**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM TRÊS CULTIVARES
DE BANANEIRA (*Musa* spp., GRUPOS AAA E AAB)**

ORIEL FILGUEIRA DE LEMOS

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Akihiko Ando

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Agronomia, Área de concentração: Genética e Melhoramento de plantas.

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1994**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Lemos, Oriel Filgueira de

L557e Embriogênese somática em três cultivares de banana (Musa spp., Grupos AAA e AAB). Piracicaba, 1994.

159p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Banana - Embriogênese somática 2. Banana - Melhoramento I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.772

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM TRÊS CULTIVARES
DE BANANEIRA (*Musa* spp.; GRUPOS AAA E AAB)**

Oriel Filgueira de Lemos

Aprovada em: 27/10/94

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Akihiko Ando	ESALQ/USP
Dr. Francisco Javier Zapata-Arias	ESALQ/USP
Dr. Milton Guilherme da Costa Mosta	UFPA/PA

Prof. Dr. Akihiko Ando
Orientador

Àquele que nos fez
a sua imagem e
semelhança,
dou graças.

Aos meus pais Idamor e
Joana Lemos,
aos meus irmãos e
à minha esposa
Rosinele Lemos,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao CPATU/EMBRAPA pela oportunidade concedida.

À ESALQ/USP, através do Departamento de Genética, por ter permitido realizar o Curso.

Ao Dr. Ando pela Orientação, amizade e experiência transmitida.

Ao Dr. Francisco J. Zapata-Arias pelos ensinamentos, amizade e dedicação na execução dos trabalhos.

Ao Dr. Milton Mota pela amizade e por ter despertado em mim, optar pela área de biotecnologia.

Ao amigo Daniel Scherer de Moura pela solidariedade em todos os momentos da execução desta dissertação.

Ao Laboratório da Seção de Radiogenética, do CENA/USP, onde foi desenvolvida esta dissertação.

Aos técnicos Inês F. P. Rodrigues e Wlamir de Aguiar Godoy pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais.

À Dr^a. M. J. Mendez e Dr. Augusto Tulmann Neto pelo apoio na execução dos trabalhos.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para tornar realidade esta dissertação, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Importância da cultura	05
2.2. Características gerais da bananeira	06
2.3. Principais problemas da cultura	09
2.4. Considerações quanto ao melhoramento	10
2.5. A biotecnologia vegetal como instrumento de melhoramento	15
2.5.1. Micropropagação <i>in vitro</i>	20

2.5.2. Embriogênese somática	25
2.5.2.1. Explante	31
2.5.2.2. Meios de cultivo	33
2.5.2.3. Condições de cultivo	38
2.5.2.4. Estabilidade genética	40
2.5.3. Células em suspensão	41
2.5.4. Protoplastos e regeneração de plantas	44
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 50
3.1. Introdução e cultivo de ápices caulinares	52
3.1.1. Obtenção e preparo dos ápices caulinares	52
3.1.2. Assepsia e excisão dos ápices caulinares	52
3.1.3. Cultivo de ápices caulinares	54
3.2. Testes de multiplicação e desenvolvimento de plântulas <i>in vitro</i>	55
3.3. Embriogênese somática	57
3.3.1. Indução de calos e/ou massa globular	58
3.3.1.1. Escolha do tipo de explante	58
3.3.1.2. Testes de concentrações de dicamba para indução de calos e/ou massa globular ...	65
3.3.1.3. Testes para melhorar qualidade de calos e/ou massa	

globular em meio de indução	67
3.3.2. Desenvolvimento de estruturas globulares	69
3.3.3. Maturação e germinação das estruturas globulares	71
3.3.4. Formação e desenvolvimento de plântulas	74
3.3.5. Aclimação e crescimento de plantas	76
3.4. Células em suspensão	78
3.5. Isolamento de protoplastos	79
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1. Introdução e cultivo de ápices caulinares .	81
4.2. Multiplicação e desenvolvimento de plântulas <i>in vitro</i>	82
4.3. Embriogênese somática	86
4.3.1. Tipo de explante	86
4.3.2. Testes de concentração de dicamba na indução de calos e/ou massa globular	96
4.3.3. Testes para melhorar a formação de calos e/ou massa globular	102
4.3.4. Desenvolvimento de estruturas globulares	104
4.3.5. Maturação e germinação das estruturas globulares	108
4.3.6. Formação e desenvolvimento de plântulas	115

	vii
4.3.7. Aclimação e crescimento das plantas	120
4.4. Células em suspensão	122
4.5. Isolamento de protoplastos	123
4.6. Prospecto do trabalho para o futuro	127
5. CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
APÊNDICES	146

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº

Página

1. Análise conjunta da variância baseada em número de brotos emitidos por cultivar de bananeira em diferentes meios de cultivos a vários subcultivos 83
2. Comparação de médias de número de brotos emitidos por cultivares a diferentes meios de cultivo após 3 subcultivos e 10 repetições por tratamento 85
3. Percentagem de explantes com resposta à indução de calos de segmentos de plântulas da cultivar Prata após 30 dias de incubação sob meio SH suplementado com diferentes concentrações de dicamba e 2,4-D 87
4. Percentagem de explantes com resposta à indução de calos em segmentos de plântulas da cultivar Mysore após 30 dias de incubação em meio SH suplementado com diferentes concentrações de dicamba e 2,4-D 88
5. Respostas de diferentes segmentos de plântulas da cultivar Prata à ação de meio SH suplementado com dicamba após 30 dias de cultivo 89
6. Respostas de diferentes explantes sob a ação de meio SH suplementado com dicamba após 20 e 28 dias de cultivo, das cultivares GN e Mysore, respectivamente 91
7. Respostas de diferentes explantes sob a ação de meio SH suplementado com dicamba após 40 e 60 dias de cultivo para a cultivar GN e 30 dias de cultivo para a cultivar Mysore 94
8. Efeitos de diferentes concentrações de dicamba em meio SH sobre explantes (**tipo F**) das cultivares GN, Mysore e Prata, aos 35, 22 e 30 dias de cultivo, respectivamente 97
9. Efeitos de diferentes concentrações de dicamba em meio SH sobre explantes (**tipo F**) da cultivar Mysore após 15 e 30 dias de cultivo 99
10. Número de plântulas regeneradas via embriogênese somática das três cultivares envolvidos no trabalho 116

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº	Página
1. Esquema mostrando as etapas desenvolvidas no trabalho com três cultivares de bananeira (grupos AAA e AAB)	51
2. Esquema para introdução e multiplicação de ápices caulinares	53
3. Esquema para testes de multiplicação e desenvolvimento de plântulas	56
4. Esquema para escolha do tipo de explante na indução de calos e/ou massa globular	59
5. Regiões de plântulas <i>in vitro</i> testadas como explante	60
6. Esquema para testar várias concentrações de dicamba na indução de calos e/ ou massa globular	66
7. Esquema usado para melhorar qualidade de massa globular	68
8. Esquema para desenvolvimento de estruturas globulares em meio líquido sob agitação	70
9. Esquema utilizado para maturação e germinação de estruturas globulares	73
10. Esquema usado para obtenção de formação e desenvolvimento de plântulas	75
11. Esquema usado para aclimação e crescimento de plantas obtidas via embriogênese somática	77
12. Resposta de explante à indução de calos e/ou massa globular	92
13. Resposta de diferentes explantes à indução de calos e/ou massa globular	95

14. Indução de calos e/ou massa globular a diferentes concentrações de dicamba em explante Tipo F	101
15 . Desenvolvimento de estruturas globulares	107
16 . Formação de estruturas globulares verdes com superfície lisa em meio SH com 10 μ M dicamba combinado com zeatina (1-2 μ M) sob luz	109
17. Sequência de conversão de embrião somático isolado em plântula	112
18. Sequência de conversão de embrião agregado ao explante em plântula	114
19. Formação e desenvolvimento de plântula em meio líquido sem reguladores de crescimento	117
20. Aclimatação e crescimento normal das plantas, regeneradas de embriogênese somática, sob casa de vegetação	121
21. Células em suspensão e isolamento de protoplastos de mesofilo foliar	124

LISTA DE ABREVIATURAS

Neste trabalho foram usadas as seguintes abreviaturas:

ABA - Ácido abscísico

AG₃ - Ácido giberélico

B5 - Meio de cultura descrito por GAMBORG et al. (1968)

BAP - 6-benzil-aminopurina

BOD - Estufa incubadora com temperatura controlada

CPW - Solução de nutrientes descrita por FREARSON et al.
(1973)

Dicamba - Ácido 3,6 dicloro-2-metoxibenzóico

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

IBA - Ácido indolbutírico

IAA - Ácido 3-indolacético

2ip - Isopenteniladenina

IRRI - International Rice Research Institute

KIN - Cinetina

MES - 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid

MS - Meio de cultura descrito por MURASHIGE & SKOOG (1962)

NAA - Ácido naftalenoacético

R2 - Meio de cultura descrito por OHIRA et al. (1973)

rpm - Rotações por minuto

SH - Meio de cultura descrito por SCHENK & HILDEBRANDT
(1972)

w/m² - Medida de intensidade de iluminação

ZEA - Zeatina

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM TRÊS CULTIVARES DE BANANEIRA (*Musa* spp., GRUPOS AAA E AAB)

Autor: Oriel Filgueira de Lemos

Orientador: Akihiko Ando

RESUMO

As técnicas *in vitro* serão uma alternativa para o melhoramento da cultura da bananeira, mas o estabelecimento de sistemas eficientes de regeneração de plantas é indispensável para sua utilização.

O presente trabalho foi desenvolvido para estudar embriogênese somática nos cultivares GN (grupo AAA), Mysore e Prata (ambos do grupo AAB).

Os melhores resultados para propagação de plantas foram obtidos quando ápices caulinares foram cultivados em meio de Murashige & Skoog (1962), contendo BAP (4,5 mg.l⁻¹), sacarose a pH 5,8.

As plantas propagadas *in vitro* foram submetidas a meio de Schenk & Hildebrandt (1972) com 10 µM de dicamba para indução de calos e/ou estruturas globulares. As estruturas globulares produzidas foram colocadas no meio

líquido $\frac{1}{2}$ MS ou R2 (Ohira et al., 1973) sem reguladores de crescimento vegetal para induzir embriões somáticos. Os embriões somáticos produziram plantas que estão presentemente crescendo em casa de vegetação.

Os resultados obtidos sobre regeneração de plântulas de bananeira, via embriogênese somática, são pela primeira vez reportados no Brasil. Entretanto, maiores estudos serão necessários para obter uma maior eficiência de regeneração de plantas.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN THREE CULTIVARS OF BANANA CROPS (*Musa* spp., AAA AND AAB GROUPS)

Author: Oriel Filgueira de Lemos

Adviser: Akihiko Ando

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SUMMARY

In vitro techniques could be an alternative for banana improvement but establishment of efficient systems of plant regeneration is indispensable for its utilization.

The present work was carried out to study somatic embryogenesis in cultivars GN (AAA group), Mysore and Prata (both AAB group).

The best results for plant propagation were obtained when shoot apices were placed on Murashige & Skoog (1962) medium containing BAP (4,5 mg.l⁻¹) and sucrose at pH 5,8.

In vitro propagated plants were placed on Schenk & Hildebrandt (1972) medium with 10 µM dicamba for

induction callus and/or globular structures. The globular structures produced were placed on $\frac{1}{2}$ MS or R2 (Ohira et al., 1973) liquid medium without growth regulators to induce somatic embryos. Somatic embryos produced plants which at present are growing in the greenhouse.

The results obtained on regeneration of banana plantlets via somatic embryogenesis are reported for the first time in Brazil. However, more studies will be necessary to get higher efficiency of plant regeneration.

1 - INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa spp.*) está entre as culturas mais importantes do mundo. É fonte de calorias para milhões de pessoas, principalmente na África, Ásia, América Latina e Caribe. Para alguns países é fruto de maior exportação, constituindo-se fonte essencial de divisas para a economia nacional.

