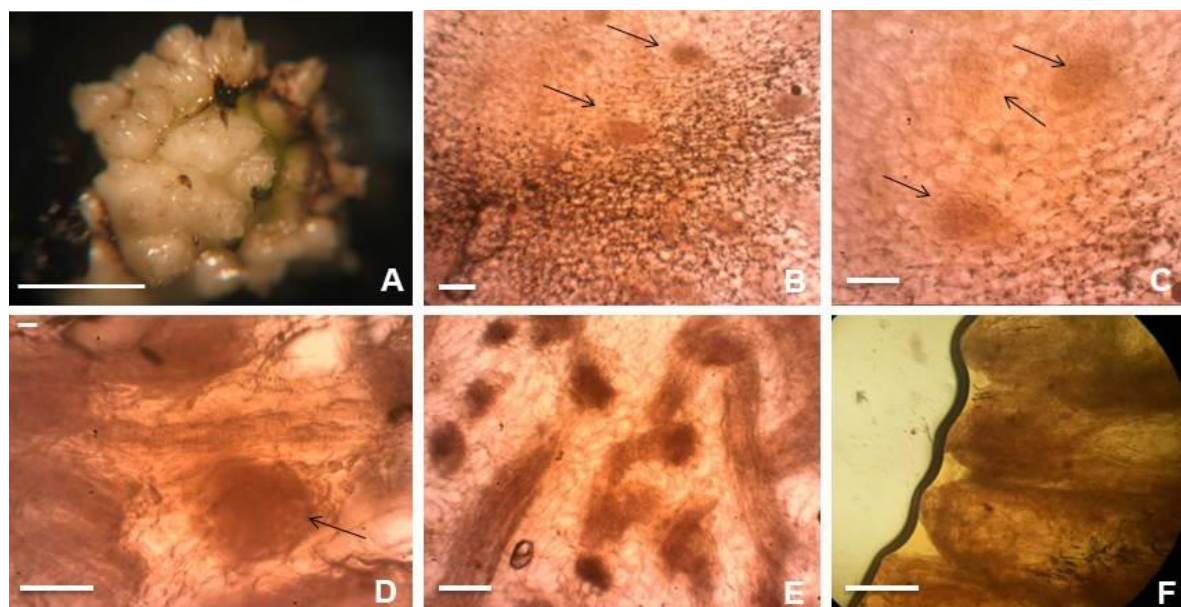


FIGURA 2: Análise histológica das estruturas polimeristemáticas de Bananeira cv. Maçã cultivada em meio MS suplementado com 100 μM de BAP. (A) aspecto morfológico externo das estruturas polimeristemáticas, (B) corte anatômico dessas estruturas, aspecto geral; (C) centros meristemáticos mostrando células pequenas em maior ampliação; (D) detalhe do centro merismático; (E) corte na parte mais superficial do explante e F: detalhe da região lateral do explante. Barra em A escala a 1 cm. Barra em B, C, D, E e F corresponde a 700 μm .

Em relação ao regulador de crescimento 2,4-D, os resultados mostraram que os valores percentuais aumentaram em função da relação: oxidação x 2,4-D, independente da cultivar estudada. No entanto, o nível de oxidação foi bem menor na cv. Pacovan, considerando-se as duas concentrações (5 μM e 10 μM) de 2,4-D avaliadas (Figura 3).

Alguns estudos indicam que a intensidade da atividade oxidativa dos polifenóis está relacionada ao genótipo. Strosse et al. (2003), por exemplo, afirmaram que os compostos fenólicos inibem o crescimento e diferenciação de tecido do calo. Esses compostos resultam do estresse causado principalmente pela competição celular por nutrientes e espaço. O grau de escurecimento de calos parece variar dependendo da composição dos meios. Além disso, o grau de exsudação de compostos fenólicos e o escurecimento resultante também podem ser

afetados pelos promotores de crescimento e as suas concentrações, sendo dependentes também da cultivar.

Aos dois meses de cultivo os calos foram avaliados ainda quanto à cor, sobrevivência, número e tipos (compactos, friáveis, e/ou embriogênicos). Os dados percentuais de número de calos formados não foram analisados estatisticamente devido à invariabilidade dos tratamentos avaliados, pois houve 100% de formação de calos em todos eles.

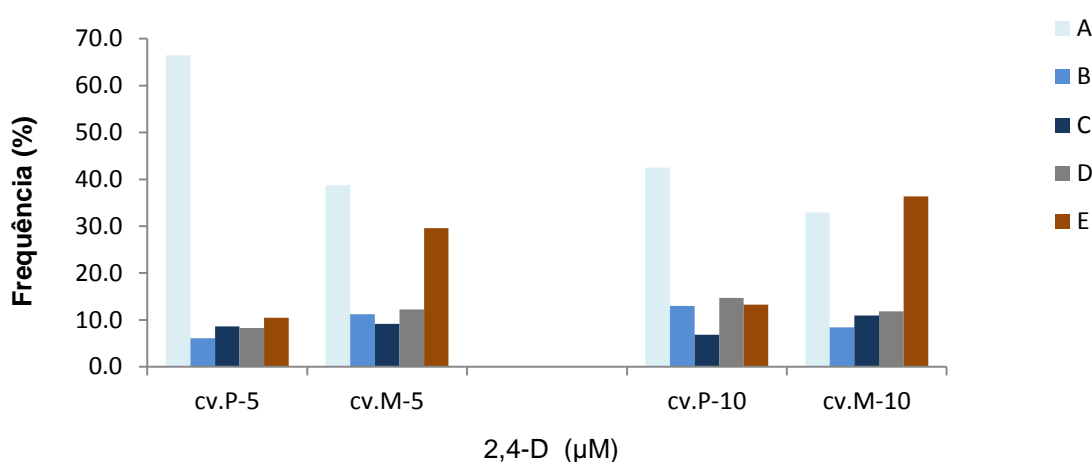


FIGURA 3: Distribuição de frequência (%) de classes de níveis de oxidação para a interação entre calos e concentrações de 2,4-D (5 µM e 10 µM), calos de bananeiras cvs. Maçã e Pacovan, aos 30 dias de cultivo *in vitro* no escuro. A) 0–20%; B) 21-40%; C) 41-60%; D) 61-80%; E) 81-100% de oxidação dos calos. cv: cultivar; P: Pacovan. M: Maçã. 5: 5 µM. 10: 10 µM.

A percentagem de sobrevivência dos calos revelou que para a cv. Maçã, apenas 56% e 53,5% dos calos sobreviveram nas concentrações (5 µM e 10 µM) de 2,4-D, respectivamente. Por outro lado, a cv. Pacovan apresentou alta porcentagem de sobrevivência, com 94,5% e 93,7% nas mesmas concentrações. Nota-se ainda que, isoladamente, houve pouca variação nas concentrações testadas para as duas cultivares. Entretanto, quando comparadas entre si, a cv. Pacovan mostrou melhor taxa de sobrevivência, independente da concentração utilizada (Tabela 3).

TABELA 3: Percentagens de sobrevivência de calos de bananeiras das cultivares Maçã e Pacovan, em resposta a duas concentrações de 2,4-D (5 μ M e 10 μ M), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio ZZ sob a condição de ausência de luz (escuro).

Cultivar	Sobrevivência (%) ¹	
	5 μ M ^{NS}	10 μ M ^{NS}
Pacovan	94,55 A a	93,71 A a
Maçã	56,01 B a	53,53 B a

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si estatisticamente pelo teste F a $p > 0,05$ de probabilidade, ^{NS} não significativo.

Os reguladores de crescimento desempenham importante função na indução de calos, estando também relacionados à sobrevivência dos explantes. XU et al. (2004), por exemplo, estudaram os fatores que afetam a indução de calos de bananeiras do grupo (AAA), e concluíram que o aumento da concentração de 2,4-D elevou a percentagem de morte dos explantes, sendo cerca de duas vezes maior na concentração de 8 mg (36,2 μ M) de 2,4-D, do que a obtida em 4 mg (18,1 μ M) de 2,4-D.

Resultados semelhantes também foram obtidos para outros grupos genômicos como os genótipos 'Ingarama' (AAA-h), 'Calcutta-4' (AA) e 'Orishele' (AAB), onde a quantidade de explantes sobreviventes foi reduzida consideravelmente para até menos da metade do número total de explantes cultivados, em meio contendo 20 μ M de 2,4-D (STROSSE, 2006). Entretanto, os resultados observados, nesse estudo, não mostraram aumento da percentagem de mortalidade com o aumento da concentração de 2,4-D dentro do genótipo, mas essa redução existe quando a comparação foi feita entre as cultivares Pacovan e Maçã, apesar de pertencerem ao mesmo grupo (AAB). Isso talvez seja devido às concentrações de 2,4-D testadas que foram de apenas 5 μ M e 10 μ M, quando comparadas àquelas com variações maiores, utilizadas por XU et al. (2004) e Strosse et al. (2006).

Os calos apresentaram muitas variações de cores, que de acordo com escala Munsell foram transparentes a cinza claro (2.5Y -8/2); creme (2.5Y -8/4); amarelo-claro (2.5Y -8/6); creme-escuro (2.5Y -7/4); amarelo-escuro (2.5Y -7/6); marrom-claro (2.5Y -6/4); marrom (2.5Y -6/6) e branco. Nesse caso, os calos transparentes e cinza-claros apresentaram características de maior nível de friabilidade; os de cor creme e tons de amarelo, um maior potencial embriogênico, enquanto os brancos

apresentaram-se mais compactos. As demais cores também se mostraram como friáveis, porém em menor intensidade que a anterior. De uma maneira geral, os tons mais escuros são devidos provavelmente aos diferentes níveis de oxidação dos explantes.

Todos os explantes que sobreviveram formaram calos compactos ou friáveis, podendo esses últimos ser potencialmente embriogênicos. Na Tabela 4, observa-se que os explantes de bananeira Maçã não formaram calos compactos brancos em nenhuma das concentrações de 2,4-D avaliadas, enquanto nos da cv. Pacovan formaram 5,38% e 2,97% de calos compactos nas concentrações de 5 μM e 10 μM , respectivamente (Figura 4- E).

Youssef et al. (2010) também obtiveram valores baixos ou inexistentes de calos compactos brancos nas cvs. Williams (1,1%) e Grande Naine (0,0%) do grupo (AAA), ao estudarem a influência do genótipo na embriogênese somática, a partir de tecidos de inflorescência em meio contendo 4,5 μM de 2,4-D.

As duas cultivares apresentaram valores médios altos de formação de calos friáveis nas duas concentrações de 2,4-D estudadas, sendo de 94,62% e 97,03% para a cv. Pacovan e de 100% na cv. Maçã.

Entre os calos friáveis, ainda foi possível observar a existência de uma variação em relação ao nível de friabilidade: tipo I (aquoso +++ e translúcido) e tipo II (aquoso ++) (Figura 4- A, B, C e D). Na cv. Maçã não houve friabilidade tipo I dos calos em função das concentrações de 2,4-D, embora ambas cultivares tenham apresentado baixas ocorrências desse tipo de calo. Os calos friáveis tipo I tiveram uma representação mais expressiva na bananeira Pacovan para a concentração mais reduzida do regulador.

O nível de friabilidade indica que, quanto mais o calo for aquoso, melhor será a individualização de suas células no processo de suspensões celulares. Dessa forma, a concentração 5 μM de 2,4-D seria a mais indicada para essa estratégia de trabalho na cv. Pacovan. Para Strosse et al. (2006), a formação desse tipo calo, também chamado de “calo ideal”, é bastante reduzida na cv. Orishele (AAB), cujos valores obtidos pelos autores foram de 2% e 9%, nas concentrações de 5 μM e 10 μM de 2,4-D, respectivamente.

Essa tendência, entretanto, não é observada em todas as cultivares do grupo (AAB). Ribeiro et al. (2012), por exemplo, realizaram análises morfológica e estrutural de vários tipos de calos na cv. Prata anã (AAB) e concluíram que os calos

aquosos e translúcidos não mostraram morfologia ou citologia de calos embriogênicos.

A formação de calos friáveis tipo II predominou nas duas cultivares estudadas, sendo mais expressiva na cv. Maçã, independentemente das concentrações de 2,4-D. Esse tipo de calos, menos aquoso que o anterior e de cor creme ou de tons de amarelo, mostraram resultados morfogênicos distintos entre as cultivares. Na cv. Maçã a morfologia não apresentou aspectos de diferenciação celular. Na cv. Pacovan, ao contrário, esse tipo de calo apresentou tendência de diferenciação embriogênica (FIGURA. 4-D). Nesse caso, mesmo com pouca diferença entre as concentrações, a maior concentração de 2,4-D foi a que mais contribuiu para a formação de calos embriogênicos.

TABELA 4: Caracterização morfológica de calos de bananeiras (AAB) das cultivares Pacovan e Maçã quanto às percentagens de calos compactos (C), friáveis (F) e embriogênicos (E) aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Meio de cultura ZZ	Número e tipos de calos formados (%) por cultivar			
	Pacovan		Maçã	
5 μ M	353		181	
	C	F	C	F
	19 (5,38%)	334 (94,62%)	0 (0,00%)	181 (100%)
		E 222 (66,47%)		E 0 (0,00%)
10 μ M	337		180	
	C	F	C	F
	10 (2,97%)	327 (97,03%)	0 (0,00%)	180 (100%)
		E 256 (78,27%)		E 0 (0,00%)

Alguns estudos correlacionaram marcadores morfológicos de coloração dos calos com o potencial embriogênico das células, por exemplo, Ribeiro et al. (2012), concluíram que os calos contendo grandes grupos amarelos de células apresentavam alto potencial embriogênico. No entanto, essas características morfológicas necessariamente não apontam para uma capacidade embriogênica. Nesse caso, os calos com grupos menores de células de cor amarela também

apresentaram morfologia de calos embriogênicos. O mesmo ocorreu no presente trabalho, em que os calos em tons de amarelo e creme desenvolveram grupos de células que posteriormente tornaram-se embriões.

A quantificação dos calos (Tabela 4) permitiu observar na cv. Pacovan que, na concentração de 10 μM de 2,4-D, houve um percentual de 78,27% de calos embriogênicos, enquanto na de menor concentração (5 μM) resultou em 66,47% de formação. Ambas as concentrações de 2,4-D induziram a formação de embriões somáticos nos estádios de desenvolvimento globular e torpedo em calos com tons de creme e amarelo (Figura. 4- F, G, H e I). De uma forma diferente, na cv. Maçã não desenvolveu esse tipo de calo em nenhuma das concentrações avaliadas.

Elayabalan et al. (2013) obtiveram 53,3% de calos embriogênicos em bananeiras do grupo (AAB), induzidos em meio MS com aproximadamente 10 μM de 2,4-D. Youssef et al (2010), por sua vez, em bananeiras do grupo (AAA) cultivadas em meio com 4,5 μM de 2,4-D, obtiveram apenas 10% e 2,4% de calos embriogênicos nas cvs. Williams e Grande Naine, respectivamente. Portanto, os resultados obtidos para cv. Pacovan, no presente trabalho, são satisfatórios para esse caráter.

Por outro lado, conforme ocorreu neste estudo, alguns relatos mostraram que variação da frequência de obtenção de calos com células embriogênicas em bananeira não depende somente do grupo genômico, mas também podem ocorrer variações entre cultivares, dentro do mesmo grupo, com variação de um ensaio para outro (KHATRI et al. 2005; STROSSE et al. 2006; XU, et al. 2008).

XU et al. (2008), afirmaram que a maior restrição para o estabelecimento de suspensão de células embriogênicas é a dificuldade de se obter material ideal em quantidades suficientes. Nesse caso, estudos que melhorem significativamente a porcentagem de indução de calos embriogênicos podem contribuir para o avanço no sistema de desenvolvimento da embriogênese somática em bananeira, fortalecendo os trabalhos sobre melhoramento genético por meio da biologia celular e biotecnologia.

Os resultados obtidos permitem afirmar que as adaptações na redução do tempo de cultivo na fase de obtenção de estruturas polimerísticas, do método *Scalp* foram eficientes, com valores significativos para obtenção de calos friáveis e embriogênicos, respectivamente, nas cultivares de bananeira Maçã e Pacovan, podendo assim, ser uma alternativa ao método que utiliza flores masculinas

imaturas, o que condiciona a instalação de acessos em campo e à época de floração.

Foi possível também mostrar que calos, com esse método, podem ser obtidos com apenas um ciclo (um mês) de cultivo *in vitro* em meio P4, e um ciclo (2 meses) em meio ZZ, e, como consequência, reduzir o tempo de obtenção de calos, diferentemente da metodologia descrita por Strosse et al. (2006), com a utilização dos *scalps*, ou a que utiliza a inflorescência como explantes, cuja etapa inicial de obtenção de calos embriogênicos pode levar em média seis meses.

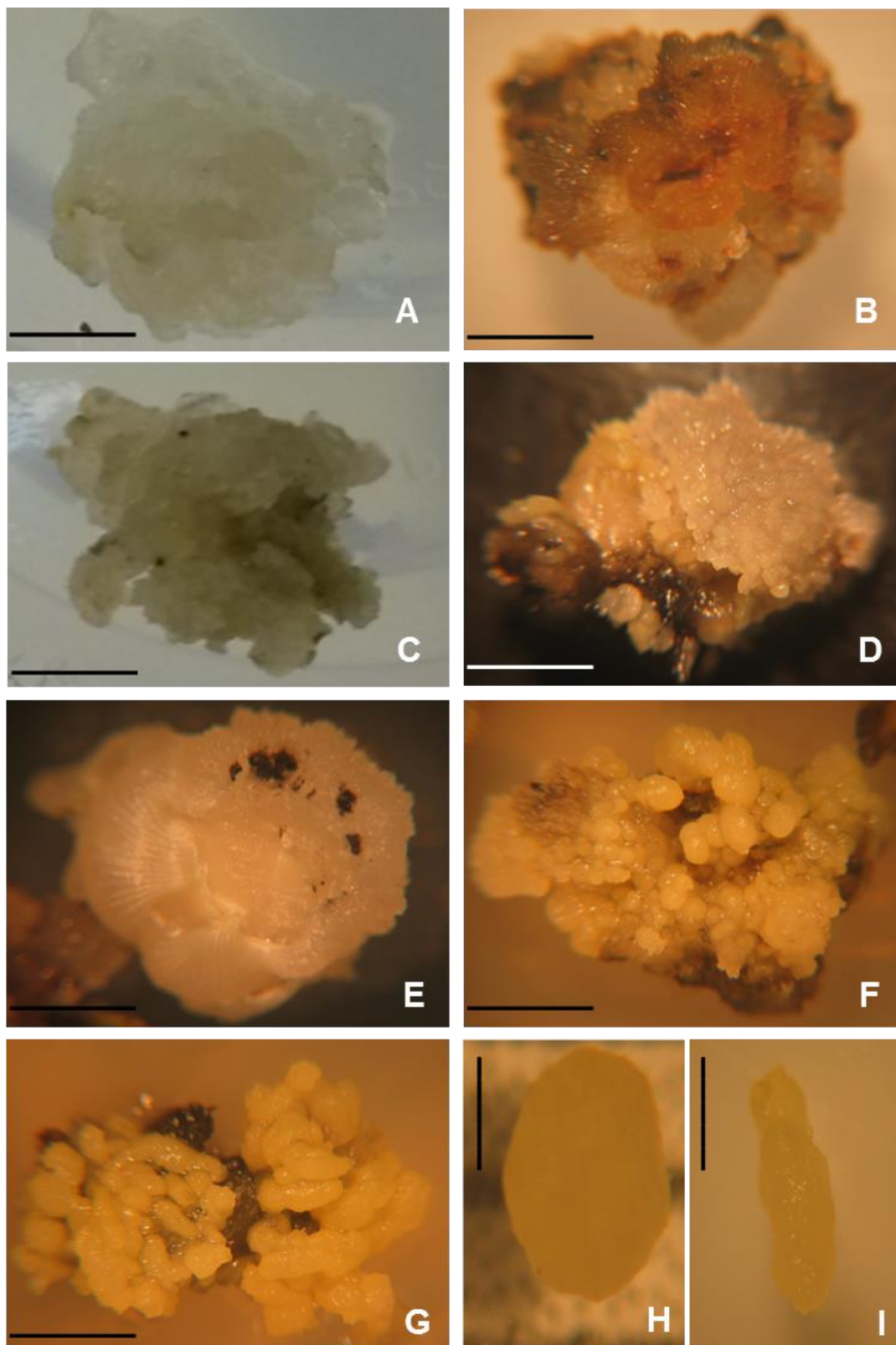


FIGURA 4: Resposta *in vitro* da indução de calos em *Musa* spp. (A) e (B) formação de calos frágeis na cv. Maçã utilizando 5 μ M e 10 μ M de 2,4-D, nessa ordem; (C) e (D) calos frágeis na cv. Pacovan tipo I (5 μ M) e tipo II (10 μ M), respetivamente; (E) calo compacto; (F) e (G) calos embriogênicos da cv. 'Pacovan', (5 μ M e 10 μ M) na ordem; (H) e (I) embriões somáticos nos estádios de desenvolvimento globular e torpedo (5 μ M e 10 μ M), respetivamente. Barras de 1 cm de A a G e de 1 mm em H e I.

1.4 CONCLUSÕES

- A metodologia *Scalp* é eficiente na indução de calos friáveis em bananeiras das cultivares Maçã e Pacovan em menor tempo de cultivo, com isso é possível reduzir os riscos de variações nos explantes e os custos no processo de obtenção de calos.

- A avaliação histológica das estruturas polimeristemáticas confirmou a existência de vários centros meristemáticos;

- As estruturas polimeristemáticas formadas em apenas um mês de cultivo já são capazes de gerar calos friáveis e embriogênicos na cv. Pacovan, acelerando o processo de obtenção de calos dentro do método *Scalp*;

- Somente a cultivar Pacovan desenvolveu calos embriogênicos na presença do regulador 2,4-D, obtendo-se até 78% desses calos na concentração de 10 μM ;

- Calos friáveis com aparência de cor amarelo-claros têm maior potencial de se tornarem embriogênicos.

REFERÊNCIAS

- BORGES, A. L.; SILVA, A. L.; BATISTA, D, da C.; MOREIRA, F. R. B.; FLORI, J. E.; OLIVEIRA, J. E. de M.; ARAÚJO, J. L. P.; PINTO, J. M.; CASTRO, J. M. C.; MOURA, M. S. B.; AZOLBEL, P. M.; CUNHA, T. J. F.; SILVA, S. O.; CORDEIRO, Z. J. M. **Sistema de Produção da Bananeira Irrigada**. Petrolina, 2009. Embrapa Semiárido, Versão eletrônica. Jul/2009. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 20 jan.2016.
- CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONE, C. G.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira Maçã. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007.
- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado em 6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA) **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.
- DHED'A D. Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et régénération en plantules par embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain *Musa* spp. **Tropicultura**. v. 10, n. 4, p. 152-154, 1992.
- ELAYABALAN, S.; KALAIPONMANI, K.; PILLAY, M.; CHANDRASEKAR, A.; SELVARAJAN, R.; KUMAR, K. K.; BALASUBRAMANIAN, P. Efficient regeneration of the endangered banana cultivar 'Virupakshi' (AAB) via embryogenic cell suspension from immature male flowers. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 563-569, 2013.
- FAOSTAT- **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division**. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 27. abril. 2017
- FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, Genomics and the Future for Banana. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1073-1084, 2007.
- HOULLOU-KIDO, L. M.; KIDO, E. A.; FALCO, M. C.; FILHO, M. C. S.; FIGURAUEIRA, A. V. O.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; NETO, A. T. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 40, n.11, p.1081-1086, 2005.
- KHALIL, S. M.; CHEAH, K. T.; PEREZ, E. A.; GASKILL, D. A.; HU, J.S. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. **Plant Cell Report**, v. 20, n. 12, p.1128-1134, 2002.

KHATRI, A.; KHAN, I. A.; DAHOT, M. U.; NIZAMANI, G. S.; SIDDIQUI, M. A.; RAZA, S.; H. NAQUI, M. Study of callus induction in banana (*Musa sp*). **Pakistan Journal Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 36-40, 2005.

LÉDO, A. S.; SILVA JUNIOR, J. F.; LÉDO, C. A. S.; SILVA, S. O. Avaliação de genótipos de bananeira na região do baixo são Francisco. Sergipe. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 691-695, 2008.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36 n. 1, p. 13-19, 2006.

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

MUNSELL COLOR COMPANY. **Munsell color charts for plants tissues**. 2. ed. Baltimore, 1977.

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

OLIVEIRA, H. S.; LEMOS, O. F.; MIRANDA, V. S.; MOURA, H. C. P.; CAMPELO, M. F.; SANTOS, L. 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, R. P. de; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraploide (Grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, v.58, n.1, p.73-78, 2001.

RIBEIRO, L. O.; PAIVA, L. V.; PÁDUA, M. S.; SANTOS, B. R.; ALVES, E.; STEIN, V. C. Morfological and ultrastructural analysis of various types of banana callus, cv. Prata anã. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 4, p. 423-429, 2012.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: user's Guide**. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 2009. 7869.