O Brasil é o maior produtor de banana na América do Sul e segundo maior produtor mundial, com uma produção acima de 5,65 milhões de toneladas anuais, contribuindo decisivamente na produção mundial de quase 50 milhões de toneladas por ano (FAO, 1993).

A cultura está sujeita a várias doenças e pragas. Encontram-se entre as doenças mais importantes, o mal-do-panamá, mancha foliar de sigatoca e sigatoca negra, cujo controle químico é de custo econômico muito elevado. Outras doenças causadas por vírus, nematóides, bactérias, prejuízos causados por *Cosmopolites sordidus*, e características agronômicas indesejáveis são os principais problemas para a sua produção (CRONAUER & KRIKORIAN, 1986).

O melhoramento convencional para obtenção de novos cultivares de bananeira enfrenta muitas barreiras, desde o dispendioso trabalho para a sua realização, principalmente pela extrema dificuldade de cruzamento sexual, porque somente poucos clones diplóides produzem pólen viável para uso com alguns clones triplóides que produzem gametas femininos férteis. Ademais, a maioria dos clones mais importantes comercialmente são completamente estéreis. Consequentemente, quase todas as variedades cultivadas são clones triplóides selecionados na natureza e domesticados pelo homem (NOVAK et al. 1989).

A cultura de tecidos apresenta algumas alternativas para auxiliar nos programas de melhoramento. A micropropagação via ápices caulinares tem permitido propagação rápida de mudas sadias e de boa qualidade e produção de plantas livres de vírus que no campo vêm apresentando bons resultados de rendimentos na produção. Assim também, selecionado um genótipo com características desejáveis, este pode ser rapidamente propagado por esta técnica (DE GUZMAN et al. 1976, KRIKORIAN & CRONAUER, 1984 e GUPTA, 1986).

Entretanto, segundo ISRAELI et al. (1991), a micropropagação via cultura de ápices caulinares, apesar da boa eficiência de multiplicação, tem apresentado como grande desvantagem a ocorrência de variação somaclonal. Por outro

lado, uma maior eficiência do melhoramento por mutação tem somente sido possível através desta técnica, mas normalmente gera quimerismo e torna difícil a obtenção de mutantes sólidos.

A embriogênese somática é considerada um sistema de regeneração de plantas via embriões originados, teoricamente, a partir de células simples. Constitui-se um sistema de propagação clonal em massa, onde, a partir de células somáticas de tecidos diferenciados, podem ser produzidas várias centenas ou milhares de plantas.

Em cultivares de *Musa*, resultados promissores de regeneração de plantas via embriogênese somática a partir de células em suspensão foram obtidos por NOVAK et al. (1989) e DHED'A et al. (1991). Neste trabalho, ressalta-se que o processo de regeneração de plantas via embriogênese somática não passou pela fase de calos, resultando em menor risco de ocorrência de variantes somaclonais.

Sistemas como embriogênese somática e protoplastos, que permitem regeneração de plantas a partir de uma única célula, são fundamentais e cruciais como forma de pronta produção e/ou seleção de germoplasma tolerante ou resistente a pragas e doenças, ou com características agronômicas superiores, quer pelo uso de engenharia genética na introdução de genes exógenos, quer pelo uso de

mutagênicos. Este último, através desse sistema tem a grande vantagem de produzir mutantes sólidos.

Ressalta-se que, na maioria das espécies nas quais plantas foram regeneradas via embriogênese somática, a eficiência tem sido baixa. Portanto, para emprego dessas técnicas para melhoramento de plantas, o processo para alta eficiência de regeneração de plantas precisa ser viabilizado.

Em *Musa*, baixa regeneração de plantas via embriogênese somática tem sido mencionada, bem como dificuldades em iniciar e manter suspensão de células embriogênicas, e raros sucessos no isolamento de protoplastos e regeneração de plantas. Contudo, PANIS et al. (1993) conseguiram regenerar plantas de um clone de *Musa* a partir de suspensão de células embriogênicas, cujo processo de regeneração se deu via embriogênese somática direta.

Este trabalho teve como objetivo principal obter regeneração de plantas via embriogênese somática em cultivares de bananeira plantadas no Brasil, tais como Grande Naine (GN) do grupo AAA e, Mysore e Prata, ambos do grupo AAB, de modo a oferecer uma nova alternativa para propagação clonal em massa, assim como possibilitar o uso mais eficiente de melhoramento por mutação e futuros trabalhos de manipulação genética.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Importância da cultura

A cultura da bananeira e plátanos é de grande importância para muitos países tropicais e subtropicais, constituindo-se fonte de alimentos para milhões de pessoas em todo mundo. Para alguns países, é fruto de maior exportação e fundamental para gerar divisas para suas economias nacionais.

É uma cultura típica de países em desenvolvimento, sendo principalmente cultivada na Ásia, América do Sul, América Central e Norte (México), e África. Tem grande destaque no Brasil, colocando-o como o maior produtor na América do Sul e segundo no mundo, com uma produção acima de 5,65 milhões de toneladas anuais, sendo a produção mundial ao redor de 50 milhões de toneladas por ano. Contudo, apesar de ser um fruto tipicamente de exportação em alguns países produtores, no Brasil quase toda a produção de banana é para o consumo interno, chegando a exportar um pouco mais de 38 mil toneladas em 1991 mas decrescendo, desestimulada principalmente pela baixa qualidade dos frutos (FAO, 1993; ver APÊNDICES 1, 2 e 3).

O fruto tem elevado valor calorífico, rico em carboidratos, proteínas, fibras e teores consideráveis de P,

Ca, Fe, Cu, Zn, I, Mn e Co, além de vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina e vitamina C. Pode ser consumido in natura ou industrializado, como farinhas, cremes, passa, purê, néctar, bananada, balas, geléia, vinho e vinagre (SIMÃO, 1971; MOREIRA, 1987 e STOVER & SIMONDS, 1987).

A bananeira tem também demonstrado importância para produção de tanino, látex e fibras. Além disso, tem aumentado sua importante função como aditivo de gasolina e álcool (CRONAUER & KRIKORIAN, 1986)

2.2 - Características gerais da bananeira

A bananeira é uma planta tropical, monocotiledônea e herbácea, com raízes fibrosas e com caule verdadeiro subterrâneo denominado rizoma, cujo gênero *Musa* é o mais importante (MOREIRA, 1987). Embora de grande porte, seu ponto de crescimento é relativamente pequeno e o ápice caulinar toma a forma de uma cúpula central de células meristemáticas e órgãos laterais (BARKER & STEWARD, 1962).

As espécies selvagens *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* são diplóides ($2n = 22$) e pertencem à série *Eumusa* do gênero *Musa*. Da hibridização entre elas, durante o processo de evolução, tem resultado a emergência de cultivares de vários níveis de ploidia e fórmula de genoma.

Simmonds & Shepherd¹, citados por CRONAUER & KRIKORIAN (1986), designaram por genoma A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), sendo essas duas espécies de genoma AA e BB, respectivamente. Outros genomas de ocorrência natural são AB, AAA, ABB, AAB, ABBB e AAAA (genomas BBB ou BBBB não têm sido observados na natureza).

Destaca-se que a espécie *M. acuminata* tem como centro primário de diversidade a região da Indonésia-Malásia e possui o tão chamado genoma A. Plantas dessa espécie ocorrem como diplóides em ambas as formas selvagens, partenocárpica e produtoras de sementes. Enquanto *M. balbisiana* tem como centro primário de diversidade a Índia, na região do subcontinente Malaio, possui o genoma B, mas somente ocorrem plantas diplóides produtoras de sementes. Todos os tipos de *M. acuminata* e alguns clones híbridos têm mais ou menos frutos doces e, conseqüentemente podem ser consumidos não cozidos, e são chamadas bananas de sobremesa (KRIKORIAN & CRONAUER, 1984).

Os clones predominantes no comércio são triplóides e estéreis, com produção de frutos frescos, sem sementes, através da partenocarpia. Os cultivares comestíveis na ordem decrescente de número cultivado são triplóides,

¹SIMMONDS, N.W. & SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal Linnean Society London Botany*, London, **55**: 302-12, 1955.

diplóides e tetraplóides. Os plátanos são considerados de constituição genômica AAB e formam uma cultura de matéria-prima de alimento na África Central e Ocidental, na América Latina e no Caribe, onde seus frutos amiláceos são geralmente cozidos ou fritos antes do consumo (SWENNEN & VUYLSTEKE, 1993).

Os plátanos também têm sido comumente, referidos a ambos grupos triplóides AAB e ABB. Porém este último tem sido usado para designar clones de banana de cozinha ("cooking banana" - ABB), enquanto que os clones pertencentes ao grupo AAA, como banana de sobremesa ("dessert banana") (CRONAUER & KRIKORIAN, 1986).

A cultivar Grande Naine (GN) pertence ao grupo AAA, apresenta frutos de excelente sabor e resistência às raças 1 e 2 de *Fusarium* e, mundialmente, é o clone de maior cultivo e importância comercial. Os clones Prata e Mysore, pertencentes ao grupo AAB, são também muito cultivados, principalmente o primeiro no Brasil, que apresenta frutos de excelente sabor e de alto consumo. Distingue-se que o cultivar Mysore apresenta resistência a várias raças de *Fusarium* (MEDINA, 1978).

O INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain) foi estabelecido como uma rede de aglutinação dos conhecimentos sobre *Musa* do mundo e tem a responsabilidade de conservação e transferência

internacional de germoplasma de *Musa*, cuja coleção no final do ano de 1991 se compunha de 3.661 acessos, recebidos de 31 países. Ressalta-se que todos os acessos são mantidos sob cultivo *in vitro* em condições de baixo crescimento (DE SMET & VAN DEN HOUWEN, 1991).

No Brasil, a EMBRAPA, através do Centro Nacional de pesquisa de Mandioca e Fruticultura-CNPMPF, Cruz das Almas-BA, mantém uma coleção de germoplasma de *Musa* com mais de 280 acessos obtidos no país e no exterior, com representantes da maioria dos cultivares e clones selvagens, dispondo de uma ampla variabilidade genética para uso em trabalhos de melhoramento (SILVA & SHEPHERD, 1991).

2.3 - Principais Problemas da Cultura

As bananeiras e os plátanos estão sujeitos a várias doenças e pragas. Constituem-se, dentre as doenças mais importantes: o mal-do-panamá causado pelo fungo *Fusarium oxisporium f. sp. cubense* (E. F. Sm) Synd e Hans, que tem dizimado plantações; mancha foliar de sigatoca por *Mycosphaerella musicola* (estádio perfeito de *Cercospora musae*); sigatoca negra, *M. fijiensis* var. *diformis*. Controle químico dessas doenças é de custo econômico muito elevado. Outras doenças causadas por vírus, nematóides, bactérias,

danos causados por *Cosmopolites sordidus* e algumas características agronômicas indesejáveis são os principais problemas para a sua produção e devem ser priorizados em programas de melhoramento (CRONAUER & KRIKORIAN, 1986).

Em programas de melhoramento, para a cultivar GN, as principais características a serem melhoradas são resistência para a raça 4 de *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubensis*, sigatoca amarela, sigatoca negra, murcha bacteriana, nematóides e a danos causados por *Cosmopolites sordidus*. Para a cultivar Mysore, além de resistência às raças não definidas e 4 de *Fusarium*, deve-se considerar no melhoramento maior número de pencas, maiores frutos e resistência ao despencamento de frutos maduros. Já para a cultivar Prata, além de resistência às doenças, menor porte, menor ciclo de produção e maior número de pencas devem ser priorizados no programa de melhoramento (SHEPHERD, 1983).

2.4 - Considerações quanto ao melhoramento

Os trabalhos de melhoramento clássico em *Musa* têm sido sempre um esforço dispendioso, considerando-se que as plantas de bananeira são relativamente grandes, que a maioria das cultivares são altamente estéreis, e que se necessita de grandes campos para os trabalhos. Por isso, a

obtenção de novas variedades de bananeira e plátano por cruzamento sexual é extremamente difícil, particularmente porque somente poucos clones diplóides produzem pólenes viáveis para cruzamento com gametas femininos férteis de triplóides (DHED'A et al. 1991).

Por outro lado, os clones comercialmente mais importantes são na maioria triplóides e completamente estéreis, justificando a ausência de novos cultivares provenientes de cruzamentos. Por conseguinte, todas as variedades cultivadas são clones selecionados na natureza e depois domesticados (NOVAK et al. 1989).

SWENNEN & VUYLSTEKE (1993) selecionaram, a partir dos cruzamentos de um cultivar diplóide selvagem (AA) "Calcuta 4" (*M. acuminata ssp burmannicóides*) com os gametas femininos férteis de dois cultivares de plátanos (AAB) "Obino L. Ewai" e "Bobby Tannap", 4 híbridos tetraplóides (citogeneticamente confirmados) entre 133 obtidos, mostrando alta resistência à sigatoca negra. Em campo, eles produziram cachos 125% mais pesados que as plantas mães tratadas com fungicidas. O tamanho dos frutos de bananeira selvagem não se refletiu nos híbridos selecionados. Portanto, eles consideraram como clones promissores e estão investigando quanto à qualidade dos frutos e aceitabilidade pelos consumidores, e a possibilidade de usá-los como material em programas de melhoramento.

Para melhoramento por mutação induzida, a determinação da radiosensitividade é condição prévia a seu uso. Segundo NOVAK et al. (1993), em *Musa* a radiosensitividade é dependente do nível de ploidia e constituição híbrida dos genomas A e B, originários de *Musa acuminata* e *M. balbisiana*, respectivamente. São mais sensíveis os diplóides, seguidos dos triplóides AAA, AAB e ABB, e menos sensíveis o tetraplóide AAAA. Tanto radiação gama quanto mutagênicos químicos, tais como DMSO e EMS têm sido usados em cultivo de ápices caulinares para indução de mutação.

NOVAK et al. (1990) e NOVAK et al. (1993) submeteram ápices caulinares com dome apical e dois pares de primórdios de folha de vários clones de *Musa* cultivados à irradiação gama de fonte ^{60}Co e observaram que houve diferença em radiosensitividade e em plantas regeneradas após a irradiação. O clone mutante GN-60A induzido na cultivar de banana de sobremesa Grande Naine (GN) apresentou diferenças no início de floração e hábito de frutificação, e no zimograma de proteínas solúveis e da isoenzima esterase. O mutante obtido foi micropropagado, e sua progênie vegetativa está sendo testada em Honduras e Queensland. Outros mutantes putativos foram produzidos de outros cultivares e estão também sendo testados.

MATSUMOTO & YAMAGUCHI (1990) selecionaram *in vitro* variantes tolerantes à toxicidez de alumínio da cultivar Nanicão (AAA), após submeterem estruturas de crescimento (gemas) a dose de 2 kR de raios gama e cultivarem sob material sintético saturado com 10 mM de alumínio cloride suplementado com meio líquido. Uma das linhagens selecionada apresentou a mais alta tolerância à toxicidade a alumínio do que o material original. Deste material foram obtidas as plantas por micropropagação para observação em casa de vegetação, porém não mencionaram a avaliação feita em campo de produção.

Uma técnica para indução de plantas tetraplóides a partir de um clone de *Musa* diplóide micropopagado (SH-3362) foi desenvolvida com sucesso por SMITH et al. (1993). Colchicina foi aplicada em ápices caulinares em crescimento para induzir tetraploidia. As plantas selecionadas caracterizaram-se por ser mais robustas, com pseudocaule e raízes mais grossas, folhas mais largas e estômatos maiores que os diplóides. Em campo, 12 plantas permaneceram com suas características de tetraploidia por dois anos, apresentaram os pecíolos com tendência a quebrar facilmente ao vento, e produziram menos perfilhos, e, semelhante ao diplóide SH-3362, eram muito susceptíveis aos danos de frio. Têm apresentado tolerância à fusariose, pois

das plantas crescidas em áreas infectadas com a raça 4 de *Fusarium*, nenhuma tem sucumbido à doença.

Através da indução de mutação por radiação gama em meristemas cultivados *in vitro*, TAN et al. (1993) selecionaram um mutante de florescimento precoce (GN 60/r) do cultivar Grande Naine (GN). Esse mutante apresentou crescimento vigoroso e início de floração após 9 meses de cultivo em comparação com 15 meses do controle não irradiado. As plantas especialmente selecionadas por precocidade apresentaram alta capacidade de rendimento (média de peso do cacho 26 kg/planta na segunda colheita), baixa estatura, boas características do cacho e sabor, que vem sendo chamado de FATOM-1.

Para MATSUMOTO et al. (1984), uma das alternativas para contornar o problema de melhoramento convencional em bananeira via técnica *in vitro* seria o uso de fusão de protoplastos. Além disso, a biotecnologia oferece outros novos prospectos, como, por exemplo, a introdução de genes exógenos através de técnicas avançadas de transformação e a hibridização somática pela fusão de protoplastos de espécies que não seriam possíveis através da hibridação sexual (PANIS & SWENNEN, 1993).

2.5 - A biotecnologia vegetal como instrumento de Melhoramento

Os métodos *in vitro* são importantes na exploração e entendimento de novas técnicas para melhoramento de bananeira bem como de outras culturas, principalmente aquelas cujos problemas não podem ser solucionados via melhoramento convencional. As técnicas de cultura asséptica também fornecem a base para estratégias essenciais de manejo de laboratório e prática no campo (KRIKORIAN, 1990)

Um sistema controlável capaz de produzir plantas a partir de células simples ou protoplastos é um aspecto essencial e crucial da tecnologia na engenharia genética. Sem esta capacidade não há maneira confiável de produção e/ou seleção de novos germoplasmas de *Musa* tolerantes ou resistentes a doenças (KRIKORIAN & CRONAUER, 1984).

O desenvolvimento das técnicas de biotecnologia tem apresentado novas alternativas promissoras para auxiliar os programas de melhoramento vegetal, seja através da multiplicação de genótipos superiores, limpeza clonal ou introdução de genes exógenos por manipulação genética ou indução de mutação e seleção ou produção de sementes

artificiais ou conservação de germoplasma ou clonagem de genes etc.

Por isso, um dos principais objetivos da cultura de tecidos é prover uma alternativa de manipular plantas cultivadas a nível celular. Para tanto, o conhecimento dos mecanismos de regeneração de plantas é crucial, especialmente de embriogênese somática, de modo a habilitar plantas transformadas serem regeneradas, pois a regeneração de plantas completas é a maior limitação na aplicação biotecnológica para melhoramento vegetal (EMONS et al., 1993).

A regeneração de plantas a partir de culturas de células via embriogênese somática pode aumentar a possibilidade de integração de pesquisas biotecnológicas com métodos convencionais de melhoramento de bananeiras e plátanos, pois as técnicas de biologia molecular e cultura de tecidos oferecem grande potencial para superar barreiras no melhoramento convencional (DHED'A et al., 1991),

Para GUPTA et al. (1993), tanto sistemas automatizados de micropropagação quanto a embriogênese somática têm potencial para multiplicação rápida de genótipos superiores para reflorestamento, os quais podem ajudar na corrida para aumentar a produtividade florestal, considerando-se que, para espécies florestais, a

identificação e seleção de genótipos superiores demanda muito tempo.

Por considerar que a micropropagação vegetativa mantém a constituição heterozigótica de formas comestíveis de *Musa*, o sistema de melhoramento por mutação usando esta técnica, pode ser particularmente importante para espécies de *Musa* estéril, onde não há reprodução sexual que possa levar à variação genética (NOVAK et al., 1993). A regeneração de plantas de bananeira via embriogênese somática é outro método atrativo para clonagem em massa, esquemas de seleção *in vitro*, para seleção com patógenos e para estudos de transformação de plantas. Além do mais, pode ser melhor aproveitado para o método de melhoramento por mutação, pois oferecem a vantagem de evitar quimerismo, normalmente gerado em ápices caulinares tratados, que cria dificuldades na obtenção de mutantes sólidos (NOVAK et al., 1989 e DHED'A et al., 1991).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido usadas também para manter sob cultivo em condições de crescimento reduzido, coleção de germoplasma de *Musa* no INIBAP, Montpellier, França, onde mais de 1000 acessos são mantidos, assegurando fontes de variabilidade genética para trabalhos de melhoramento. A criopreservação ou preservação a longo prazo sob nitrogênio líquido a -196°C de genótipos, através de suspensão celular embriogênica de *Musa*, é uma

outra alternativa promissora, admitindo-se que nessas condições os acessos podem ser preservados por períodos ilimitados, e, ao contrário do que ocorre sob cultivo mínimo, não há riscos de variação somaclonal nem perda de acessos devido a contaminações e erros humanos durante subcultivos (PANIS & SWENNEN. 1993).

PANIS et al. (1990) desenvolveram estudos sobre criopreservação de culturas em suspensão de *Musa* (cv. Bluggoe-ABB), sob nitrogênio líquido. Após criopreservação e descongelamento, as células reiniciaram crescimento e plantas foram regeneradas via embriogênese somática.

Um outro grande potencial da cultura de tecidos é a possibilidade de produção de sementes artificiais. Segundo REDENBAUGH et al. (1988), entende-se por semente artificial um novo análogo de semente botânica, consistindo de um embrião somático envolvido por uma capa de semente artificial. A maior razão para desenvolvê-la é obter o mais desejável padrão de estabelecimento e rendimento, e só é viável se "semente clonal" tiver um custo comparável ao das sementes verdadeiras ou outra forma de propagação.

Ademais, as sementes artificiais serão benéficas para propagação de híbridos de polinização manual, de germoplasmas elites, e de plantas geneticamente transformadas, particularmente aquelas com genótipos estéreis ou instáveis (p. ex. *Musa*). Outra grande possibilidade do uso

seria a redução do tempo para obtenção de um novo cultivar, pela seleção em F1 e reprodução em massa dessa planta (FUJII et al., 1987 e REDENBAUGH et al., 1988).

Segundo GUPTA et al. (1993), para espécies florestais, nas quais a identificação de genótipos superiores demanda muito tempo, a criopreservação de culturas de células e posterior regeneração dos clones desejados via embriogênese somática constitui um instrumento promissor para o melhoramento, principalmente se sementes artificiais forem desenvolvidas como uma forma de propagação clonal em massa desses clones.

GHOSH & SEN (1994) produziram sementes artificiais de *Asparagus cooperi* ao encapsularem embriões somáticos (diâm. 4-6 mm) em alginato de sódio, cuja conversão em plantas foi 34% comparado com 45% obtida de embriões somáticos não encapsulados. Outrossim, ao armazenarem as sementes artificiais por 90 dias a 2 °C, a frequência de conversão em plantas caiu para 8,3%. Ressaltam ainda que embriões somáticos com meristemas caulinar e radicular distintos foram os estádios mais sustentáveis para encapsulamento.

Considerando-se que a introdução de DNA em protoplastos viáveis e altamente regeneráveis oferece uma oportunidade para transformação genética em bananeira, SAGI et al. (1994), trabalhando com uma suspensão de células

embriogênicas regenerável de bananeira (cv. Bluggoe, ABB), obtiveram pela primeira vez em bananeira expressão transitória do gene *uidA* de *E. coli*, um gene marcador que em plantas codifica a enzima β -glucuronidase (GUS), após transformação de protoplastos por eletroporação.

2.5.1 - Micropropagação *in vitro*

Muitos trabalhos têm apresentado que ápices vegetativos de vários clones de *Musa* são muito responsivos à técnica de multiplicação de brotações *in vitro*, caracterizando-se como uma técnica favorável à propagação clonal rápida de vários clones comercialmente importantes.

Em trabalhos conduzidos por CRONAUER & KRIKORIAN (1984a, 1984b), os ápices caulinares usados para multiplicação de vários clones de *Musa* continham 1-2 primórdios foliares de aproximadamente 1-2 mm de comprimento. Foram cultivados em meio MS com 5 mg.l⁻¹ BAP e subcultivados a cada 3-4 semanas. A taxa de multiplicação foi diretamente proporcional ao peso dos explantes e alcançou o máximo de 9 brotos por explante, cuja formação de raízes se promoveu com facilidade em meios contendo 1 mg.l⁻¹ de qualquer auxina (AIA, IBA e NAA).