SHIRANI, S.; SARIAH, M.; ZACARIA, W.; MAZIAH, M. Scalp induction rate responses to cytokininis on proliferating shoot-tips of banana cultivars (spp). **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 128-134, 2010.

STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J. V.; CÔTE, F. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. In Vézina A, Picq C (ed). INIBAP Technical Guidelines 8. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. (2003).

STROSSE, H.; SCHOOF, H.; PANIS, B.; ANDRE, E.; REYNIERS, K.; SWENNEN, R. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). **Plant Science**, v. 170, n. 1, p. 104–112, 2006.

TENKOUANO, A.; SWENNEN, R. Progress in breeding and delivering improved plantain and banana to African farmers. **Chronica Horticulturae**, v. 44, n. 1, p. 9–15, 2004.

TREVIZAM, R.; BRONDANI, G. E.; SOUZA, R.; ALMEIDA, M. de. Morfologia de calos de *Eucalyptus urophylla* Cultivados *in vitro* sob concentrações de boro e cálcio. **Floresta**, v. 41, n. 3, p. 563-574, 2011.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, v. 21, n. 12, p. 1175-1182, 2003.

XU, C.; ZOU, R.; PAN, X.; CHEN, H. Somatic Embryogenesis in Banana (*Musa* spp.). **International Journal of Plant Developmental Biology**, v. 2, n. 1, p. 52-58, 2008.

XU, CX.; LIANG, Q. R.; PENG, G. K.; CHEN, H. B. Factors affecting induction of callus from immature males flowers of bananas (*Musa* AAA). **Advance in Horticulture**, v. 6, p. 96-99, 2004.

YOUSSEF, A. M.; JAMES, C. A.; MAYO-MOSQUEDA, A.; KU-CAUICH, J. R.; GRIJALVA-ARANGO, R.; ESCOBEDO-GM, R. M. Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 15, p. 2216-2223, 2010.

CAPÍTULO 2 ²

EFEITO DO ETILMETANOSULFONATO (EMS) E DO ÁCIDO FUSÁRICO NO CULTIVO *IN VITRO* DE BANANEIRA (*Musa* spp., AAB)

² Artigo submetido ao periódico Revista Brasileira de Fruticultura

RESUMO

A cultura da bananeira é de grande importância para o Brasil e o mundo, no entanto sua produtividade é prejudicada pela ação de vários patógenos, pois o número de variedades resistentes é baixo e o melhoramento genético convencional é bastante limitado. Nesse caso, a técnica de mutagênese vem sendo muito utilizada como uma alternativa para gerar variabilidade genética tanto na bananeira como em diversas culturas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do etilmetanosulfonato no cultivo *in vitro* de brotações das cultivares de bananeira Pacovan e Maçã, ambas pertencentes ao grupo genômico AAB, e selecionar os possíveis mutantes por meio do uso da toxina ácido fusárico, buscando a seleção dos variantes resistentes. O agente químico foi utilizado em diferentes concentrações (0, 100, 200, 300 ou 400 mM) em quatro tempos de exposição (0, 30, 60 ou 120 min). Os resultados obtidos indicaram que as porcentagens de sobrevivência diminuíram em decorrência do aumento da concentração e do tempo de imersão no mutagênico. A cv. Maçã mostrou-se mais sensível à ação do mutagênico quando comparada com a cv. Pacovan. As concentrações do etilmetanosulfonato e a duração dos tempos de exposição considerados ótimos foram de 300 mM durante 120 min para a cv. Maçã, que obteve 53,3% de sobrevivência dos explantes, e de 400 mM por 60 min para a cv. Pacovan com 76,9% de sobrevivência. A capacidade de formação de brotos das plantas sobreviventes também foi reduzida em função do aumento do tempo e da concentração do mutagênico nas duas cultivares estudadas, quando comparadas a seus respectivos tratamentos controles. As plantas sobreviventes passaram por uma triagem com o agente seletivo ácido fusárico na concentração de 100 μ M, onde foi possível selecionar os materiais mais promissores a partir da sobrevivência e do desenvolvimento das plantas. Foi possível regenerar plantas *in vitro* das cultivares de bananeira Maçã e Pacovan submetidas ao tratamento com o mutagênico, e selecionar possíveis mutantes com resistência ao ácido fusárico. Esse material apresenta uma maior variabilidade genética potencialmente aplicável ao melhoramento da bananeira.

Palavras-chave: Mutagênese química, cultura de tecidos, 'Maçã' e 'Pacovan'.

ABSTRACT

The banana crop is of great importance for Brazil and the world, but its productivity is impaired by the action of several pathogens, because the number of resistant varieties is low and the conventional genetic improvement is very restricted. In this case, the mutagenesis technique has been widely used as an alternative to generate genetic variability both in banana and in several crops. The objective of this study was to evaluate the effect of ethylmethanesulfonate in the *in vitro* cultivation of shoots of the banana cultivars Pacovan and Maçã, both belonging to the AAB genomic group, and to select the possible mutants through the use of fusaric acid toxin, searching for the selection of resistant variants. The chemical agent was used in different concentrations (0, 100, 200, 300 or 400 mM) in four exposure times (0, 30, 60 or 120 min). The results indicated that survival percentages decreased as a result of increased concentration and immersion time in the mutagen. The cultivar Maçã was more sensitive to the action of the mutagen when compared to cultivar Pacovan. The concentrations of ethylmethanesulfonate and the duration of exposure times considered optimal were 300 mM for 120 min for cultivar Maçã, which obtained 53.3% survival of explants, and 400 mM for 60 min for cultivar Pacovan with 76.9% survival. The capacity of bud formation of the surviving plants was also reduced due to the increase of the time and the concentration of the mutagen used previously in the two cultivars studied, when compared to their respective controls. The surviving plants were screened with the fusaric acid selective agent at the concentration of 100 μ M, where it was possible to select the most promising materials from the survival and development of plants. It was possible to regenerate *in vitro* plants of Maçã and Pacovan banana cultivars submitted to treatment with the mutagen, and to select possible mutants with fusaric acid resistance. This material presents a greater genetic variability potentially applicable to the improvement of the banana tree.

Keywords: Chemical mutagenesis, tissue culture, 'Maçã' e 'Pacovan'.

2.1 INTRODUÇÃO

A produção e a produtividade de várias culturas continuam sendo negativamente afetadas, principalmente devido a vários estresses bióticos e abióticos. Danos causados por esses estresses são responsáveis por enormes perdas econômicas em todo o mundo. Os programas de melhoramento convencionais estão sendo empregados para integrar genes de interesse por meio de cruzamentos favoráveis, a fim de induzir tolerância ao estresse (RAI, et al. 2011), e obter novas cultivares, mesmo que essa prática ainda necessite de muito tempo de execução.

Apesar da importância da bananicultura, poucas cultivares com potencial agrônomo que sejam tolerantes às pragas e doenças, e que apresentem frutos com boas características de mercado, estão disponíveis para exploração comercial (SILVA et al. 2013). Em relação à doença tem-se a Fusariose que na bananeira é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis* e vem sendo considerada como uma das doenças mais devastadoras do mundo. O manejo da doença através do uso de produtos químicos não é eficiente, e o número de cultivares resistente é muito pequeno (LI, et al. 2013; KUMARI e KUMAR, 2015).

A baixa disponibilidade de variedades comerciais produtivas se dá pelas dificuldades encontradas no melhoramento convencional da bananeira, como a esterilidade e o baixo número de sementes produzidas. É por essa razão, que o uso da técnica de mutação induzida, visando à seleção de mutantes com características agrônomicas desejáveis, apresenta-se como um método plausível para o desenvolvimento de novas cultivares (PESTANA, 2011).

Os mutagênicos químicos são fáceis de manusear e não necessitam de equipamento especial, como o usado no tratamento de radiação, e ainda podem ser desenvolvidos sob condições controladas de espaço e tempo limitados (JAIN, 2010; RAI et al. 2011).

O etilmetanosulfonato - EMS é um dos principais agentes químicos utilizados no melhoramento genético para obtenção de variabilidade e posterior seleção de tolerância aos diversos tipos de estresses em vegetais. Em bananeira há vários relatos, com resultados satisfatórios, da utilização do EMS para indução de mutações visando obtenção de resistência ao *Fusarium* e ao estresse hídrico, como

os trabalhos de Bhagwant e Duncan (1998), Musoke, et al. (1999), Bidabadi et al. (2012 a) e Chen et al. (2013).

Jankowicz-Cieslak et al. (2012), por exemplo, utilizaram o EMS para indução de mutação em meristema apical de bananeira e observaram variações na sequência dos nucleotídeos, mostrando que houve um acúmulo de alelos heterozigóticos potencialmente deletérios, sugerindo que a indução de mutação pode identificar traços recessivos. Além disso, foi observado que os genótipos mutantes foram herdados de forma estável nas gerações subsequentes.

Vale salientar que muitos dos estudos sobre indução de mutação em *Musa* spp. foram realizados pelo emprego do método físico com o uso da radiação gama, como aqueles relatados nos trabalhos de Mishra et al. (2007), que avaliaram os efeitos da radiação gama no cultivo *in vitro*; Miri et al. (2009), que estudaram a resistência a salinidade; Pestana et al. (2010) e Bermúdez-Caraballosa et al. (2010), para redução do porte da planta; e Amorim et al. (2012) e Reis et al. (2015), sobre a caracterização agrônômica e molecular.

Por outro lado, os estudos que utilizam o método químico com o uso do EMS, em bananeira, são mais restritos e limitados, pois se concentram, em sua grande maioria, nas cultivares do grupo genômico AAA, como nos trabalhos de Bidabadi et al. (2011), Bidabadi et al. (2012 b), Jankowicz-Cieslak, et al. (2012), Chen et al. (2013), e Krishna et al. (2013).

O sucesso da mutagênese *in vitro* depende muito do estabelecimento da reprodutibilidade no procedimento de regeneração de plantas, da otimização dos tratamentos com o mutagênico, e de uma triagem eficiente das populações submetidas à mutação para variações desejadas (JAIN, 2010).

A técnica de seleção *in vitro* de variantes genéticas por meio da suplementação do meio de cultura com agentes seletivos favorecem a identificação do mutante com a característica desejada (FLORES e BRUCKNER, 2014). A exemplo, os agentes químicos utilizados em testes que conferem resistência a doenças, como no caso do ácido fusárico.

O ácido fusárico é uma das toxinas produzidas pelo patógeno *Fusarium* e, também, uma das mais estudadas. Foi utilizada com sucesso para seleção de plantas resistentes ao *Fusarium* em bananeira cv. Maçã por Matsumoto et al. (1995), em gladiolus (planta ornamental) por Remotti et al. (1997) e por Flores e Bruckner

(2014), no maracujazeiro amarelo e em várias outras aplicações conforme os estudos de Bouizgarne et al. (2006), Li et al. (2013) e Dehgahi et al. (2016).

A seleção *in vitro* pelo ácido fusárico é um método muito útil para obter tolerância à doença causada por *Fusarium*, mesmo que o mecanismo de seleção de tolerância das plantas possa ser diferente do empregado pelas cultivares tolerantes existentes (MATSUMOTO, et al. 1995).

Considerando-se a capacidade de obtenção de variabilidade genética com o uso de mutagênico químico, este estudo teve como objetivo aprimorar as possibilidades de induzir mutações com o uso do EMS em duas cultivares de bananeiras (Pacovan e Maçã, grupo AAB) e selecionar os possíveis mutantes por meio do ácido fusárico, viabilizando a produção de novos genótipos potencialmente resistentes.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Estabelecimento do sistema de multiplicação de brotos

Culturas *in vitro* de plantas de bananeiras das cultivares (AAB) Pacovan e Maçã, conservadas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, foram utilizadas na etapa de obtenção e multiplicação de brotos.

Pseudocauls de plantas *in vitro* foram excisados a aproximadamente 2 cm da base da planta e cortados longitudinalmente na extremidade meristemática, visando quebrar a dominância apical e estimular a multiplicação dos brotos. Esses pseudocauls foram cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de vitaminas tiamina, piridoxina e ácido nicotínico, 22,2 µM de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidone (PVP), 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9 e autoclavado a 121°C por 25 minutos. A sala de crescimento foi controlada com temperatura entre 25 °C e 27 °C, umidade relativa de 60%, e fotoperíodo de 16 horas. Essas condições de cultivo, meio de cultura e ambiente, foram mantidas para todos os experimentos subsequentes.

2.2.2 Indução de mutação em brotos de bananeira e determinação da DL₅₀ do mutagênico químico EMS para as cultivares estudadas

Passados 30 dias na fase de desenvolvimento, os brotos formados foram individualizados e, apenas os que continham diâmetro e comprimento de aproximadamente 5 mm, foram selecionados para a fase de indução de mutação.

O EMS foi esterilizado por meio de filtração em membrana com diâmetro de poro de 0,22 µm. Diferentes concentrações de EMS (0, 100, 200, 300 e 400 mM) foram preparadas para um volume final de 5 mL.

Os brotos selecionados ficaram imersos nessas soluções por 30, 60 e 120 minutos, exceto o tratamento controle. Em seguida foram enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada e, posteriormente, inoculados em potes plásticos

contendo 50 mL de meio de cultura MS nas mesmas concentrações citadas anteriormente.

Após quatro semanas de cultivo, avaliou-se o efeito letal do mutagênico (DL_{50} concentração que causa 50% de letalidade), baseado na percentagem de sobrevivência dos brotos de bananeira, conforme Novak et al. (1990), Chen et al. (2013), Bidabadi et al. (2012a) e Mishra et al. (2007), assim como a capacidade de formação de broto (CFB), sendo estes medidos de acordo com a metodologia de Chen et al. (2013), por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{Sobrevivência \%} = \frac{\text{número total de explantes}}{\text{número total de explantes tratados com EMS}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{CFB} = \frac{\text{número total de brotos formados}}{\text{número total de explantes sobreviventes}} \times 100 \quad (2)$$

Também foram avaliados o crescimento dos brotos (CRE) tratado com EMS e a média do comprimento dos brotos gerados (MCB).

Os experimentos foram realizados com duas cultivares de bananeira (AAB) (Pacovan e Maçã), em delineamento inteiramente casualizados 5x4, sendo cinco concentrações do EMS e quatro tempos de exposição ao mutagênico, com 15 repetições para cada tratamento.

2.2.3 Efeito da toxicidade e seleção de plantas tolerantes ao ácido fusárico nas cultivares de bananeira

As plantas que sobreviveram ao tratamento com o mutagênico passaram por 4 subcultivos em meio MS, conforme mencionado anteriormente, com o intuito de eliminar as plantas anormais e obter material suficiente para seleção das variantes tolerantes ao ácido fusárico.

Plantas das cvs. Maçã e Pacovan que apresentaram crescimento vegetativo normal após a etapa de mutagênese e que não atingiram 100% de sobrevivência, foram avaliadas quanto a sua resistência ao agente seletivo ácido fusárico, sendo essas provenientes dos seguintes tratamentos com EMS: 300 mM por 30 minutos, 300 mM por 60 minutos na cv. Maçã, 400 mM por 60 e 400 mM por 120 min na cv. Pacovan, além de seus respectivos tratamentos controle.

As plantas tiveram seu comprimento uniformizados com excisões entre 1 cm a 1,5 cm a partir da base do pseudocaule e, em seguida, foram transferidas para meio de seleção suplementado com ácido fusárico na concentração de 100 μ M. Esta concentração foi considerada por Matsumoto et al. (1995) e Li et al. (2013) como a mais adequada para esse tipo de seleção. O ácido fusárico foi previamente esterilizado conforme descrito anteriormente.

Depois de 60 dias de cultivo em meio de seleção, foi avaliada as porcentagens de sobrevivência e a de plantas que apresentaram desenvolvimento de novas folhas.

Os experimentos foram realizados individualmente nas duas cultivares estudadas, tendo esses, delineamento inteiramente casualizados 1x3 com número de repetições desbalanceadas.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na cv. Pacovan observou-se uma sobrevivência de 100% nas concentrações 100 mM e 200 mM de EMS, em todos os tempos de exposição avaliados, e também no tratamento controle (0 mM de EMS). O índice de sobrevivência também se manteve alto em 300 mM, onde o menor valor obtido foi de 80% para o tempo de exposição de 120 min. Os valores começaram a reduzir no tratamento com concentração de 400 mM, cujos índices de sobrevivência foram de 76,9% na exposição por 60 min, e apenas de 20% quando os explantes foram tratados por 120 min (Tabela 1).

A cv. Maçã mostrou-se mais sensível ao efeito do mutagênico EMS, com o aumento do tempo e da concentração. Além do tratamento controle sem EMS, observou-se que 100% dos explantes sobreviveram nas concentrações de 100 mM e 200 mM nas exposições de 30 min de duração. Esses valores, entretanto, diminuíram para 84,6% e 80% de sobrevivência nas concentrações de 300 mM e 400 mM de EMS, respectivamente. Na exposição ao EMS por 60 min, as menores porcentagens de sobrevivência foram obtidas nos tratamentos de 200 mM, com 40% de sobrevivência, e de 400 mM com 33,3%. O menor valor de sobrevivência para a cv. Maçã (26,6%) foi obtido com 120 min de exposição com o uso de 200 mM de EMS (Tabela 1).

TABELA 1: Efeito da concentração e do tempo de exposição ao etilmetanosulfonato (EMS) na sobrevivência de explantes de bananeira (brotos) das cvs. Pacovan e Maçã cultivados *in vitro*.

Cultivar	Duração (min)	Sobrevivência (%) ¹				
		0 mM	100 mM	200 mM	300 mM	400 mM
Pacovan	30	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
	60	-	100 ± 0,00	100 ± 0,00	93,3 ± 0,58	76,9 ± 1,15
	120	-	100 ± 0,00	100 ± 0,00	80 ± 1,00	20 ± 1,00
Maçã	30	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	84,6 ± 0,58	80 ± 0,00
	60	-	100 ± 0,00	40 ± 1,73	73,3 ± 1,53	33,3 ± 2,08
	120	-	86,6 ± 1,15	26,6 ± 1,53	53,3 ± 0,58	66,6 ± 0,58

¹Valores (% ± Desvio padrão), 30 dias após o tratamento com EMS.

Chen et al. (2013), avaliaram o potencial de sobrevivência ao mutagênico químico da cultivar de bananeira Brasil (AAA), muito popular no sul da China, e também relataram que esse potencial diminui em função do aumento da concentração do EMS e do tempo de imersão. Nesse caso, para a concentração de 300 mM de EMS durante 120 min, somente 10% dos explantes sobreviveram, diminuindo para 2% em 400 mM por 60 min, e, nessa mesma concentração com o tempo de 120 min, nenhum dos explantes sobreviveu. No entanto, vale a pena ressaltar que os explantes utilizados por esses autores foram discos feitos em micro cortes transversais no pseudocaule, podendo essa metodologia ser uma das causas do baixo percentual de sobrevivência.

Da mesma forma, Bidabadi et al. (2012a) também relataram uma redução significativa na sobrevivência dos explantes com o aumento da concentração do EMS e do tempo de duração no tratamento mais concentrado (250 mM por 60 min), cujos valores foram de apenas 37,7%, 34,4% e 31% dos explantes das cvs. Berangan Intan (AAA), Berangan (AAA) e Rastali (AAB), respectivamente. Nesse mesmo trabalho, observou-se que a cultivar do grupo genômico AAB mostrou-se mais sensível ao efeito do mutagênico, quando submetida a uma concentração mais elevada, conforme observado nos resultados obtidos no nosso estudo.

Declínio da sobrevivência das plantas mutantes associado ao aumento da concentração do EMS foi também observado por Krishna et al. (2013) em *Musa paradisiaca* (AB), uma cultivar nativa da Índia. Contudo, é possível afirmar que essa redução é comum em diferentes cultivares de bananeira.

O tratamento com 300 mM de EMS por 120 min foi considerado o tratamento ótimo na cv. Maçã, pois 53,33% dos explantes sobreviveram em relação ao tratamento controle. Essa mesma concentração também foi indicada como melhor concentração no estudo de Chen et al. (2013) que obtiveram valor de 50% de sobrevivência dos explantes ao testar tratamentos semelhantes ao deste estudo na bananeira cv. Brasil.

Devido ao alto percentual de sobrevivência ao EMS apresentado pela cv. Pacovan, não foi possível indicar a DL_{50} , com as doses avaliadas, já que a sobrevivência dos brotos se manteve acima de 75%, exceto no tratamento 400 mM por 120min, onde a sobrevivência despencou para apenas 20%. Para esse caso, adotou-se o critério da DL_{25} com intuito de manter um número suficiente de plantas a fim de maximizar os estudos futuros de investigação de mutação. A DL_{25} (DL_{25}

concentração que causa 25% de letalidade) foi adotada, conforme relatado por Jain (2010) sobre a utilização da mutagênese *in vitro* para melhoramento da bananeira. O autor sugeriu que a concentração poderia ser reduzida para DL₂₅ ou DL₃₀, dependendo da sensibilidade da cultura utilizada. Portanto, o tratamento ótimo adotado para a cv. Pacovan foi o de 400 mM por 60 minutos, com 76,9% de sobrevivência dos explantes.

Outro ponto importante refere-se ao equilíbrio entre a necessidade de manter o crescimento das plantas e, ao mesmo tempo, elevar ao máximo a densidade das mutações induzidas, onde a avaliação da herança é dada medindo a taxa na qual as plantas se tornam geneticamente homogêneas (Jankowicz-Cieslak et al. 2012).

A avaliação do desenvolvimento dos explantes após a exposição ao EMS na cv. Maçã, no tempo de 120 min, mostrou que a capacidade de formação de brotos foi reduzida com aumento da concentração do mutagênico. O tratamento controle produziu em média 2,1 brotos por planta, enquanto para concentração 100 mM, o valor obtido foi de 1,3 brotos, não havendo formação de novos brotos para as demais concentrações. A média do comprimento dos brotos dos explantes foi maior em relação à média do controle e, para variável crescimento do explante, observou-se, também, uma redução da média do crescimento conforme o aumento da concentração do EMS, exceto na concentração de 100 mM (Tabela 2).

O comportamento dessas mesmas variáveis foi avaliado na concentração de 300 mM em seus diferentes tempos de duração. No tempo de 120 min (considerado o tempo ótimo) o crescimento do explante inoculado foi bastante lento com tamanho médio de 1,7 mm, não havendo, conseqüentemente, indução de novos brotos (Tabela 3).

TABELA 2: Efeito do tempo de exposição na CFB (capacidade de formação de brotos), MCB (média do comprimento de brotos) e CRE (crescimento dos brotos tratados) em função das concentrações do etilmetanosulfonato sobre o desenvolvimento dos explantes nas cvs. Maçã e Pacovan, 30 dias após a inoculação *in vitro*¹.

Cultivar	Tempo de exposição (min)	EMS (mM)	CFB	MCB	CRE
Maçã	120	0	2,10 ± 1,8	2,65 ± 1,7	3,30 ± 2,0
		100	1,31 ± 1,3	2,73 ± 2,0	4,46 ± 3,8
		200	0,0	0,0	3,33 ± 2,0
		300	0,0	0,0	1,75 ± 0,4
		400	0,0	0,0	1,80 ± 0,6
Pacovan	60	0	2,01 ± 1,0	1,97 ± 0,8	3,73 ± 3,2
		100	2,27 ± 1,8	1,98 ± 0,8	3,38 ± 2,5
		200	1,10 ± 1,0	2,38 ± 1,7	4,25 ± 2,9
		300	0,86 ± 0,1	1,90 ± 1,8	5,86 ± 2,7
		400	0,50 ± 0,5	2,33 ± 0,9	6,11 ± 3,7

¹Médias dos valores, ± Desvio padrão.

TABELA 3: Efeito da concentração do etilmetanosulfonato na CFB (capacidade de formação de brotos), MCB (média do comprimento de brotos) e CRE (crescimento dos brotos tratados) em função dos tempos de exposições sobre o desenvolvimento dos explantes de bananeira cvs. Maçã e Pacovan, 30 dias após a inoculação *in vitro*¹.

Cultivar	EMS (mM)	Tempo de exposição (min)	CFB	MCB	CRE
Maçã	300	0	2,10 ± 1,8	2,65 ± 1,7	3,27 ± 2,0
		30	0,40 ± 0,4	4,0 ± 2,0	3,64 ± 1,8
		60	0,0	0,0	3,82 ± 1,9
		120	0,0	0,0	1,75 ± 0,4
Pacovan	400	0	2,01 ± 1,0	1,97 ± 0,8	3,73 ± 3,2
		30	1,20 ± 1,0	1,94 ± 0,7	2,25 ± 1,1
		60	0,50 ± 0,5	2,33 ± 0,9	6,11 ± 3,7
		120	0,0	0,0	4,0 ± 2,8

¹Médias dos valores, ± Desvio padrão.

Na cv. Pacovan, também, foi possível observar que houve uma redução na CFB em função do aumento da concentração e do tempo. A variável MCB manteve-se próxima a média do tratamento controle, enquanto no CRE o efeito foi contrário, pois a média do crescimento aumentou juntamente com aumento da concentração do mutagênico, no tempo de 60 min de exposição, mostrando que essa variável foi favorecida pela ação do mutagênico (Tabela 2).