No processo de micropropagação de vários cultivares de *Musa* conduzido por VUYLSTEKE & DE LANGHE (1985), o uso de $10 \mu\text{M}$ BA ($2,25 \text{ mg.l}^{-1}$) em meio de proliferação a partir de ápices caulinares foi bastante eficiente com maiores taxas de proliferação por clones de genoma B, cuja regeneração de plântulas foi obtida pela redução na concentração de BA ($1 \mu\text{M} = 0,225 \text{ mg.l}^{-1}$). Por outro lado, plantas com folhas funcionais e sistema radicular foram estabelecidas em 7-10 semanas, iniciando-se de explantes (2 mm) em meio MS modificado.

CRONAUER & KRIKORIAN (1985) viabilizaram micropropagação do cultivar "Dwarf Cavendish" (AAA) através de ápice floral (0,2 mm) quando inicialmente cultivaram em meio MS contendo $22,0 \mu\text{M}$ BA ($4,95 \text{ mg.l}^{-1}$) em agitação (100 rpm), e transferiram alternadamente (cada 2 semanas) para os meios semi-sólido e líquido de mesma composição. Ressaltam-se que as plântulas foram enraizadas em meio contendo $5,5 \mu\text{M}$ NAA e 0,025% carvão ativado e cresceram normalmente em casa de vegetação.

A taxa de proliferação de brotos em cultura de ápices caulinares de *Musa* é dependente, também, da constituição genômica do material. BANERJEE & DE LANGHE (1985) conseguiram a mais alta taxa de proliferação, quando usaram o meio MS semi-sólido com $0,18 \text{ mg.l}^{-1}$ IAA e $2,30 \text{ mg.l}^{-1}$ BA, mas a maior eficiência foi observada em clones ABB,

seguidos de AAB e AAA, cujo número de subcultivo não influenciou na taxa de proliferação.

Os mesmos autores estudaram cultivo de ápices caulinares sob condições de crescimento mínimo, como forma de conservação de germoplasma de *Musa*. Nesse estudo, a maioria dos cultivares em meio ótimo de multiplicação, quando ápices caulinares foram incubados a 15°C e baixa intensidade de luz (1000 lux), puderam ser mantidos por 13 a 17 meses com relativa alta percentagem de sobrevivência. A configuração genômica da cultivar foi diretamente proporcional ao tempo de conservação, com maior percentagem de sobrevivência para genomas ABB, seguidos por AAB e AAA (BANERJEE & DE LANGHE, 1985).

O uso de ápices caulinares no processo de micropropagação em *Musa* é comprovadamente eficiente. Além disso, o uso de citocininas em meio de proliferação de brotos, particularmente 6-benzilaminopurina (BAP), tem sido mais indicado. WONG (1986), ao trabalhar com 22 cultivares de bananeira (grupos AA, AAA, AAAA, AB, AAB, ABB), verificou que a concentração entre 2,5 a 5,0 mg.l⁻¹ de BAP em meio MS foi suficiente para conseguir sucessos na multiplicação, e que os explantes com dome apical foram mais responsivos.

Um dos primeiros trabalhos na tentativa de regeneração de plantas de bananeira via formação de calos foi realizado por CRONAUER-MITRA & KRIKORIAN (1987). Nesse

estudo, os autores observaram produção de gemas adventícias, quando ápices caulinares (2 mm de comprimento/2-3 primórdios foliares) da cultivar "Highgate" (AAA) foram cultivados em meio MS, contendo ácido para-clorofenoxiacético (PCPA) e cinetina, que inicialmente originaram massa calóide compacta (nem calos verdadeiros nem órgãos) e posteriormente regeneraram-se plântulas completas.

Visando à multiplicação de clones de *Musa* (AAB), CRONAUER-MITRA & KRIKORIAN (1988) desenvolveram estudos com segmentos de pedúnculo terminal de estrutura floral, que, submetidos a meio MS suplementado com 5 mg.l⁻¹ BAP, induziram brotos nas axilas das brácteas. A partir desses brotos, plântulas enraizadas foram obtidas em meio com 1 mg.l⁻¹ NAA e carvão ativado.

Para obter multiplicação de bananeiras *in vitro*, NOVAK et al. (1989) cultivaram ápices caulinares com 2-4 primórdios de folha, inicialmente em meio semi-sólido MS suplementado com 5 μ M IAA e 10 μ M BAP. Posteriormente, após 21 dias, dissecaram longitudinalmente e transferiram para meio líquido MS com 20 μ M BAP sob agitação à 80 rpm, onde sofreram contínua proliferação de brotos e posteriormente originaram-se plântulas. DHED'A et al. (1991) iniciaram cultura de ápices caulinares sob meio MS semi-sólido suplementado com 1 μ M IAA e 10 μ M BAP.

VUYLSTEKE et al. (1991) estudaram ocorrência de variação somaclonal em *Musa* a partir de plântanos micropropagados via ápices caulinares, os quais exibiram em campo variação no tipo de inflorescência associada ao grau de fertilidade feminina, forma de fruto, pseudocaule, cor do pecíolo e bráctea, estatura da planta, e hábito de folha e crescimento, tido como um fator importante para essa ocorrência o estresse imposto pelo ambiente da cultura de tecido. Contudo, a ocorrência de variação somaclonal foi específica da cultivar e variou de 0 a 69%, na qual a maioria permaneceu por vários ciclos vegetativos (origem genética). Essa variação não foi correlacionada com o tempo de cultivo, mas houve tendência de maior ocorrência de variação com o aumento da taxa de proliferação *in vitro*. ISRAELI et al. (1991) estudaram a ocorrência de variação somaclonal em plantas de cultivares do subgrupo cavendish (AAA), obtidos através de cultura de ápices caulinares, e identificaram plantas fora do padrão ("off-types") nos vários estádios de ontogenia, ocorrendo desde o estágio em tubo de ensaio até a frutificação. O nanismo foi a variante mais comum, contribuindo com 90% do total de variação em quase todas as cultivares, seguidos por anormalidade nas folhas (mais comum mosaicismo, 9% do total), e variantes quanto à inflorescência e frutos (persistência de flores e dedos com fendas). Ressaltam que somente nanismo extremo e folhas variegadas

puderam ser detectados em tubo de ensaio, enquanto variações na inflorescência e cachos somente no campo.

Em estudos realizados por KRIKORIAN et al. (1993) em cultivares de plátanos (AAB), para determinar fidelidade clonal e variação de plantas obtidas por cultivo de ápices caulinares e florais em meio contendo 5 mg.l⁻¹ BAP, observou-se considerável variação no fenótipo do cacho, mas nanismo não foi encontrado em nenhuma das plantas. Os autores consideram que a cultura de tecidos tem uma função muito pequena na indução direta de "off-types", e que as características pré-existentes no explante primário determinam se o produto de multiplicação apresenta ou não fidelidade.

2.5.2 - Embriogênese Somática

A capacidade de produzir embriões morfológicamente normais, forma de desenvolver-se e, de fato, regenerar plantas completas a partir de células somáticas indiferenciadas, através do processo de embriogênese somática, reside somente no reino vegetal. Esse potencial único de desenvolvimento tem sido reconhecido como um caminho importante para regeneração de plantas, assim como modelo potencial para estudos de início dos eventos regulatórios e

morfogenéticos em embriogênese de plantas (ZIMMERMAN, 1993).

A embriogênese adventícia ou assexual é a consequência de desenvolvimento de embriões a partir de células que não são o produto de fusão gamética. Em *citrus*, observa-se este fenômeno a partir de células nucelares. Por outro lado, dado o estímulo e as condições apropriadas, células de qualquer planta podem embarcar no caminho embriogênico. Isso pode dar-se por embriogênese direta onde embriões originam-se diretamente do tecido, ou indiretamente, através da proliferação de células (calos). A última é mais comum e o desenvolvimento dos embriões somáticos acompanha, geralmente, a transferência de células ou calos para meio deficiente de auxina, com reduzido nível da mesma auxina de indução de calos, ou com similar ou reduzido nível de uma auxina fraca (AMMIRATO, 1983).

A embriogênese somática foi inicialmente observada em células de cenoura em cultivo. O processo de embriogênese somática geralmente envolve as seguintes etapas: 1) o isolamento de linhagens de células provenientes de calos; 2) a seleção de uma subpopulação embriogênica de células; 3) a remoção da auxina do meio de cultivo, e 4) a diluição das células para uma densidade relativamente baixa. O potencial embriogênico é mais alto, em qualquer cultura, quando esta é relativamente mais jovem, e o desenvolvimento

de embriões somáticos assemelha-se muito àquele de embriões zigóticos, tanto morfológico quanto temporal. Mas este fenômeno é completamente intrínseco no programa embriogênico e não é controlado por informação ambiental ou por limitações espaciais (ZIMMERMAN, 1993).

Para favorecer o aumento da eficiência de regeneração de plantas a partir de células somáticas, o caminho embriogênico de regeneração necessita de exames morfológicos e histológicos detalhados, assim como comparação com embriogênese zigótica, pois permitem um melhor entendimento dos parâmetros que marcam a ocorrência de genuína embriogênese somática (DHED'A et al. 1991). EMONS & DE DOES (1993), através de métodos destrutivos tais como "Scanning" ou microscopia eletrônica e análise óptica de delgadas secções, distinguiram claramente embriões somáticos, de estruturas foliares com gemas axilares sobre agregados de calos de milho. Além disso, observaram que o desenvolvimento de embriões somáticos de milho ocorre nos mesmos padrões de embriogênese zigótica, e não há tecido de calos entre o meristema caulinar e radicular, como ocorre em organogênese.

A técnica de embriogênese somática permite a obtenção de milhares de embriões somáticos a partir de poucos gramas de calos de planta, favorecendo o desenvolvimento de sementes artificiais como um método de propagação clonal em massa, combinando alto volume de produção com baixo custo de

propagação. Por isso, a produção de sementes artificiais poderá ser um sistema de propagação revolucionária na agricultura. (FUJII et al., 1987).

Segundo REDENBAUGH et al. (1988), a conversão de embriões somáticos inclui germinação (elongação da radícula); desenvolvimento de um sistema radicular vigoroso; crescimento e desenvolvimento do meristema caulinar; produção de folhas verdadeiras; uma conexão direta raiz-caule; ausência de aumento de tamanho do hipocótilo; minimização de crescimento de calos sobre o hipocótilo; e produção de plantas verdes com fenótipo normal.

DE VRIES et al. (1988), em trabalho com cenoura domesticada, reportam que culturas de suspensão embriogênica derivadas de hipocótilo são caracterizadas pela presença de massa proembriogênica a partir das quais embriões somáticos se desenvolvem na ausência de reguladores de crescimento. Ressaltam que o uso de meio pré-condicionado de cultura de células embriogênicas aumentou drasticamente o número de massas embriogênicas e, conseqüentemente, o potencial embriogênico.

Correntemente, cultivares de bananeira são propagadas *in vitro* por proliferação de brotos sobre meio de cultura contendo alta concentração de BAP. Porém, a propagação clonal em massa via embriogênese somática surge

como uma excitante e atrativa aplicação, principalmente de suspensão celular (PANIS & SWENNEN, 1993).

Utilizando embriões zigóticos de sementes imaturas do clone diplóide de bananeira (*Musa ornata*), CRONAUER-MITRA & KRIKORIAN (1988) regeneraram plantas via embriogênese somática, seguindo estabelecimento de cultura embriogênica e desenvolvimento de embriões somáticos em meio semi-sólido suplementado com 2,4-D; germinação dos embriões quando cultivados em meio semi-sólido SH e subsequente em MS, sem reguladores de crescimento; e formação contínua de raízes e estabelecimento de plântulas completas quando em meio líquido sob papel filtro.

NOVAK et al. (1989) desenvolveram embriões somáticos de suspensão de células, após 3-4 semanas de cultivo em meio líquido MS modificado com 5 μ M de zeatina, enquanto a conversão desses em plântulas foi possível em meio de dupla camada, uma semi-sólida com metade da concentração dos sais de MS, 5 μ M de zeatina e 1 g/l de carvão ativado e outra líquida, sem hormônio e metade de MS.