No tratamento considerado ótimo para essa cultivar (400 mM por 60 min), pelo critério de melhor concentração, o crescimento foi em média de 6,11 mm, a capacidade de formação de brotos de 0,5 e o comprimento médio dos brotos foi de 2,3 mm (Tabela 3).

No cultivo *in vitro* de bananeiras submetidas ao EMS realizado por Bidabadi et al. (2012a) também foi relatado que os valores médios de brotações por planta variaram entre as cultivares, com valores de 0,4, 0,6 e 0,8 na concentração de 250 mM por 60 min, 45 dias após a indução de mutação nas cvs. Berangan Intan, Berangan e Rastali, respectivamente. Neste trabalho, os resultados foram semelhantes em que os valores foram de 0,5 brotos na cv. Pacovan (400 mM por 60 min) e 0,0 para a cv. Maçã (300 mM por 120 min), aos 30 dias após o tratamento com o mutagênico.

Por outro lado, um dos desafios da mutagênese na cultura de tecidos é o quimerismo resultante do tratamento de tecidos multicelulares. Nesse caso, considerando os sistemas de propagação de clones, é possível realizar a remoção das quimeras, o que permite que todo o material subsequente derivado de um tecido possa se tornar genotipicamente idêntico (JAIN et al. 2011).

Estudos sobre o mecanismo de remoção de quimeras ainda são limitados na cultura da bananeira, bem como em outras plantas propagadas vegetativamente. Jankowicz-Cieslak et al. (2012) se basearam num estudo de medição de citoquimeras, onde foi sugerido que as quimeras possam ser parcialmente removidas na terceira ou quarta geração, em bananeira tratadas com colchicina. Para garantir a redução das possíveis quimeras, na mutagênese *in vitro*, é preciso realizar repetidos ciclos de propagação vegetativa, pois cada excisão resulta numa redução da heterogeneidade genotípica das células meristemáticas, que se dividem para produzir seus descendentes. Assim, espera-se que no sexto ciclo de multiplicação, as plantas tratadas com EMS estejam fenotipicamente homogêneas.

A cultura de meristema é muito utilizada na cultura de tecidos como material apropriado para indução de mutação. Entretanto, também possui a desvantagem de potencialmente desenvolver quimeras na população de plantas mutantes, podendo ainda sofrer variação somaclonal, variação epigenética, e ativação de elementos transponíveis que resultam em aumento da variabilidade genética entre plantas regeneradas (JAIN, 2010).

Diante disso, o uso de brotos vem sendo muito utilizado como uma fonte alternativa de explantes para estudos de indução de mutação em diversas cultivares de bananeiras, possuindo, no entanto, os mesmos riscos citados anteriormente. Conforme relatado nos estudos de Mishra et al. (2007), Bermúdez-Caraballoso et al. (2010), Pestana et al. (2011), Amorim et al. (2012), e Reis et al. (2015), o uso dos brotos para mutagênese foi eficiente, sendo possível viabilizar a indução da variabilidade genética e, conseqüentemente, a seleção de indivíduos com boas características agronômicas.

O presente estudo envolvendo a indução de variabilidade genética com o uso do mutagênico químico EMS, utilizando brotos de bananeiras cultivados *in vitro*, mostrou-se eficiente na avaliação da sobrevivência e no desenvolvimento dos explantes tratados. Mesmo existindo riscos de se obter quimeras, que podem ser eliminadas por meio de sucessivos subcultivos. Esse método também possui como vantagem a facilidade de se obter o material desejado, pois independe das fases de multiplicação em campo, já que a maioria das cultivares de bananeira responde bem ao sistema de micropropagação *in vitro*, além de serem fáceis de regenerar após a fase de mutagênese.

Por outro lado, a seleção *in vitro* das plantas mutantes em meio de cultura contendo ácido fusárico mostrou que apenas 40% das plantas provenientes do controle da cv. Maçã sobreviveram, enquanto entre as provenientes dos tratamentos com 300 mM de EMS por 30 e 60 minutos, esse valor foi de 48% e 65%, respectivamente, após 60 dias de cultivo. Diferenças significativas foram observadas no desenvolvimento das plantas, principalmente quanto à formação e diferenciação de folhas. Nesse caso, o tratamento controle não apresentou nenhuma planta sobrevivente com formação de folhas, enquanto nas plantas provenientes dos tratamentos com 300 mM por 30 min e 300 mM por 60 min com EMS, 60% e 46%, respectivamente, desenvolveram folhas (Tabela 4 e Figura 1 - A, B e C).

TABELA 4: Sobrevivência e desenvolvimento de plantas de bananeira cvs. Maçã e Pacovan tratadas com etilmetanosulfonato (EMS) em meio de seleção com 100 μ M de ácido fusárico, avaliados após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Cultivar	Tratamento (Origem) ¹	%	
		Sobrevivência	Plantas com folhas desenvolvidas
Maçã	0/0'	40 \pm 0	0
	300/30'	48 \pm 1,9	60 \pm 0,5
	300/60'	65 \pm 1,5	46,1 \pm 1,4
Pacovan	0/0'	67 \pm 0,5	50 \pm 0,1
	400/60'	62 \pm 0,1	17 \pm 0,7
	400/120'	69,5 \pm 0,8	32 \pm 0,5

¹tratamento de origem: mM de EMS / minutos. \pm desvio padrão.

De uma maneira geral, observou-se que houve uma maior sensibilidade ao agente seletivo a cv. Maçã, cuja sobrevivência das plantas variou entre 40% e 65%. Levando-se em consideração a normalidade do crescimento vegetativo, foi visto que o tratamento com 300 μ M de EMS por 30 min resultou na indução de uma melhor capacidade de desenvolvimento regenerativo. Portanto, considerou-se esse como o tratamento mais adequado para selecionar os mutantes de bananeira da cv. Maçã em relação à resistência ao ácido fusárico.

Na cv. Pacovan, a sobrevivência observada foi de 67% para as plantas provenientes do tratamento controle, das quais 50% das plantas continham folhas bem desenvolvidas. Em relação às plantas provenientes dos tratamentos com EMS, obteve-se 62% de sobrevivência entre as originadas do tratamento com 400 mM de EMS por 60 min, das quais apenas 17% apresentaram folhas. Já nas plantas provenientes do tratamento com maior tempo de duração (120 minutos), o valor da sobrevivência subiu para 70%, com 32% de plantas com formação de folhas (Tabela 4 e Figura 1 - D, E e F). Neste caso, as plantas avaliadas apresentaram uma melhor adaptação às condições avaliadas, tornando esse tratamento como mais eficiente para o teste de resistência.

A observação que a variação na sobrevivência das plantas da cv. Pacovan foi relativamente maior que a cv. Maçã pode ser explicada em função das diferenças entre as cultivares, principalmente aquelas associadas ao fator de resistência à Fusariose, pois a cv. Maçã é considerada altamente suscetível enquanto a cv. Pacovan apresenta uma suscetibilidade moderada. Isso pode explicar, também, o

alto índice de sobrevivência e bom desenvolvimento obtido no tratamento controle dessa mesma cultivar.

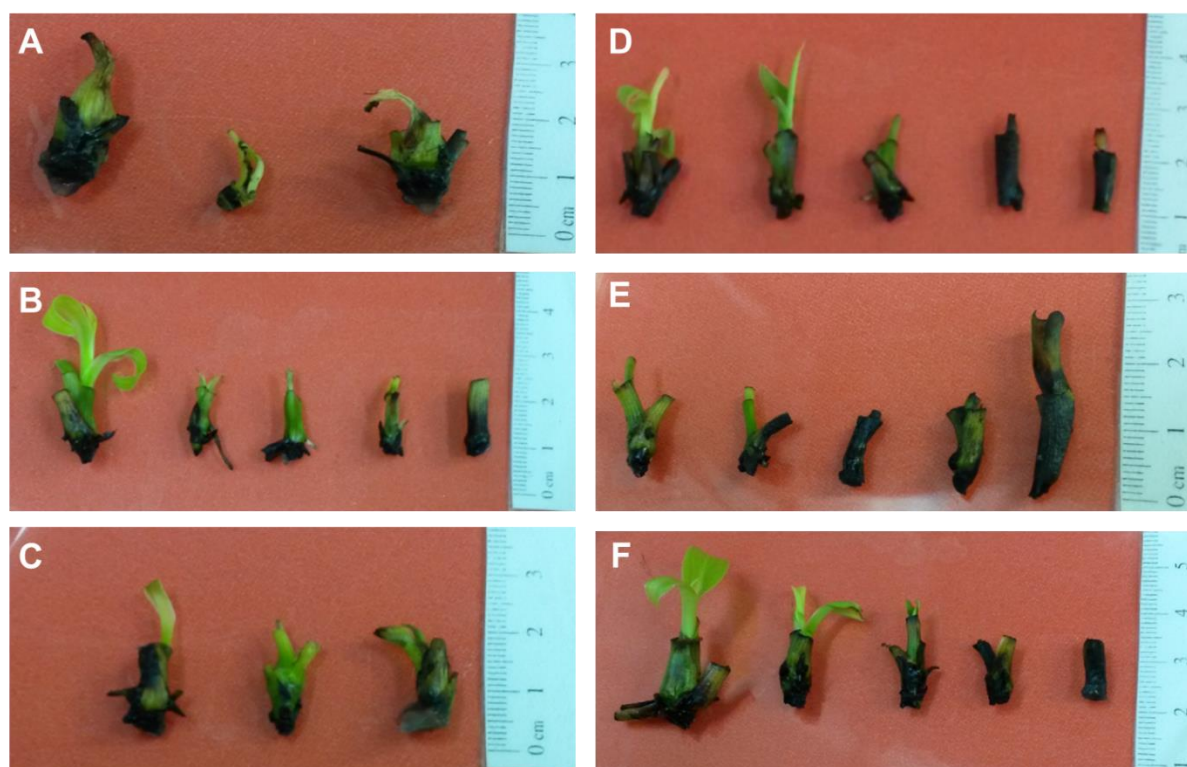


FIGURA 1: Aspecto geral de plantas de bananeira pré-tratadas com etilmetanosulfonato (EMS) e cultivadas em meio de cultura seletivo contendo 100 μ M de ácido fusárico, após 60 dias de cultivo. A, B e C – plantas da cv. Maçã provenientes de seus respectivos tratamentos de origem: controle, 300 μ M de EMS por 30 min e 300 μ M de EMS por 60 min. D, E e F respectivamente – plantas da cv. Pacovan provenientes de seus respectivos tratamentos de origem: controle, 400 μ M de EMS por 60 min e 400 μ M de EMS por 120 min.

Vários estudos descrevem o efeito do ácido fusárico sobre o desenvolvimento das plantas. Dong et al. (2014), por exemplo, estudaram a ação do ácido fusárico na senescência das folhas em bananeira infectadas por *Fusarium* e apontaram que durante a infecção, o ácido fusárico acumulou-se, primeiramente, nas folhas inferiores e que substâncias solúveis em água presentes nessas folhas poderiam aumentar drasticamente sua produção. Concluíram que a senescência de plantas de bananeira infectadas foi induzida pela infecção por *Fusarium* com a produção de ácido fusárico.

As reações observadas com a exposição das plantas à toxina em ambiente controlado assemelham-se com o que ocorre nas plantas acometidas por *Fusarium*

no campo, resultando na murcha da parte aérea e posterior colapso da planta. Isto confirma a participação do ácido fusárico na manifestação dos sintomas da doença na planta em campo (FLORES, 2008).

Li et al. (2013), por sua vez, observaram que os pseudocaulos tratados com ácido fusárico tornaram-se oxidados e encharcados. O ácido fusárico fez com que as plantas de bananeira *in vitro* deteriorassem e morressem. Os sintomas tornaram-se mais severos à medida que as concentrações foram aumentadas. Na concentração de 100 µM do ácido fusárico, as folhas ficaram amareladas, as plantas murcharam e as raízes escureceram.

Os mesmos sintomas foram observados, no presente trabalho, onde as plantas apresentaram sintomas de murcha primeiramente na parte aérea, atingindo posteriormente toda a planta, acarretando sua morte. Em outros casos, a planta não sobreviveu por não ter conseguido desenvolver nenhuma estrutura em resposta à ação da toxina (Figura 1). Esse fato justifica a importância de avaliar a planta quanto ao desenvolvimento de folhas, pois essas quando bem desenvolvidas podem indicar sua possível tolerância ao agente seletivo.

Por fim, vale a pena salientar que o ácido fusárico é uma toxina não específica produzida pela maioria dos *Fusarium* spp. (BOUIZGARNE et al. 2006). A tolerância ao ácido fusárico pode não estar diretamente relacionada a um determinado tipo específico de raça do *Fusarium*, mas pode atrasar o avanço do fungo dentro da planta e servir de agente de seleção (MATSUMOTO et al. 1995). Dessa forma, a indução de mutação associada à seleção com o uso do ácido fusárico aumentou a eficiência na escolha de novos materiais com uma possível tolerância ao *Fusarium*.