DHED'A et al. (1991) regeneraram plantas de bananeira da cultivar Bluggoe (ABB) via embriogênese somática, seguindo quatro passos: formação de massa de glóbulos embriogênicos num meio sem reguladores de crescimento; maturação desses glóbulos, quando se suplementou este meio com BAP ou zeatina; germinação dos glóbulos, quando

variou a concentração de BAP ou zeatina; e desenvolvimento de plântulas no mesmo meio, mas semi-sólido sem reguladores de crescimento.

CHEEE & TRICOLI (1988) desenvolveram embriogênese somática em *Cucumis sativus*, através de suspensão de células provenientes de calos de folhas primárias de plântulas *in vitro* obtida em meio MS com 5 μ M 2,4,5-T (ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético) e 4 μ M BAP. A lavagem de células embriogênicas, primeiramente com meio MS e 0,5% carvão ativado e depois com meio MS sem carvão ativado, e o cultivo em meio MS sob agitação, antes de transferência para meio de regeneração semi-sólido com 5% de sacarose e 0,5% carvão ativado, proporcionou elevada diferenciação das células embriogênicas. Dessa maneira, 60 a 70% dos embriões pré-lavados com carvão ativado germinaram e formaram plântulas com morfologia normal.

DORNELAS et al. (1992), em análises histológicas de embriogênese somática induzida em tecidos maduros de *Stylosanthes scabra*, observaram ausência de conexão entre o sistema vascular dos embrióides e aqueles de tecido paternal e algumas anormalidades como cotilédones e eixo dos embriões fundidos e forma anormal dos cotilédones. Além disso, sugeriram embriogênese somática direta de origem multicelular, a partir de uma série de divisões periclinais

nas células ao redor do conjunto de células vasculares não diferenciadas do explante usado.

Em muitas espécies vegetais, plantas têm sido regeneradas via embriões somáticos, porém a eficiência de regeneração de plantas não foi otimizada. Um dos problemas é a baixa qualidade dos embriões somáticos, que tem permitido somente poucas plantas serem regeneradas na maioria dos trabalhos. Ao contrário, em alfafa, ao melhorar a qualidade dos embriões, a percentagem de conversão de embriões somáticos a plântulas passou de menos 0,5% a quase 90% após 5 anos de pesquisa (REDENBAUGH, 1990).

2.5.2.1 - Explante

A indução de embriogênese somática em cenoura tem sido possível de qualquer parte da planta, tais como embriões zigóticos, hipocótilo, raízes jovens, pecíolos, pedúnculos e protoplastos. Entretanto, para algumas espécies, somente regiões específicas do corpo da planta respondem em cultura, como em muitas monocotiledôneas. Para essas plantas, regiões de células ativamente em divisão parecem responder mais rapidamente, tais como embriões imaturos e material vegetal jovem. Tecido embriônico e meristemático, assim como estado fisiológico e a época na qual os explantes são

obtidos, são fatores importantes à resposta embriogênica (AMMIRATO, 1983).

O explante usado por NOVAK et al. (1989), para indução de embriogênese somática em cultivares de *Musa*, foram bainha de folha basal com segmentos de 4-5 mm e segmento de tecido do rizoma de tamanho uniforme (5x5 mm) plaqueados em meio SH suplementado com dicamba em placas de Petri. Já DHED'A et al. (1991) usaram como explante a parte superior de grupos compactos de gemas meristemáticas provenientes de cultura de ápices caulinares de bananeira Bluggoe (grupo ABB). A esse explante chamaram "scalps", com 4-5 mm de diâmetro.

GUPTA et al. (1993), trabalhando com espécies florestais, iniciaram massa de células embriogênicas a partir de embriões zigóticos imaturos e maduros em meio semi-sólido, e têm mantido em frascos por dois a três anos. Já, GIRI et al. (1993) obtiveram embriogênese somática em culturas de calos de *Aconitum heterophyllum*, com regeneração de plantas, a partir de segmentos de folhas e pecíolos de plântulas in vitro.

2.5.2.2 - Meios de cultivo

Embriões somáticos têm sido desenvolvidos em uma série de meios de cultivo, desde o mais diluído como o de White (1963) às formulações mais concentradas de Gamborg et al. (1968), Schenk e Hildebrandt (1972) e Murashige e Skoog (1962). A escolha do meio de cultivo pode afetar a embriogênese: há levantamentos de que 70% dos explantes foram cultivados em meio MS ou MS modificado (AMMIRATO, 1983).

Soluções minerais fortes beneficiam o desenvolvimento de embriões, enquanto soluções minerais fracas tendem a preservar o potencial embriogênico das suspensões de células. Um dos elementos mais importantes no meio de cultivo é o nitrogênio. A concentração ótima e a forma usada parecem ser dependentes da concentração de auxina no meio. Dos outros sais, o íon potássio é tido como essencial para embriogênese somática, principalmente quando níveis baixos de nitrogênio estão presentes no meio (AMMIRATO, 1983).

A seqüência de meios de cultivo é importantíssima. Geralmente são necessários: um meio para indução e manutenção de calos ou cultura de suspensão; um segundo meio para maturação de embriões somáticos; e um terceiro para permitir que os embriões somáticos regenerem

plantas. Por conseguinte, naquelas culturas em que embriogênese somática ainda não foi desenvolvida, uma elaborada seqüência de meios pode ser fundamental (AMMIRATO, 1983).

Para ZIMMERMAN (1993), a função da auxina exógena na indução de embriões somáticos parece depender da natureza dos explantes usados. Há determinadas espécies que respondem a uma série de auxinas (IAA, NAA, 2,4-D, etc.), e outras, a auxinas específicas. O 2,4-D é a mais usada. Contudo, tanto no meio de iniciação quanto no meio de maturação de embriões somáticos pode ser usada a mesma ou diferente auxina, ou uma ou mais auxina no mesmo meio. Para muitas culturas, a troca no tipo de auxina ou concentração é um prelúdio necessário ao desenvolvimento de embriões somáticos. Em muitos casos, para cada genótipo, a concentração de reguladores de crescimento é diferente e específica, o que, infelizmente, é determinada empiricamente.

No desenvolvimento de embriões de algumas espécies florestais estudados por GUPTA et al. (1993), o aumento da osmolaridade em estágio inicial melhora o desenvolvimento e evita eventuais anormalidades. O uso de ácido abscísico (ABA) inibe a ocorrência de poliembrionia, permite a singularidade dos embriões, e subsequente desenvolvimento e maturação. Além do mais, quando usado junto com carvão ativado, observa-se notável melhora na formação da

região do dome apical, próxima àquela verificada em embriões zigóticos. Porém o ABA sozinho não previne germinação precoce.

As citocininas são importantes para promover maturação de embriões somáticos, às vezes requeridas na conversão de embriões somáticos a plântulas, e muito benéficas em culturas de baixa densidade. Por outro lado, em algumas espécies, quando giberelinas são usadas em combinação com zeatina e ABA, favorecem o desenvolvimento normal e evitam a dormência de embriões somáticos (AMMIRATO, 1983).

PICKARDT et al. (1989) descreveram a regeneração de plantas via embriogênese somática, usando calos derivados de culturas a partir de ápices caulinares de *Vicia narbonensis*. Nesse trabalho, os ápices caulinares usados para iniciação de calos foram excisados de plântulas *in vitro* e cultivados em meio semi-sólido MS suplementado com 2,4-D ($0,1-10 \text{ mg.l}^{-1}$). A regeneração de plântulas seguiu outros três passos: desenvolvimento de embriões somáticos (NAA 1 mg.l^{-1}); germinação de embriões somáticos (NAA $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$; e BAP, cinetina e zeatina a $0,03 \text{ mg.l}^{-1}$); e crescimento de plântulas (sem reguladores de crescimento). Todas essas etapas, em meio MS semi-sólido.

GIRI et al. (1993), para desenvolverem embriogênese somática em *Aconitum heterophyllum*, os calos foram induzidos em meio MS suplementado, ou com 2,4-D (1

mg.l⁻¹) mais cinetina (0,5 mg.l⁻¹) e água de côco (10% v/v), ou NAA (5 mg.l⁻¹) mais BAP (0,1 mg.l⁻¹), os quais em meio MS com BAP (1 mg.l⁻¹) e NAA 0,1 mg.l⁻¹) desenvolveram embriões somáticos que se converteram com sucesso em plântulas em 1/4 dos saís de MS suplementado com 1 mg.l⁻¹ de IBA.

AMMIRATO (1977) estudou os efeitos de zeatina e ácido giberélico (GA₃) e suas interações com ABA sobre o desenvolvimento de embriões somáticos de células cultivadas de "Caraway" e observou que o ácido abscísico suprime anormalidade e assegura maturação de embriões, enquanto zeatina e/ou GA₃ aumentam a freqüência de estruturas aberrantes e também contêm os efeitos de ABA. Por isso, sugeriu que um balanço entre inibidores (ABA) e promotores (zeatina e AG₃) parece estabelecer-se primeiro, seguido de um balanço entre os vários promotores, no estabelecimento de uma maturação mais normal dos embriões somáticos de "Caraway".

No processo de maturação de embriões somáticos simples e aderidos a células de calos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos de milho, EMONS et al. (1993) observaram que calos embriogênicos em meio de proliferação, com 2% de sacarose, perdem a capacidade de regeneração após 6 meses de cultivo, mas essa pode ser recuperada em mesmo meio com 3 % de manitol. O ABA é, preferencialmente, requerido no meio de maturação com elevado potencial osmótico (6% sacarose e 3% manitol). Além disso, a formação

de meristemas, escutelo amiláceo, supressão de germinação precoce, percentagem de maturação de embriões por calos, número de embriões desenvolvidos por calo, supressão de desenvolvimento e crescimento de raiz foram influenciados pela combinação de sacarose, manitol, L-prolina, ABA e GA.

Inibidores de crescimento como ABA, em alguns casos favorecem maturação, inibem proliferação anormal de embriões, e reprimem germinação precoce. A adição de carvão ativado no meio também tem melhorado os resultados no desenvolvimento de embriões somáticos para muitas culturas, quer pela absorção de compostos que inibem a embriogênese somática quer pela absorção de promotores de crescimento, que favorecem a contínua proliferação de embriões somáticos. Um outro fator importante no processo de embriogênese somática são os carboidratos, dentre os quais a sacarose é a fonte de carbono reduzido mais efetiva. Em alguns casos, o aumento da concentração de sacarose, bem como inositol podem evitar a germinação precoce, mas há o risco de aumentar o nível de embriões adventícios/acessórios (AMMIRATO, 1983).

CHEE & TRICOLI (1988) observaram que a presença de carvão ativado, seja no processo de lavagem de células embriogênicas e embriões, ou em meio de regeneração de plantas de *Cucumis sativus* L. via embriogênese somática, reduz o número de calosidade dos embriões e aumenta a formação de brotações.

2.5.2.3 - Condições de cultivo

As condições ambientais para embriogênese somática é outro aspecto a considerar. Há espécies que respondem melhor sob determinados regimes de fotoperíodo, temperatura, tipos de recipientes (frascos e formas de fechá-los), e estado do meio de cultura (líquido e/ou semi-sólido). Entretanto, pequeno efeito sobre a embriogênese somática tem sido relatado. Contudo, a densidade de células parece ter uma relação direta com o grau de maturação de embriões. Conseqüentemente acredita-se ser necessária uma densidade mínima efetiva (AMMIRATO, 1983)

Em trabalho conduzido por DORNELAS et al. (1992), quando explantes de folhas cotiledonares de *Stylosanthes scabra*, em meio suplementado com 2,4-D, foram expostos no escuro, apresentaram culturas embriogênicas de aspecto amarelado e quando expostos à luz, de cor verde.

As populações de embriões somáticos tipicamente apresentam variações em tamanhos e estádios de desenvolvimento, e isto deve-se à embriogênese somática ser uma extensão repetitiva (varia de espécie para espécie), e novos centros embriogênicos originarem-se tanto de grupos de células quanto de embriões em maturação. Portanto, um sistema em que todos os embriões passem através de cada estágio

simultaneamente é muito desejado, A busca de sincronismo contornará os problemas de uniformidade do inóculo e também prevenirá a ocorrência de embriogênese adventícia/acessória (AMMIRATO, 1983).

Segundo DHED'A et al. (1991), as condições de cultivo requeridas em seu trabalho para regeneração de plantas via embriogênese somática de banana, do cultivar Bluggoe (grupo ABB), foram de luz contínua de 2,57 W.m² e temperatura de 26 ± 2°C em todos os estádios. Por outro lado, iniciação e manutenção de suspensão de células; formação de massa de glóbulos embriogênicos; maturação dos glóbulos tornaram-se possíveis em frascos erlenmeyers de 100 ml, agitação de ± 70 rpm e meio líquido; já para o desenvolvimento de plântulas, o meio semi-sólido foi usado. A seleção de células e glóbulos foi feita através do método de peneiramento.

Para desenvolvimento de embriões somáticos de "Caraway", as variáveis ambientais foram fatores importantes e AMMIRATO (1977) observou que, somente sob luz, zeatina eliminou ou GA₃ parcialmente conteve os efeitos de inibição de crescimento sob ABA. Além disso, observou que no escuro, é onde o balanço hormonal pode ser mais rapidamente ajustado para favorecer a mais alta percentagem de estruturas normais.

FUJIMURA & KOMAMINE (1979), ao estudarem a sincronização de embriogênese somática em células de cenoura

em suspensão, obtiveram sucessos, quando adotaram o sistema de peneiramento (peneiras com poros de 47 μm e 31 μm), ou quando centrifugaram por gradiente de densidade em soluções de "Ficoll", a 150 x g por 5 minutos e a 100 x g por 10 segundos, e subseqüentes repetidas centrifugações (5 vezes) a baixa velocidade (50 x g) por um curto tempo (5 segundos). Os grupos de células (5 a 10 células) em meio contendo 0,1 μM zeatina mas sem auxina, proporcionaram uma freqüência de formação de embriões acima de 90%, mas somente no estágio inicial de desenvolvimento dos embriões somáticos, notadamente se observou sincronização.

2.5.2.4 - Estabilidade genética

O nível de ploidia das células parece não afetar a capacidade das células a serem reprogramadas para sofrerem embriogênese somática, porém o nível de ploidia de cultura estabelecida pode alterar, e conseqüentemente afetar a embriogênese somática, levando à regeneração de plantas apresentando alteração no complemento cromossômico, principalmente, a partir de culturas submetidas a períodos longos de subcultivos. Há evidências que mudanças epigenéticas, genéticas e cromossômicas ocorrem quando células são cultivadas. A manutenção da integridade genética

e cromossômica é essencial se o objetivo é propagação clonal, mas variação cromossômica que surja espontaneamente parece ter grande potencial para produção de novas variedades cultiváveis (AMMIRATO, 1983).

2.5.3 - Células em Suspensão

Com o objetivo de tornar mais simples o meio de cultivo de células de arroz, OHIRA et al. (1973) modificaram a concentração de cada nutriente no meio "B5" (GAMBORG et al., 1968), e os resultados experimentais apresentaram que melhor crescimento das células poderia ser obtido se as concentrações de nitrogênio e potássio fossem substancialmente aumentadas. Os níveis de micronutrientes do meio foram também modificados, e o meio foi favoravelmente simplificado pela omissão de cobalto, iodo, piridoxina, ácido nicotínico e mio-inositol, já que esses compostos, aparentemente, não eram requeridos pelas células. Originou-se então, o meio R2 revisado, o qual, embora estabelecido para cultura de células de arroz, provou ser também favorável para crescimento de células derivadas de hipocótilo de soja e medula de fumo.

Para avaliar o potencial embriogênico de culturas de calos e células de cenoura em suspensão, SMITH &

STREET (1974) observaram através do número de embriões, desenvolvidos em cultivo sob condições padrões, que o declínio ocorreu à medida que passaram por vários subcultivos, cujas células foram perdendo totipotência. Consideraram que isso deve estar relacionado à mudança na constituição genética das células, ou que as células retêm sua totipotência, mas é ocultada pelo desenvolvimento de um novo metabolismo e relativamente estável, em resposta às condições de cultivo.

Para iniciar cultura de suspensão, AMMIRATO (1977) usou como explante segmentos de pecíolo de "Caraway" (*Carum carvi*, L.) em meio que continha 2 mg.l^{-1} ANA e 200 mg.l^{-1} de caseína hidrolisada, e induziu desenvolvimento de embriões somáticos quando transferiu para meios sem regulador de crescimento, sob condições de luz contínua ou escuridão completa em agitação de 1 rpm.

Segundo NOVAK et al. (1989), a separação de calo proembrional de tecido diferenciado de explante e seu cultivo em meio líquido, contendo dicamba, facilitaram a obtenção de suspensão de células em *Musa* e puderam ser mantidas sem a maturação, de embriões somáticos. A transferência de células para meio líquido suplementado com citocininas promoveu o desenvolvimento de embriões somáticos capazes de formação de raízes e caule.

Para obtenção de células em suspensão de arroz indica, IR 43, BISWAS & ZAPATA (1992) selecionaram calos embriogênicos provenientes de sementes maduras e cultivaram inicialmente em meio líquido B5 modificado suplementado com 2,4-D sob agitação, e posteriormente em meio N₆ (CHU et al., 1975) suplementado com 2,4-D e L-prolina, com subcultivos semanais. Plantas foram regeneradas dessa suspensão quando, previamente, células e embriões foram centrifugados e levados por duas vezes em meio de regeneração e cultivados por 14 dias sob baixa agitação (15 rpm). Os melhores resultados de diferenciação de brotos foram obtidos, quando as células foram transferidas para meio $\frac{1}{2}$ N₆ suplementado com BAP e cinetina (0,5 mg.l⁻¹ cada), e 3% de sacarose.

TORRIZO & ZAPATA (1992) também estabeleceram suspensão de células embriogênicas de arroz (cv. IR 58 indica) pela seleção de calos embriogênicos. Porém, em meio R2 líquido, contendo caseína hidrolisada e subsequente cultivo em meio MS líquido com caseína hidrolisada suplementado com 2 mg.l⁻¹ 2,4-D (1 mês), e finalmente, cultivo em meio "AA" (rico em aminoácidos, TORIYAMA & HINATA, 1985), onde foi mantida por subcultivos 4-5 dias no primeiro mês e semanal subsequente, sob agitação (120 rpm) no escuro.

BISWAS & ZAPATA (1993) conseguiram suspensão de células embriogênicas estáveis de arroz, quando selecionaram calos embriogênicos provenientes de embriões de sementes

maduras e subcultivaram, antes da transferência para meio R2 líquido contendo maltose. Ressaltaram que a incorporação de maltose, como única fonte de carbono, foi fator importante para o desenvolvimento de suspensão de células regeneráveis, com pequenos grupos, homogêneas e densamente citoplasmáticas, as quais originaram protoplastos capazes de produzir plantas.

Para PANIS & SWENNEN (1993), o uso generalizado de suspensão de células embriogênicas de *Musa* implica que condições de cultivo e subcultivo sejam ótimas, e que taxas de crescimento sejam conhecidas com detalhes. Densidade de inóculo e temperatura tem um papel essencial. A densidade de inóculo por diluição de volume de células empacotadas não deve ser diluído mais que 3 vezes, e a temperatura de 26°C de incubação é ideal para manter as propriedades embriogênicas das culturas de células.

2.5.4 - Protoplastos e regeneração de plântulas

Muitas manipulações genéticas, tais como: hibridação somática, recombinação de citoplasma e introdução direta de DNA, serão possíveis a partir de protoplastos. Para tanto, culturas de células embriogênicas têm sido a fonte de protoplastos para vários trabalhos com cultivo de protoplastos de cereais. Taxas altas de formação de calos de

protoplastos são necessárias quando se busca eficiência de regeneração de linhas de células transformadas via manipulações genéticas (RHODES et al., 1988).

MATSUMOTO et al. (1984) obtiveram, ao usar brácteas de banana, rendimento de protoplastos $8,6 \times 10^6$ protoplastos por grama de explante, que regeneraram parede celular, sofreram divisões e formaram grupos de células após 20 dias, porém não mencionam regeneração de plantas.

KRIKORIAN et al. (1988) encontraram dificuldades no isolamento de protoplastos de *Musa*, que em cultivo permaneceram viáveis por 3 a 15 dias. Então, sugeriram que a fonte do material é uma das chaves para o sucesso, que embora protoplastos possam ser obtidos de mesofilos de folha de culturas assépticas ou não, são frágeis e geralmente não responsivos. Por outro lado, suspensão de células competentes morfogeneticamente tem grandes vantagens como fonte de protoplastos, por constituir-se um prelúdio para produção de plântulas. Outrossim, isolamento de protoplastos deve dar preferência a material primário, como aqueles com mínima manipulação *in vitro*, para evitar o máximo introdução de variação somaclonal em plantas regeneradas.

Os estudos de protoplastos em *Citrus* têm sido realizados com sucesso a partir de calos nucleares derivados de óvulo, os quais constituem a principal fonte, tanto para obtenção de células em suspensão quanto para protoplastos. A

partir disso, plantas têm sido regeneradas de protoplastos, constituindo-se em outras alternativas para melhoramento da citrus, como através da técnica de fusão de protoplastos para obtenção de híbridos somáticos ou cíbridos (VARDI & GALUM, 1988).

O uso de sistema com camada de células alimentadoras ("feeder layer") aumentou grandemente a eficiência de plaqueamento de protoplastos de milho. Porém, quando células alimentadoras não cresceram bem, ambos, eficiência de plaqueamento e taxa de crescimento dos protoplastos, declinaram. Os calos formados sob meio com 1 mg.l^{-1} 2,4-D, provenientes dos protoplastos, originaram embriões somáticos e, quando transferidos para meio sem auxinas, regeneraram pequenas plantas (RHODES et al., 1988).

A obtenção de protoplastos de *Musa* representa potencialmente uma valiosa ferramenta. Por ser um sistema simples de células, é particularmente apropriado para aplicação de engenharia genética de plantas como hibridação somática e transformação, através da fusão de protoplastos e eletroporação, respectivamente, para obtenção de novos genótipos resistentes a doenças (NOVAK, 1991).

Isolamento de protoplastos de *Musa* foi obtido de suspensão de células de calos provenientes de sementes imaturas da cultivar "Long Tavoy" (grupo AA) por MEGIA et al. (1992). Os protoplastos co-cultivados com uma cultura

alimentadora praticável sofreram divisões sustentáveis e formaram calos, cujas células apresentavam características embriogênicas, mas não regeneraram plântulas.

PANIS et al. (1993) regeneraram plantas de *Musa* da cultivar Bluggoe (ABB) a partir de protoplastos isolados de células embriogênicas, obtidas a partir de meristemas. O método de isolamento de protoplastos foi superior a 6×10^7 protoplastos por ml de células empacotadas, expostas por 24 h sob uma mistura de enzimas de 1% de celulase, 1% de macerozyme e 1% de pectinase. Através de peneiramento (100 e 25 μm) obtiveram uma eficiência de purificação de 74 a 100 %, e ao usar uma densidade de plaqueamento superior a 10^6 protoplastos por ml ou inferior mas somente com células "nurse", obtiveram-se sustentáveis divisões de protoplastos. A regeneração de plantas via embriogênese somática direta teve lugar, quando grupos de células contendo 100 ou mais células foram transferidas para meio semi-sólido sem reguladores de crescimento, manitol e células "nurse". Essa via de regeneração de plantas apresenta menores riscos de variação somaclonal.

Resultados semelhantes, usando suspensão de células embriogênicas do mesmo cultivar (Bluggoe, ABB), foram obtidos por MEGIA et al. (1993). Porém, o isolamento de protoplastos deu-se em mistura de enzimas diferentes (celulase, pectoliase e hemicelulase, 1,5; 0,15 e 0,2%,

respectivamente), sendo a regeneração de plântulas possível em meio com BAP sozinho ou combinado com picloran inicialmente, antes da transferência para meios sem reguladores de crescimento. A eficiência de regeneração de plântulas foi de 10% para embriogênese direta e acima de 50% para embriogênese indireta, dos embriões somáticos testados.