2.4 CONCLUSÕES

- É possível regenerar plantas *in vitro* das cultivares de bananeira Maçã e Pacovan submetidas ao tratamento com o mutagênico EMS;

- A cultivar Maçã mostrou-se mais sensível ao EMS quando comparada com cv. Pacovan, e ambas tiveram a capacidade de formação de brotos reduzida em função do aumento da concentração do mutagênico.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, E. P.; PESTANANA, R. K. N.; SILVA, S. O.; NETO, A. T. Caracterização agrônômica de mutantes de bananeira obtidos por meio da radiação gama. **Bragantia**, v. 71, n. 1, p. 8-14, 2012.
- BERMÚDEZ-CARABALLOSO, I.; GARCÍA, L. R.; VIETÍA, N.; TORRES, D.; PADRÓN, Y.; ROMERO, P.; ORELLANA, P. Mutant plantains (*Musa* spp.) with height reduction obtained by *in vitro* mutagenesis. **Euphytica**, v. 176, n. 1, p. 105–112, 2010.
- BHAGWAT, B.; DUNCAN, E. J. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* using chemical mutagens. **Scientia Horticulturae**, v. 73, n.1, p. 11–22, 1998.
- BIDABADI, S. S.; MEON, S.; WAHAB, Z.; SUBRAMANIAM, S.; MAHMOOD, M. Induced mutations for enhancing variability of banana (*Musa* spp.) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS). **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 3, p. 391-401, 2012a.
- BIDABADI, S. S.; MAHMOOD, M.; MEON, S.; WAHAB, Z.; GHOBADI, C. Evaluation of *in vitro* Water Stress Tolerance among EMS – Induced Variants of Banana (*Musa* spp., AAA), Using “Morphological, Physiological and Molecular” Traits. **Journal Crop Science Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 255-263, 2011.
- BIDABADI, S. S.; MEON, S.; WAHAB, Z.; SUBRAMANIAM, S.; MAHMOOD, M. *In vitro* selection and characterization of water stress tolerant lines among ethyl methanesulphonate (EMS) induced variants of banana (*Musa* spp., with AAA genome). **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 3, p. 567-575, 2012b.
- BOUIZGARNE, B. et al. A Putative Role for Fusaric Acid in Biocontrol of the Parasitic Angiosperm *Orobanche ramosa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 5, p. 550–556. 2006.
- CHEN, Y. R.; CHEN, W.; HUANG, X.; HU, X.; ZHAO, J. T.; GONG, Q.; LI, X. J.; HUANG, X. L. *Fusarium* wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-cross-section cultural system. **Plant Pathology**, v. 62, n. 1, p. 112–119, 2013.
- DEHGAHI, R.; ZAKARIA, L.; MOHAMAD, A.; JONIYAS, A.; SUBRAMANIAM, S. Effects of fusaric acid treatment on the protocorm-like bodies of *Dendrobium sonia*-28, **Protoplasma**, v. 253, n. 5, p. 1373-1383, 2016.
- DONG, X.; XIONG, Y.; LING, N.; SHEN, Q.; GOU, S. Fusaric acid accelerates the senescence of leaf in banana when infected by *Fusarium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnologist**, v. 30, n. 4, p. 1399-1408, 2014.
- FLORES, P. S. **Filtrado de culturas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* E ácido fusárico na seleção *in vitro* de maracujazeiro amarelo**. 2008. 88 f. Tese

(doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

FLORES, P. S.; BRUCKNER, C. H. Raios gama na sobrevivência de maracujazeiro amarelo inoculados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae*. **Ciência Rural**, v. 144, n. 4, p. 639-644, 2014.

JAIN, S. M. *In vitro* mutagenesis in banana (*Musa* spp.) improvement. **Acta Horticulturae**, v. 879, n. 67, p. 605-614, 2010.

JAIN, S. M., TILL, B.; SUPRASANNA, P.; ROUX, N. Mutations and cultivar development of banana. *In*: Pillay, M.; Tenkouano, A. Banana Breeding: Progress and Challenges. Nova York: Boca Raton, FL: CRC Press, 2011. Cap. 10, p. 203–218.

JANKOWICZ-CIESLAK, J.; HUYNH, O. A.; BRONZYNSKA, M.; NAKITANDWE, J.; TILL, B. J. Induction, rapid fixation and retention of mutations in vegetatively propagated banana. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 9, p. 1056–1066, 2012.

KRISHNA, V. V.; KUMAR, K. G.; PRADEEPA, K.; KUMAR, S. E. S.; KUMAR, R. S. Biochemical markers assisted screening of *Fusarium* wilt resistant *Musa paradisiaca* (L.) cv. Puttabale micropropagated clones. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 7, p. 531-542, 2013.

KUMARI, A.; KUMAR, H. Association of nonpathogenic fusarium oxysporum species with cultured shoot apices of banana (*Musa acuminata*) cultivars. **The bioscan**, v. 10, n. 2, p. 629-633, 2015.

Li, C. et al. Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium* f. sp. *cubense*. **Plos one**, v. 8, n. 7, p. 1-11, 2013.

MATSUMOTO, K.; BARBOSA, M. L.; SOUSA, L. A. C.; TEIXEIRA, J. B. Race 1 *Fusarium* wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. **Euphytica**, v. 84, n.1, p. 67–71, 1995.

MIRI, S. M.; MOUSAVA, A.; NAGHAVI, M. R.; MIRZALI, M.; TALAELI, A. R.; KHIABANI, B. N. Analysis of induced mutants of salinity resistant banana (*Musa acuminata* cv. Dwarf Cavendish) using morphological and molecular markers. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 86-92, 2009.

MISHRA, P. J.; GANAPATHI, T. R.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Effect of single and recurrent gamma irradiation on *in vitro* shoot cultures of banana. **International Journal of Fruit Science**, v.7, n. 1, p.47-57, 2007.

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

MUSOKE, C.; RUBAIHAYO, P. R.; MAGAMBO, M. Gamma Rays and Ethylmethane Sulphonate *In Vitro* Induced *Fusarium* Wilt Resistant Mutants in Bananas. **African Crop Science Journal**, v. 7, n. 4, p. 313-320, 1999.

NOVAK, F. J.; AFZA, R.; VAN, D. M.; OMAR, M. S. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro*-cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa cvs*). **Tropical Agriculture**, v. 67, n.1, 21–28, 1990.

PESTANA, R. K. N.; AMORIM, E. P.; SILVA, S. O.; NETO, A. T. Irradiação gama para mutagênese *in vitro* em bananeira 'Terra Maranhão'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.10, p.1328-1330, 2010.

PESTANANA, R. K. N.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, C. F.; AMORIM, V. B. de O.; OLIVEIRA, L. S.; LEDO, C. A. da S.; SILVA, S. de O. e. Agronomic and molecular characterization of gamma ray induced banana (*Musa sp.*) mutants using a multivariate statistical algorithm. **Euphytica**, v.178, n. 2, p.151-158, 2011.

RAI, M. K.; KALIA, R. K.; SINGH, R.; GANGOLA, M. P.; DHAWAN, A. K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n.1, p. 89-98, 2011.

REIS, R. V.; AMORIM, E. P.; AMORIM, V. B. O.; FERREIRA, C. F.; PESTANA, C. A. S.; GONÇALVES, Z.; BORÉM, A. Genetic dissimilarity and selection of putative mutants of Terra Maranhão plantain cultivar using the Ward-MLM strategy. **Genet. Mol. Res.** v. 14, n. 4, p. 15339-15348, 2015.

REMOTTI, P. C.; Löffler, H. J. M.; VLOTEN-DOTING, L. V. Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus x grandiflorus* v.'Peter Pears'. **Euphytica**, v. 96, n. 2, p. 237-245, 1997.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: Estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013.

CAPÍTULO 3³

EFICIÊNCIA DO MÉTODO *SCALP* NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BANANEIRA cv. MAÇÃ (AAB) VIA BIOBALÍSTICA

³ Artigo submetido ao periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira

RESUMO

A banana (*Musa* spp.) é considerada um dos mais importantes frutos no comércio mundial. Existe um grande número de variedades de bananeira no mercado, porém a maioria delas é suscetível a pelo menos um tipo de doença e, mesmo existindo muitos estudos de melhoramento genético voltados para essa cultura, há a necessidade de desenvolver novas variedades mais resistentes aos diferentes tipos de patógenos. A bananeira cv. Maçã é bastante apreciada pelos consumidores devido às suas características organolépticas. Porém as perdas na sua produção são drásticas em decorrência da sua alta suscetibilidade a Fusariose. Devido à sua ploidia e à falta de produção de sementes quando em cruzamentos há limitações no melhoramento convencional, abrindo possibilidades para o uso de outros métodos que permitam introduzir, de forma direta, novos genes de interesse. O presente estudo teve como objetivos avaliar a eficiência do método *Scalp* na regeneração de brotos de bananeira cv. Maçã transformados via biobalística. Nesse caso, foi utilizado 2,0 µM do herbicida Imazapyr como agente de seleção. Os resultados mostraram eficiência tanto no método de transformação quanto na técnica de regeneração via organogênese direta, resultando em altos valores de sobrevivência e multiplicação dos brotos da bananeira cv. Maçã, onde possíveis plantas transgênicas foram obtidas após a seleção de resistência ao herbicida.

Palavras-chave: *Musa*, engenharia genética, estruturas polimeristemáticas, imazapyr.

ABSTRACT

Banana (*Musa* spp.) is considered one of the most important fruits in world trade. There are a large number of banana varieties on the market, but most of them are susceptible to at least one type of disease and, even though there are many genetic improvement studies for this crop, there is a need to develop new varieties that are more resistant to different types of banana pathogens. The cultivar Maçã is highly appreciated by consumers because of its flavor characteristics. However the losses in its production are drastic due to high susceptibility to Fusarirose. Due to its ploidy, and the lack of seed production when in crosses there are limitations in conventional breeding, opening up possibilities for the use of other methods that allow to directly introduce new genes of interest. The present study had as objectives to evaluate the efficiency of the Scalp method in the regeneration of banana shoots Maçã cultivar transformed via biobalistics. In this case, 2.0 μM of the herbicide Imazapyr was used as selection agent. The results showed efficiency both in the transformation method and in the regeneration technique via direct organogenesis, resulting in high values of survival and multiplication of the shoots. Possible transgenic plants were obtained after the selection of resistance to the herbicide.

Keywords: Muse, genetic engineering, meristematic structures, imazapyr.

3.1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é considerada um dos mais importantes frutos no comércio mundial, sendo produzida em vários países das regiões tropicais e subtropicais. A produção dessa fruta constitui uma das mais importantes fontes alimentar e de renda para milhares de pessoas no mundo, pois seus cultivos são provenientes principalmente da agricultura familiar. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana, com produção estimada de 6,95 milhões de toneladas, em uma área de 478,7 mil hectares (FAOSTAT, 2017).

A maioria dos genótipos de bananeira, cultivados para alimentação, tiveram sua origem a partir de cruzamentos interespecíficos entre *M. acuminata* Colla (genoma A, $2n=2x=22$) e *M. balbisiana* Colla (genoma B, $2n=2x=22$). O cruzamento entre espécies e subespécies pode ter levado ao aparecimento da partenocarpia, uma característica selecionada pelo homem em conjunto com a esterilidade, levando assim à fixação de genótipos estéreis com frutos comestíveis (SILVA et al. 2013).

Apesar da importância da bananicultura e do grande número de variedades existentes, a bananeira ainda é atacada por muitas doenças, embora os programas de melhoramento genético tenham sido desenvolvidos com sucesso em suas diferentes vertentes. Ainda assim, há uma grande necessidade de desenvolver novas variedades que tenham resistência aos diferentes tipos de patógenos.

Matsumoto et al. (2002), chamou a atenção para a importância da criação de plantas altamente produtivas e resistentes a doenças, ressaltando que apenas algumas novas cultivares foram obtidas por melhoramento convencional.

Entre as cultivares mais usadas pelos agricultores está a cv. Maçã (AAB), que é bastante apreciada devido as suas características organolépticas. Entretanto, esta cultivar é altamente suscetível a Fusariose, cujas perdas na sua produção podem alcançar 100%, devido à ineficiência das alternativas de controle (SILVA et al. 2011; SILVA et al. 2013).

A aplicação do método de cruzamentos nesta espécie ainda é muito difícil, pois, a maioria das variedades cultivadas são triploides, apresentam baixa fertilidade, frutos partenocárpicos e esterilidade. Nesse caso, a transformação genética apresenta-se como uma alternativa que promete contornar as dificuldades

do melhoramento convencional, permitindo o uso direto das variedades estéreis cultivadas (MATSUMOTO et al. 2002; Ortiz, 2013).