TORRIZO & ZAPATA (1992) também regeneraram plantas de arroz da cultivar IR 58 a partir de protoplastos. O uso de células auxiliadoras ("nurse cells"), aumentaram a eficiência de plaqueamento dos protoplastos, e os calos com melhor regeneração de plantas ocorreu em meio MS com 1 mg.l^{-1} NAA, 8 mg.l^{-1} cinetina, solidificado com 1,2 % agarose, e 3% de maltose. Em alguns casos 100 % dos calos tornaram-se verdes.

BISWAS & ZAPATA (1993) obtiveram alta frequência de regeneração de plantas da cultivar índica de arroz IR 43, mais de 3000 plantas, quando calos não selecionados derivados de protoplastos de células embriogênicas foram cultivados em meio de regeneração "R2" com maltose (3%) ao invés de sacarose, suplementado com 5 mg.l^{-1} cinetina, 1 mg.l^{-1} NAA e 8 g.l^{-1} agarose. O uso de células auxiliadoras ("nurse cells") foi essencial para alta frequência de formação de colônias, e a regeneração de plantas foi 8 a 12 vezes maior que a obtida em meio com sacarose, como fonte de carbono.

GUPTA & PATTANAYAK (1993) regeneraram plantas a partir de protoplastos isolados de mesofilo da base foliar e tecido da bainha de plântulas desenvolvidas de sementes de arroz *in vitro*. Nesse trabalho, obtiveram um rendimento de isolamento de 2×10^7 protoplastos por grama de tecido fresco, que, plaqueados sobre camada alimentadora ("feeder layer"), sofreram divisões celulares após 6-7 dias, formaram microcolônias visíveis com 18-19 dias, e, ao transferirem protocolos com 9-10 semanas de cultura para meio de regeneração MS suplementado com várias concentrações de citociminas e auxinas, formaram embriões somáticos após 20-25 dias e regeneraram plantas completas a partir de 33 dias de cultivo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório da Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA, da Universidade de São Paulo-USP, em Piracicaba-SP. Os genomas de *Musa* estudados foram: Grande Naine (GN), pertencente ao grupo AAA, e Prata e Mysore, pertencentes ao grupo AAB. A Figura 1 mostra as etapas desenvolvidas neste estudo, quais sejam: obtenção de rizomas ou plantas jovens no campo; introdução de ápices caulinares; desenvolvimento e multiplicação de plântulas *in vitro*; indução de calos e/ou massa globular; desenvolvimento de estruturas globulares; maturação e germinação de estruturas globulares; formação e desenvolvimento de plântulas; e aclimação e crescimento de plantas. Ainda fizeram parte deste estudo obtenção de células em suspensão e isolamento de protoplastos de células em suspensão e de mesofilo foliar.

Figura 1 - Esquema mostrando as etapas desenvolvidas no trabalho com três cultivares de bananeira (grupos AAA e AAB)

3.1 - Introdução e cultivo de ápices caulinares

Esta etapa caracterizou-se, como ilustra a Figura 2, pela obtenção dos rizomas diretamente no campo, preparo, assepsia, excisão, inoculação em meio de cultivo, limpeza e recultivo dos ápices caulinares, e subcultivo das brotações.

3.1.1 - Obtenção e preparo dos ápices caulinares

Plantas sem frutificar das cultivares envolvidas obtidas diretamente do campo foram preliminarmente preparadas, retirando-se raízes, parte do rizoma e bainhas de folhas que compunham o pseudocaule, manualmente e/ou com auxílio de facas, de modo que ficassem com cerca de 30 mm de diâmetro, altura do pseudocaule de mais ou menos 50 mm e do rizoma de 30 mm, os quais foram submetidos à assepsia.

3.1.2 - Assepsia e excisão dos ápices caulinares

A assepsia dos rizomas, previamente preparados, realizou-se primeiramente em álcool etílico 96 °GL por 30 segundos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO)

Figura 2 - Esquema para introdução e multiplicação de ápices caulinares

a 1% por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar asséptica, foram lavados por 5 vezes em água destilada esterilizada e, com auxílio de instrumentos assépticos (pinças, bisturís, etc.), foram dissecados, retirando-se bainhas de folhas e tecidos do rizoma até obter-se explantes com cerca de 5 mm de base de tecido do rizoma e 1 mm de pseudocaule, os quais denominaram-se ápices caulinares. Estes, por sua vez, tornaram-se aptos a serem inoculados em meio de cultivo.

3.1.3 - Cultivo de ápices caulinares

Os explantes assépticos, ápices caulinares, foram inoculados inicialmente em meio de cultivo MS completo semi-sólido, suplementado com 2,0 mg/l de BAP e pH 5,8 ajustado com hidróxido de potássio (KOH), em frascos cilíndricos (300 ml) com 60 ml de meio, autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Após a inoculação (1 explante/frasco), os frascos foram selados com filme PVC resinite e incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e intensidade de luz 25 W.m^{-2} .

Após 2-3 semanas com os explantes intumescidos, novamente em câmara de fluxo laminar, foram retirados tecidos oxidados e folhas crescidas e cortados longitudinalmente em duas partes ao centro meristemático,

sendo transferidos em seguida para meio fresco de multiplicação com a mesma composição do anterior, porém com 5 mg.l⁻¹ de BAP para indução de novas brotações. Por conseguinte, a cada 4-6 semanas, os novos brotos surgidos foram separados e cultivados no mesmo meio e condições de incubação, e sempre que atingiam um diâmetro maior que 5 mm eram cortados ao meio para melhor multiplicação. A partir dessas plântulas obtidas *in vitro*, material foi conseguido para iniciar testes preliminares de indução de embriogênese somática, utilizando-se plântulas inicialmente com diâmetro superior a 5 mm, e também para usar nos testes de multiplicação e desenvolvimento de plântulas.

3.2 - Testes de multiplicação e desenvolvimento de plântulas *in vitro*

No sentido de obter plântulas com diâmetro superior a 5 mm e de continuar multiplicando o material, como ilustra a Figura 3, ápices caulinares de plântulas *in vitro* (pseudocaule 10 mm e rizoma 5 mm) foram subcultivados em meio MS completo, suplementado com várias concentrações de reguladores de crescimento vegetal, como segue:

T1 - MS + 4,5 mg.l⁻¹ BAP

T2 - MS + 2,5 mg.l⁻¹ BAP + 0,1 mg.l⁻¹ AG₃

Figura 3 - Esquema para testes de multiplicação e desenvolvimento de plântulas

T3 - MS + 2 mg.l⁻¹ BAP + 0,8 mg.l⁻¹ AIA

T4 - MS + 1,0 mg.l⁻¹ 2ip

Neste caso, foram inoculados 3 explantes por frasco cilíndrico, contendo 60 ml de meio e incubados sob as mesmas condições descritas para introdução de ápices caulinares. Para avaliação, contou-se o número de brotos aptos a continuar multiplicação no subsequente subcultivo 4 a 6 semanas após incubação, durante 3 subcultivos.

Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, considerando um frasco com três explantes por parcela e dez repetições em três subseqüentes subcultivos. A análise da variância e comparação de médias foram realizadas através do programa IRRISTAT (IRRI, 1992)

3.3 - Embriogênese somática

Os trabalhos basearam-se nos estudos realizados sobre embriogênese somática em cultivares de *Musa* por NOVAK et al. (1989) e DHED'A et al. (1991).

O presente trabalho desenvolveu-se nas seguintes etapas:

- Indução de calos e/ou massa globular;
- Desenvolvimento de estruturas globulares;

- Maturação e germinação de estruturas globulares;
- Formação e desenvolvimento de plântulas; e
- Aclimação e desenvolvimento de plantas.

3.3.1 - Indução de calos e/ou massa globular

Esta etapa caracterizou-se pela escolha do tipo de explante, testes para avaliar várias concentrações de dicamba na indução de calos e uso de dicamba em combinação com zeatina para melhorar a qualidade de massa globular.

3.3.1.1 - Escolha do tipo de explante

Nos experimentos realizados, como demonstram as Figuras 4 e 5, foram testados como explantes várias regiões de plântula *in vitro*, crescidas em meio de multiplicação e desenvolvimento (MS completo com $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP), à indução de calos. Todos os explantes foram submetidos a meio semi-sólido SH suplementado com dicamba ou 2,4-D em placas de Petri de vidro com 90 mm de diâmetro, com cerca de 40 ml de meio e cerradas com filme PVC resinite (zape). As placas de Petri foram mantidas numa BOD com temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, totalmente escuro. Os explantes foram excisados com

Figura 4 - Esquema para escolha do tipo de explante na indução de calos e/ou massa globular

Figura 5 - Regiões de plântula *in vitro* testadas como explante: F - segmento foliar; C - segmento abaixo da região de inserção das folhas e acima do rizoma (pseudocaule); e R - segmento de rizoma.

auxílio de bisturís, pinças e lupa estereoscópica e inoculados no meio na câmara de fluxo laminar asséptica. Os explantes testados foram os seguintes:

Experimento 1

DOMINGUES (1992) induziu calos embriogênicos a partir de segmentos de plântulas *in vitro* de cultivares de *Musa*, com melhores resultados quando usou plântulas com diâmetro superior a 5 mm. Neste experimento consideraram-se, para obtenção dos dados, segmentos (diâm. 5 mm e espessura 1-2 mm) de plântulas das cultivares Mysore e Prata, em meios com dicamba (20, 30 e 40 μM) e 2,4-D (2,5; 5,0 e 7,5 μM).

As respostas foram avaliadas após 30 dias de cultivo quanto à percentagem de explantes com indução de calos, percentagem de explantes oxidados e percentagem de explantes que apenas se estabeleceram, mas que não responderam à ação dos reguladores de crescimento (sem resposta). Consideraram-se 5 placas por tratamento, contendo em média 5 explantes por placa.

Experimento 2

Tomando como base os resultados anteriores e objetivando identificar segmentos de qual região da plântula apresentava melhores respostas, testaram-se os seguintes explantes, assim caracterizados:

- 1 - segmentos de rizoma (R) - considerados todos os segmentos da região de onde originavam as raízes;
- 2 - segmentos de pseudocaule (M) - considerados todos os segmentos logo acima da seção de origem das raízes até a base de inserção das folhas;
- 3 - segmentos foliares (F) - considerados todos os segmentos a partir da base de inserção foliar.

Todos os segmentos tinham as dimensões de 1-2 mm de espessura e cerca de 5 mm de diâmetro.

Os dados foram tomados após 30 dias de cultivo a partir de 16 placas por tratamento em meio SH suplementado com dicamba, contendo em média 5 explantes por placa. Avaliaram-se percentagem e número por total de explantes quanto à indução de calos, oxidados e sem resposta.

Experimento 3

Considerando-se que indução de calos pode ocorrer em qualquer tecido, outros explantes foram testados, definidos como:

- 1 - escalpo (S) - considerados todos os tecidos superficiais excisados longitudinalmente ao longo da região de inserção de raízes no tecido de rizoma, com cerca 4-5 mm de comprimento, 3 mm de largura e 1 mm de espessura;
- 2 - segmentos de pseudocaule (C) - considerados todos os segmentos entre a região de inserção das folhas e tecido de

rizoma (zona de inserção de raízes), medindo cerca de 5 mm de diâmetro e 1-2 mm de espessura;

3 - segmentos foliares (F) - considerados todos os segmentos a partir da região de inserção das folhas, com 5 mm de diâmetro e 1-2 mm de espessura;

Os dados coletados foram de explantes provenientes das cultivares Mysore e GN, avaliados a partir de 20 dias de cultivo em meio SH suplementado com dicamba quanto à indução de calos, oxidação e explantes sem resposta.

Experimento 4

Os segmentos usados como explantes, do centro para a extremidade em corte transversal e ao longo do segmento em corte longitudinal, apresentam células com diferentes grau de diferenciação. Por isso, as respostas podem ser desuniformes. Por essa razão, outros explantes foram testados para obter respostas mais definidas.