As culturas geneticamente modificadas vêm se tornando cada vez mais uma solução eficaz para melhorar a tolerância a fatores diversos, e ampliar os rendimentos das plantas. Para isso, algumas tentativas de desenvolver cultivares resistentes geneticamente modificadas a *Fusarium oxysporum cubense* foram iniciadas, utilizando vários genes (transgenes) com potencial eficiência para combater a Fusariose (SWARUPA et al. 2014).

Entre os genes que conferem resistência a doenças existem os da família das defensinas que estão sendo muito empregadas nos estudos de transformação em várias culturas com intuito de desenvolver plantas resistentes.

Nos vegetais, as defensinas são compostas de pequenos peptídeos catiônicos (~5 kDa), ricos em cisteínas, podendo estimular o sistema imune do hospedeiro e inibir diretamente ou indiretamente o crescimento de micro-organismos (MENEZES, 2009). As atividades biológicas publicadas sobre defensinas de plantas incluem atividades antifúngicas, antibacterianas, proteinase e inibidores de amilase de insetos Nawrot et al. (2014). Para este estudo foi usada uma defensina minerada através de análises *in silico* do transcriptoma do melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) a qual apresenta potenciais propriedades antifúngicas (FERREIRA, 2016).

Grande parte dos estudos de transformação genética, na cultura da bananeira, utiliza a técnica de suspensão celular com explantes derivados de flores masculinas imaturas, a exemplo dos trabalhos de Houllou-Kido et al. (2005), Mohands et al. (2011), Borth et al. (2011) e Chong-Péres et al. (2012). No entanto, há limitações quanto ao emprego dessa técnica, além da dificuldade de regeneração e da grande demanda de tempo requerida, aliada a dependência do ciclo reprodutivo da planta.

O método *Scalp* tem como vantagem a utilização de tecidos meristemáticos derivados de brotos laterais cultivados *in vitro* (STROSSE et al. 2006). Nesse método os brotos obtidos são cultivados em altas concentrações de citocinina onde são formadas estruturas polimeristemáticas que, após se diferenciarem, darão origem a uma grande quantidade de brotos em um curto período de tempo.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos avaliar a eficiência do método *Scalp* na regeneração de brotos de bananeira cv. Maçã transformados via biobalística.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE e de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE.

Os explantes utilizados para esse experimento provêm de culturas estoque de bananeira da cultivar Maçã (AAB) mantidas *in vitro*.

3.2.1. Multiplicação das estruturas polimeristemáticas via *Scalp*

Para multiplicação e obtenção de um grande número de brotos necessários para o bombardeamento, foi adotada a técnica de multiplicação de estruturas polimeristemáticas (Oliveira et al. 2017, em preparação).

Brotos de bananeira com aproximadamente 5 mm de comprimento foram individualizados e cultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas tiamina, piridoxina e ácido nicotínico a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina (BAP), $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de polivinilpirrolidone (PVP), 30 g L^{-1} de sacarose e solidificado com 5 g L^{-1} de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,2 e autoclavado a 121°C por 25 minutos. As condições ambientais da sala de cultivo foram de temperatura entre 25°C e 27°C , umidade relativa de 60%, sendo os explantes mantidos no escuro durante dois meses. Após esse período, foram obtidas várias estruturas polimeristemáticas contendo pequenos brotos com tamanho aproximado de 5 mm de comprimento.

3.2.2. Teste de sensibilidade e determinação da concentração ótima do herbicida Imazapyr

Foi realizado um experimento preliminar para avaliar os efeitos do herbicida Imazapyr nos brotos de bananeira cv. Maçã, e determinar a concentração inibitória capaz de bloquear o desenvolvimento e a formação de novos brotos. Procedimento semelhante também foi realizado por Matsumoto et al. (2002).

Foram testadas, em meio de seleção, as seguintes concentrações de Imazapyr: 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 μM . Os brotos foram inoculados em meio MS suplementado com vitaminas, 4,44 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidone (PVP), 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5 g de ágar. Antes da autoclavagem a 121 °C por 25 minutos, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9.

3.2.3. Estrutura do plasmídeo

O plasmídeo pAHASMCDEF1 foi produzido a partir do transcriptoma da semente do melão-de-são-caetano ou melãozinho (*Momordica charantia*), em que foi selecionado um gene que codifica uma defensina (defensina de *M. charantia* dirigida pelo promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor). Além do gene de interesse, o vetor binário também contém o gene *Atahas* como marcador de seleção. A metodologia de todas as etapas de construção do plasmídeo está descrita no trabalho de Ferreira (2016).

3.2.4 Transformação genética pelo método biobalística

A transformação genética dos brotos de bananeira, gerados a partir de estruturas polimeristemáticas, se deu pela técnica de biobalística. Os brotos selecionados (700 unidades) foram inoculados em agrupamento em forma de círculo com 15 mm de diâmetro, localizado na parte central da placa de Petri contendo meio semissólido MS Sigma 2,2 g, 30 g de sacarose, 12 g de phytigel Sigma e pH de 5,8, conforme Ferreira (2016). Em seguida, os brotos foram submetidos ao bombardeamento de acordo com a metodologia de Ivo et al. (2008), Rech et al. (2008) e Ferreira, (2016).

3.2.5 Regeneração e seleção dos brotos

Uma semana após o bombardeamento, os brotos foram inoculados em meio MS de seleção suplementado com 2,0 μM de Imazapyr durante 30 dias, nas mesmas condições de cultivo citadas anteriormente. Após esse período, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência e a taxa de multiplicação dos brotos.

Posteriormente, os brotos sobreviventes foram novamente inoculados em meio MS de seleção, conforme citado. Porém, nesta etapa do experimento, a concentração do herbicida foi elevada para 3,0 μM . Essa estratégia foi adotada com o intuito de eliminar as possíveis quimeras e/ou as plantas que tiveram escape na etapa anterior. Foi realizada mais uma avaliação após 30 dias cultivo para quantificar a sobrevivência e a taxa de multiplicação dos brotos.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos do herbicida sobre os brotos foram avaliados após 30 dias de cultivo. A concentração de 2,0 μM foi considerada mais apropriada para selecionar os brotos eventualmente transformados, pois essa concentração impediu o desenvolvimento e a multiplicação dos brotos, que conseqüentemente apresentaram necrose (Figura 1).

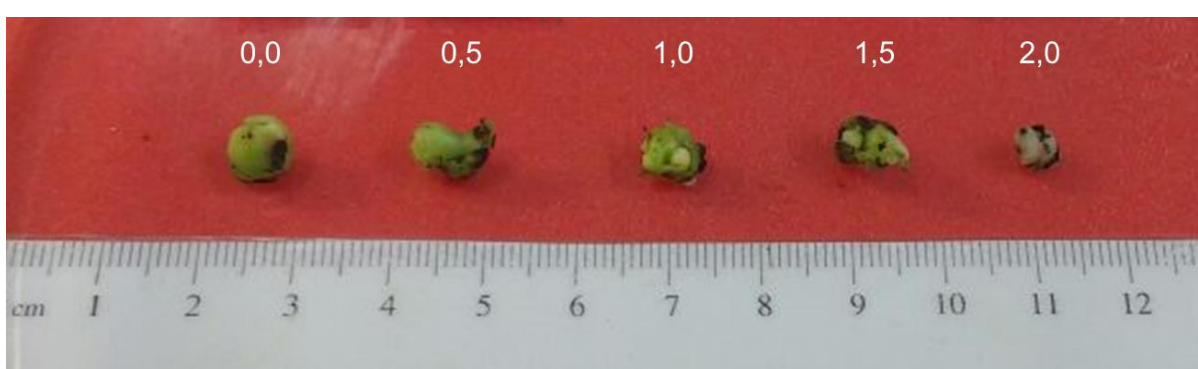


FIGURA 1: Efeito de diferentes concentrações do herbicida Imazapyr μM sobre o desenvolvimento de brotos de bananeira vc. Maçã com 30 dias de cultivo.

No processo de transformação genética foram bombardeados com o vetor pAHASMCDEF1 um total de 700 brotos obtidos da multiplicação de estruturas polimeristêmáticas. Uma semana após esse processo, 12,5% dos brotos foram descartados, devido à contaminação por fungos e bactérias, sendo a outra parte reinoculada em meio de seleção com o herbicida Imazapyr a 2,0 μM .

Após 30 dias de cultivo, 7,3% dos brotos não sobreviveram devido à necrose de seus tecidos decorrentes da ação do herbicida, indicando alta eficiência quanto à resistência ao herbicida (Figura 2- G). Dos 92,6% brotos que sobreviveram, 21,5% não apresentaram multiplicação e 78,4% multiplicaram a uma média de emissão de dois brotos por explante (Tabela 1).

Depois das plantas terem sido estabelecidas nesse processo inicial de seleção, foram submetidas a mais uma etapa, onde a pressão de seleção foi elevada para 3,0 μM de Imazapyr. Nessa etapa, a mortalidade dos brotos se manteve baixa com valores de 0,1%. O número de brotos que apresentaram capacidade de se multiplicar, nessa condição, foi de aproximadamente 44,5% obtendo-se uma média de 0,8 brotos por explante (Tabela 1).

TABELA 1: Avaliação da sobrevivência e do desenvolvimento de bananeira cv. Maçã transformadas por biobalística, após 30 dias de cultivo em meio de seleção suplementado com 2,0 μM e 3,0 μM do herbicida Imazapyr.

Imazapyr (μM)	Nº total Brotos	Sobrevivência (%)	Mortalidade (%)	Nº de explantes com brotos (%)	Nº de explantes sem brotos (%)	Nº total de brotos gerados	Média dos brotos gerados
2,0	612	92,65 \pm 0,03	7,35 \pm 0,02	78,48 \pm 0,01	21,52 \pm 0,07	1.228	2,17 \pm 0,02
3,0	973	99,90 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	44,50 \pm 0,90	55,50 \pm 0,09	779	0,80 \pm 0,25

\pm desvio padrão.

No que se refere à concentração do Imazapyr testado nos brotos bombardeados, foi possível analisar que a concentração mais elevada reduziu a porcentagem dos brotos que apresentaram novas multiplicações, que foram de 78% com 2,0 μM para 44% de brotos com 3,0 μM . Conseqüentemente, tem-se uma drástica diminuição na média de brotos gerados que era de 2 e caiu para 0,8 broto formado por explante (Tabelas 1).

Com o mesmo intuito de reduzir o percentual da taxa de escape em células meristemáticas de feijão-caupi, Ivo et al. (2008) elevou a concentração do Imazapyr de 200 nM, que já impedira o alongamento dos brotos, para 300 nM, porém o número de plantas sobreviventes nessa concentração foi muito baixo, sendo essa estratégia pouco eficiente para a espécie.

No caso da bananeira esse procedimento é de fundamental importância, pois a planta tem uma rápida multiplicação devido ao seu sistema de reprodução. E, devido à área de exposição dos brotos no momento do bombardeamento, que por ser uma circunferência, pode tanto favorecer o crescimento de plantas transformadas quanto de não-transformadas. Portanto, a redução na taxa de multiplicação decorrente da ação do Imazapyr, que age inibindo a enzima acetolactato sintase, que atua na via metabólica de biossíntese dos aminoácidos, impediu a multiplicação de novos brotos não transformados.

A seleção dos brotos transformantes usando o herbicida Imazapyr como agente seletivo foi eficiente em brotos oriundos de *scalps*, e a adição do gene *Atahas* que confere resistência ao herbicida pode ser aplicada na transformação genética de bananeira como um marcador de seleção, onde plantas que sobreviveram aos tratamentos de seleção têm grande probabilidade de serem transgênicas (Figura 2 - G, H e I). Matsumoto et al. (2002), realizaram o mesmo estudo de transformação genética com a adição de um gene de resistência ao Imazapyr, concluindo que o método foi eficiente na seleção de plantas de bananeira transformadas.

Embora os estudos de transformação genética por meio de suspensões celulares venham sendo desenvolvidos com sucesso, sabe-se que essa técnica apresenta como principal desvantagem a dificuldade de regenerar embriões. Vale ressaltar, também, que a metodologia de obtenção dessas células demanda um longo período de tempo e, conseqüentemente, um tempo maior de estudo.

Matsumoto et al. (2002), desenvolveram um excelente e simples sistema de bombardeamento para geração de bananeiras transgênicas a partir de células embriogênicas, porém foram necessários oito meses, em diferentes tipos de cultivos, para obtenção das células para realizar transformação genética. Houllou-Kido et al. (2005), realizaram a transformação genética, via biobalística na cultivar de banana Maça, após 6 meses de desenvolvimento das suspensões celulares, e concluíram que o bombardeamento de partículas em suspensões celulares reduz a eficiência de regeneração da planta.

Tripathi et al. (2008) desenvolveram um protocolo eficiente de transformação genética em bananeira baseado na regeneração direta de brotos de tecidos meristemáticos, por meio de finas seções transversais excisadas a partir do rizoma. Para os autores, este sistema evita a formação de culturas de calos e suspensão celular que podem causar variações somaclonais. Contudo, o uso da organogênese possibilita a recuperação das plantas regeneradas em um curto período de tempo, permitindo assim, uma produção rápida de plantas transgênicas de bananeira sem envolver desenvolvimento demorado de culturas de células. Mas por outro lado, essa técnica exige muita precisão, pois as excisões devem ter entre 0,4 mm-0,6 mm.

Liu et al. (2017), desenvolveram um sistema de transformação genética robusto e repetitivo utilizando a organogênese direta para a bananeira, semelhante ao utilizado nesse trabalho, onde as seções longitudinais de gemas foram transformadas através de bombardeamento de partículas. Esses autores produziram com sucesso centenas de plantas transformadas, porém essa técnica foi desenvolvida a partir de flores masculinas imaturas, o que limita sua aplicação pela dependência de áreas de cultivo ou de Banco Ativo de Germoplasma de bananeira.

A eficiência da transformação genética via biobalística por meio da técnica de organogênese tem se mostrado eficiente na cultura da bananeira. A associação desta técnica com a adaptação do método *Scalp* (Strosse et al. 2006), para multiplicação de estruturas polimeristemáticas e posterior formação de brotos, reduziu o tempo de obtenção dos explantes, assim como favoreceu a regeneração dos brotos após a fase de transformação (Figura 2).

Os altos valores de sobrevivência indicam que este método pode ser viável para a transformação genética de bananeira, onde possíveis plantas transgênicas foram regeneradas após a seleção de resistência ao herbicida.

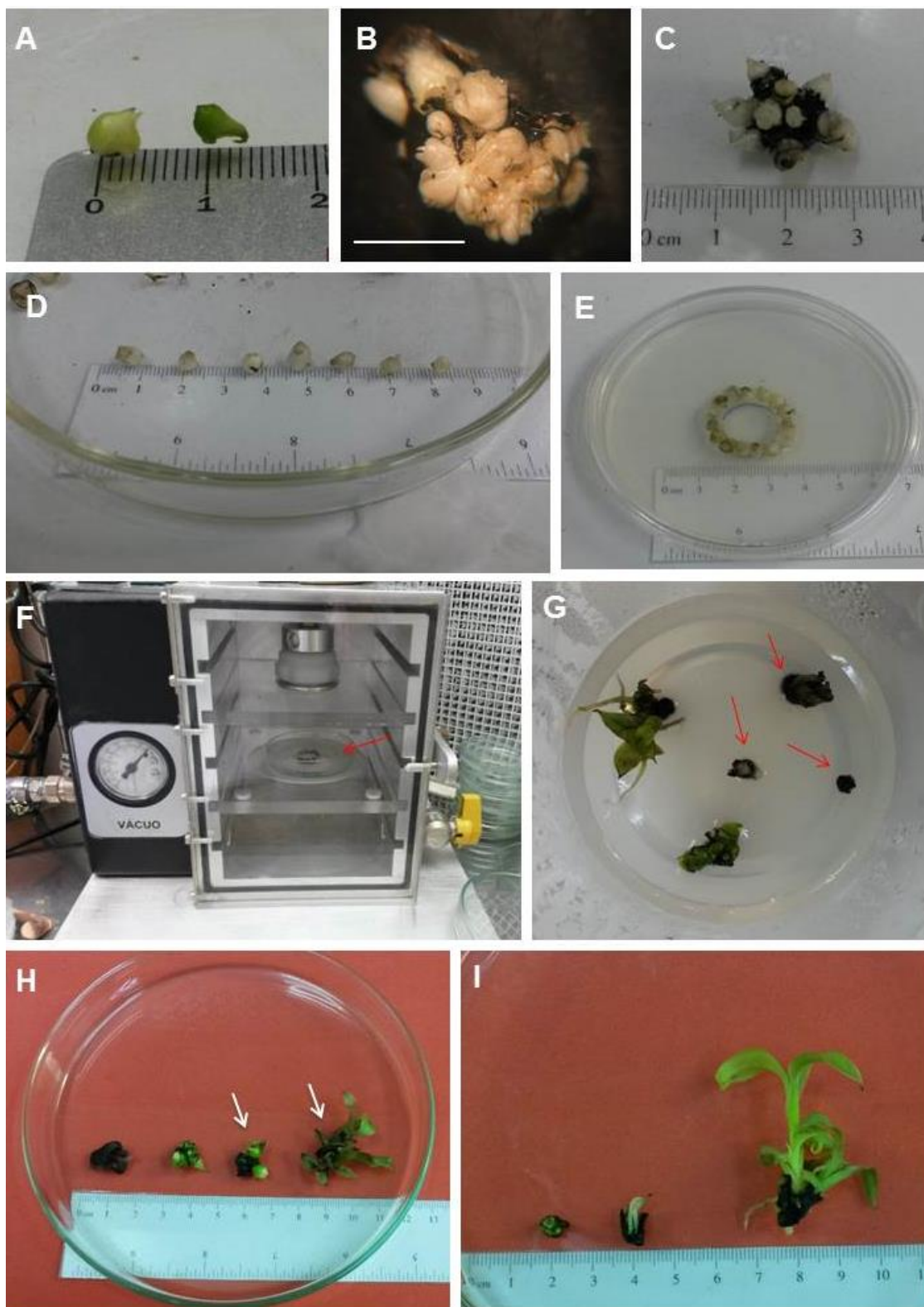


FIGURA 2: Etapas da transformação genética. A: brotos fase inicial. B e C: estrutura polimeristêmica em formação e, multiplicação e regeneração dos brotos após dois meses, respectivamente. D: individualização e seleção dos brotos. E: inoculação dos brotos de forma circular. F: equipamento *Gene gun* para transformação genética. Brotos necrosados (G) e regenerados (H), após bombardeamento, na etapa de seleção com 2,0 μM de Imazapyz. I: plantas não-transformadas (esquerda) e planta transformada (direita), respectivamente, 30 dias depois de cultivada em meio de seleção mais concentrado com 3,0 μM de Imazapyz. Barra: 1 cm.

3.4. CONCLUSÃO

- A técnica de multiplicação das estruturas polimeristemáticas, via *Scalp*, é capaz de reduzir o tempo de multiplicação e obtenção de brotos na organogênese e favorece a regeneração dos brotos após transformação genética.

REFERÊNCIAS

FAOSTAT- **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division**. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 27. abril. 2017.

BORTH, W.; PEREZ, E.; CHEAH, K.; CHEN, Y.; XIE, W. S.; GASKILL, D.; KHALIL, S.; SETHER, D.; MELZER, M.; WANG, M.; MANSHARDT, D.; GONSALVES, D.; HU, J. S. Transgenic banana plants resistant to banana bunch top virus infection. **Acta Horticulturae**, v. 897, n. 58, p. 449–457, 2011.

CHONG-PÉREZ, B.; REYES, M.; ROJAS, L.; OCAÑA, B.; PEREZ, B. KOSKY, R. G.; ANGERON, G. Establishment of embryogenic cell suspension cultures and Agrobacterium-mediated transformation in banana cv. 'Dwarf Cavendish' (*Musa AAA*): effect of spermidine on transformation efficiency. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n. 1, p. 79-90, 2012.

FERREIRA, J. D. C. **Expressão diferencial e transformação genética de uma defensina de Momordica Charantia em Vigna unguiculata**. 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

HOULLOU-KIDO, L. M.; KIDO, E. A.; FALCO, M. C.; FILHO, M. C. S.; FIGURAEIRA, A. V. O.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; NETO, A. T. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.11, p.1081-1086, 2005.

IVO, N. L.; NASCIMENTO, C. P.; L. S.; CAMPOS, F. A., ARAGÃO, F, J. L. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 9, p. 1475-1483, 2008.

LIU, J.; GAO, P.; SUN, X.; ZHANG, J.; SUN, P.; WANG, J.; JIA, C.; ZHANG, J., HU, W.; XU, B. JIN, Z. Efficient regeneration and genetic transformation platform applicable to five *Musa* varieties. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 33–38, 2017.

MATSUMOTO, K.; MORAIS, L. S.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. S.; RECH, E. L. Genetic transformation of Banana embryogenic cells through particle bombardment using a herbicide resistance gene as selectable Marker. **Acta Horticulturae**, v. 575, n.3, p. 61-67, 2002.

MENEZES, H. Imunidade inata e específica em plantas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, n. 2, p. 195-212, 2009.

MOHANDAS, S.; SOWMYA, H. D.; MANJULA, R. PRATIBHA, K. Y.; MEENAKSHI, S.; AJAY, K. M. Development of highly regenerative embryogenic cell suspensions of 'Nanjangud Rasbale' (syn.'Rasthali', *Musa*, AAB, Silk subgroup) and transformants with AMP gene. **Acta Horticulturae**, v. 897, n. 27, p. 245–253, 2011.

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

NAWROT, R.; BARYLSKI, J.; NOWICKI, G.; BRONIARCZYK, J.; BUCHWALD, W.; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK. A. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 181-196, 2014.

ORTIZ R. Conventional banana and plantain breeding. **Acta Horticulturae**, v. 986, n. 19, p. 77–194. 2013.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, v. 3, n. 3, p. 410–418, 2008.

SILVA, O. S.; 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 casual do mal do Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 137-143, 2011.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: Estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013.

STROSSE, H.; SCHOOF, H.; PANIS, B.; ANDRE, E.; REYNIERS, K.; SWENNEN, R. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). **Plant Science**, v. 170, n.1, p. 104–112, 2006.

SWARUPA, V.; RAVISHANKAR, K. V.; REKHA, A. Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. **Planta**, v. 239, n. 4, p. 735-751, 2014.

TRIPATHI, L.; JAINDRA NATH TRIPATHI, J. N.; TUSHEMERIRWE, W. K. Rapid and efficient production of transgenic East African Highland Banana (*Musa* spp.) using intercalary meristematic tissues. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 10, p. 1438-1445, 2008.

CONCLUSÃO GERAL

Em virtude da relevância que a bananicultura representa ao cenário mundial e, dos fatores que afetam seu cultivo, ocasionando grandes perdas na sua produção e, da complexidade de melhorar essa espécie pelo método de melhoramento genético convencional, faz-se necessário adotar novas estratégias aliadas às novas ferramentas da biotecnologia aplicadas ao melhoramento genético de plantas, que permitam gerar novos genótipos com maior variabilidade genética e assim, acelerar o desenvolvimento de novas variedades de *Musa* spp. com boas características agronômicas.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que a adaptação da metodologia *Scalp* foi eficiente na indução de calos friáveis em bananeiras das cultivares brasileiras Maçã e Pacovan e que o processo de obtenção das estruturas polimeristêmicas pode ser reduzido para um ou dois meses, acelerando assim, os processos da embriogênese somática bem como, o de multiplicação de brotos pela organogênese direta. A aplicação e adaptação desta metodologia tendo pequenos brotos como fonte de explante trouxe a independência da cultura em manter o cultivo das plantas em campo e, também, da sua fase reprodutiva, já que o tecido de flores masculinas imaturas vem sendo utilizado como principal fonte de obtenção de tecido meristemático. Dessa forma, todo o processo de obtenção e desenvolvimento dos explantes podem ser realizados *in vitro*, proporcionando várias aplicações dentro da cultura de tecidos, além de ser um método aplicável para outras cultivares de *Musa*.

A tentativa de ampliar a variabilidade genética da espécie em estudo, por meio da mutagênese e da transformação genética mostrou-se eficiente para os dois métodos avaliados. Na mutagênese química o tratamento com o mutagênico elevou a sobrevivência das plantas no teste de resistência ao agente seletivo ácido fusárico nas duas cultivares estudadas, possibilitando identificar os tratamentos com maior potencial de resistência ao *Fusarium* e/ou com maior variabilidade genética. Na transformação genética a seleção com o herbicida Imazapyr foi eficiente na triagem dos brotos com resistência e as plantas que foram regeneradas têm grande potencial de serem transgênicas contendo um gene da família das defensinas com

potencial propriedade antifúngica. Estudos de análise molecular estão sendo realizados para comprovação das plantas transformadas.

Outros estudos como a caracterização agronômica e molecular, expressão gênica e testes de resistência ao *Fusarium* são necessários para a avaliação das plantas sobreviventes (possíveis mutantes e transgênicas) e para identificar material com características promissoras aplicáveis ao melhoramento genético da bananeira.