Explantes testados:

1 - região de inserção foliar (Tipo F) - considerados os explantes com tecido da base de inserção e extremidade de bainha das folhas em corte longitudinal. De cada plântula obtiveram-se 3 a 5 explantes, com cerca de 4X5 mm e 1 mm de espessura;

2 - região superficial (Tipo A) - considerados os explantes obtidos por corte longitudinal superficial da região de inserção das folhas ao início do tecido mais maduro do

rizoma, inoculados verticalmente no meio, com dimensões de cerca de 5X3 mm e 1 mm de espessura;

3 - região superficial (Tipo B) - considerados os explantes obtidos por corte longitudinal superficial da região de inserção das folhas ao início do tecido mais maduro do rizoma, cuja parte cortada foi voltada para baixo por ocasião da inoculação, com dimensões de cerca de 5X3 mm e 1 mm de espessura;

4 - região superficial (Tipo C) - considerados os explantes obtidos por corte longitudinal superficial da região de inserção das folhas ao início do tecido mais maduro do rizoma, cuja parte cortada foi voltada para cima por ocasião da inoculação, com dimensões de cerca de 5X3 mm e 1 mm de espessura;

5 - tecido central (Tipo M) - considerados os explantes obtidos por corte longitudinal da parte central da região de inserção das folhas ao tecido mais maduro sem os tecidos periféricos, com cerca 5X3 mm e 1 mm de espessura.

Os dados coletados foram de explantes tomados das cultivares Mysore e GN, avaliados a partir de 30 dias de cultivo, quanto à indução de calos, oxidados e sem respostas (sem retomar processo de diferenciação). Os dados obtidos foram percentagem e número por total de explantes inoculados, para cada parâmetro avaliado.

3.3.1.2 - Testes de concentrações de dicamba para indução de calos e/ou massa globular

Nestes testes, Figura 6, foi considerado somente o explante que melhor respondeu à indução de calos e/ou massa globular (tecido da base de inserção e extremidade da bainha da folha - Tipo F). O meio utilizado foi o SH modificado por NOVAK et al. (1989), suplementado com dicamba em várias concentrações. Os explantes foram inoculados no meio semi-sólido SH suplementado com dicamba, em placas de Petri de vidro (ϕ 90 mm), com cerca de 40 ml de meio, cerrados com filme PVC resinite (zape) e mantidos numa BOD com temperatura $27 \pm 2^\circ\text{C}$ sob completa ausência de luz.

As concentrações de dicamba usadas foram :

Teste 1

- 10 μM dicamba ($2,21 \text{ mg.l}^{-1}$)
- 20 μM dicamba ($4,42 \text{ mg.l}^{-1}$)
- 30 μM dicamba ($6,63 \text{ mg.l}^{-1}$)
- 40 μM dicamba ($8,84 \text{ mg.l}^{-1}$)

Teste 2

- 2,5 μM dicamba ($0,55 \text{ mg.l}^{-1}$)
- 5,0 μM dicamba ($1,105 \text{ mg.l}^{-1}$)
- 10,0 μM dicamba ($2,21 \text{ mg.l}^{-1}$)

Figura 6 - Esquema para testar varias concentrações de dicamba na indução de calos e/ou massa globular

Número de explantes apresentando somente calos; massa globular baixa, média e alta por número de explantes inoculados e percentagem somente de calos ou massa globular foram os parâmetros usados para avaliação desses testes. De todas as cultivares (GN, Mysore e Prata), foram tomados explantes e avaliados a partir de 20 dias de cultivo.

3.3.1.3 - Testes para melhorar a qualidade de calos e/ou massa globular em meio de indução

Com o objetivo de melhorar a qualidade de calos e/ou massa globular induzida, e, considerando-se que DHED'A et al. (1991) conseguiram suspensão de células embriogênicas de *Musa* quando adicionaram uma pequena concentração de zeatina ($1 \mu\text{M}$) no meio de indução e manutenção, como esquematizado na Figura 7, cultivou-se o explante que melhor respondeu nos testes anteriores (Tipo F), em meio de indução SH com $10 \mu\text{M}$ dicamba (concentração que originou melhor resposta), sob as mesmas condições, com adição de zeatina nas seguintes concentrações:

SHZ₂ - meio SH + $10 \mu\text{M}$ dicamba + $0,9 \mu\text{M}$ ZEA ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$)

SHZ₅ - meio SH + $10 \mu\text{M}$ dicamba + $2,3 \mu\text{M}$ ZEA ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$)

SHZ₀ - meio SH + $10 \mu\text{M}$ dicamba sem ZEA

Figura 7 - Esquema usado para melhorar qualidade de massa globular

Os resultados foram avaliados somente por observações visual quanto aos aspectos superficiais de formação da massa globular.

3.3.2 - Desenvolvimento de estruturas globulares

Os calos e/ou massa globulare obtidos previamente foram transferidos para frascos de 250 ml com 20-30 ml de meio líquido, para liberação e desenvolvimento das estruturas globulares, Figura 8. Os meios testados nesta etapa foram:

- D₁ - ($\frac{1}{2}$ MS + Vit. modificada de Staba + sem reguladores de crescimento);
- D₂ - (R2 completo sem reguladores de crescimento);
- D₃ - (R2 + vit. de MS + sem reguladores de crescimento);
- D₄ - ($\frac{1}{2}$ MS + Vit. modificada de Staba + 10 μ M dicamba (1 semana) e posteriormente sem reguladores de crescimento);
- D₅ - (R2 completo + 10 μ M dicamba (1 semana) e posteriormente sem reguladores de crescimento);
- D₆ - (R2 + Vit. de MS + 10 μ M dicamba (1 semana) e posteriormente sem reguladores de crescimento);

NOVAK et al. (1989) e DHED'A et al. (1991) produziram estruturas globulares de cultivares de *Musa* quando

Figura 8 - Esquema para desenvolvimento de estruturas globulares em meio líquido sob agitação.

transferiram células embriogênicas para meio $\frac{1}{2}$ MS sem reguladores de crescimento e OHIRA & FUJIMURA (1973) estabeleceram um meio R2 revisado, excelente para crescimento de células embriogênicas de arroz, uma monocotiledônea também.

Então, para tornar possível o desenvolvimento de estruturas globulares das cultivares de *Musa* envolvidas neste estudo, os explantes com calos e/ou massa globular foram transferidos para meios líquidos como descritos acima, em condições de agitação a 70 rpm, fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro a uma intensidade luminosa de 25 W.m², e temperatura de 26 ± 3 °C. O refrescamento do meio durante o período de liberação e desenvolvimento das estruturas globulares foi feito semanalmente logo após 3-4 dias de cultivo.

As avaliações foram feitas quanto ao aspecto de desenvolvimento das estruturas globulares, quantidade visual de estruturas desenvolvidas e aspectos morfológicos.

3.3.3 - Maturação e germinação de estruturas globulares

Após o desenvolvimento das estruturas globulares flutuantes em meio líquido sob agitação, estas foram peneiradas em peneira de metal com 40 mesh e

transferidas para meios frescos de maturação e germinação. Nesta etapa, estruturas globulares em estágio avançado de desenvolvimento (> 3 mm) foram transferidas para vários meios como ilustrado na Figura 9, para testar em que condições de meios se converteriam em plântulas. As condições de incubação, quando em meio líquido, foram com agitação a 70 ou 30 rpm e quando em meios semi-sólidos sem agitação, sob regime semelhante de fotoperíodo (16 h.luz/dia) e intensidade de luz (25 W.m^{-2}). Testaram-se os seguintes meios para maturação e germinação de estruturas globulares:

D1 - $\frac{1}{2}$ sais MS + Vit. modificada de Staba (SH)

D3 - sais de R2 + Vit. MS

M3A2 - $\frac{1}{2}$ sais MS + $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ABA (15 dias) e $\frac{1}{2}$ sais MS + $5 \text{ }\mu\text{M}$ BAP

M3A5 - $\frac{1}{2}$ sais MS + $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ABA (15 dias) e $\frac{1}{2}$ sais MS + $5 \text{ }\mu\text{M}$ BAP

M2B₁₋₁₀ - sais de R2 + Vit. MS + BAP (1,2,4,5,6 ou $10 \text{ }\mu\text{M}$)

M1Z₁₋₁₀ - sais de R2 + Vit. MS + ZEA (1, 2, 4, 5, 6 OU $10 \text{ }\mu\text{M}$ ZEA)

M5Z₁₀S - sais de R2 + Vit. MS + $10 \text{ }\mu\text{M}$ ZEA + phytigel (2 g.l^{-1})

M6B₁₀S - sais de R2 + Vit. MS + $10 \text{ }\mu\text{M}$ BAP + phytigel (2 g.l^{-1})

Figura 9 - Esquema utilizado para maturação e germinação de estruturas globulares

M4/D1 - $\frac{1}{2}$ sais MS + carvão (1 g.l⁻¹) + 5 μ M ZEA + phytigel
(2 g.l⁻¹) - fase semi-sólido - + $\frac{1}{2}$ MS + Vit. Staba -
fase líquida

As observações foram visual, quanto à emissão de raízes, desenvolvimento de primórdios foliares, oxidação das estruturas somáticas desenvolvidas e formação completa de plântulas normais.

3.3.4 - Formação e desenvolvimento de plântulas

As estruturas globulares germinadas ou plântulas no início de desenvolvimento foram transferidas para meio líquido ou semi-sólido sem reguladores de crescimento { $\frac{1}{2}$ sais MS (D1) ou R2 (D3)}, como ilustra a Figura 10.

As observações foram apenas de aspectos de desenvolvimento de folhas, raízes e formação completa da plântula tanto provenientes de estruturas isoladas quanto agregadas a tecidos de calos, de modo a se tornarem aptas para serem aclimatadas. Contou-se nessa fase o número de plantas regeneradas de cada cultivar.

Figura 10 - Esquema usado para obtenção e desenvolvimento de plântulas

3.3.5 - Aclimação e crescimento de plantas

Após desenvolvimento das plântulas, estas com folhas definitivas e enraizadas, foram lavadas em água corrente para retirar excesso de meio de cultura e transferidas para uma mistura, de solo esterilizado mais vermiculita na proporção de 2 : 1, em caixas de madeira com 100 mm de altura de solos, que foram mantidas à câmara úmida com umidade saturada gerado por um umidificador em casa de vegetação durante 3 - 5 dias.

As plântulas já adaptadas às novas condições foram transplantadas para pequenos sacos pretos de polietileno com a mesma mistura de solo e vermiculita, mas na proporção de 3 : 1, onde desenvolveram até o tamanho de mudas para serem transplantadas a campo de produção. A Figura 11 resume esta etapa.

O material foi avaliado quanto às características morfológicas e de desenvolvimento, comparando-o em relação ao desenvolvimento normal de plântulas provenientes de micropropagação por ápices caulinares.

Figura 11 - Esquema usado para aclimação e crescimento de plantas obtidas via embriogênese somática

3.4 - Células em suspensão

DHED'A et al. (1991) estabeleceram suspensão de células competentes embriogenicamente por cultivo de "escalps" meristemáticos em meio líquido MS modificado contendo 5 μM 2,4-D e 1 μM zeatina tanto no meio de iniciação quanto no meio de manutenção de suspensão de células.

Para este propósito, células ou grupos de células com diâmetro entre 25 μm e abaixo de diâmetro conferido por peneira de 40 mesh foram usadas para iniciar suspensão de célula. Para tanto, o material usado para suspensão foi obtido logo após explantes com calos e/ou massa globular em meio líquido sob agitação liberaram estruturas globulares e células para meio de cultivo que passaram por peneiras de 40 mesh e 25 μm . Outra forma de obtenção de células para iniciar e manter em suspensão foi pela retirada do fundo dos frascos meio contendo células em suspensão.

Os meios testados foram $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 10 e 20 μM de dicamba; R2 suplementado com 10 μM de dicamba ou R2 suplementado com 10 μM de dicamba e 1 μM zeatina; meio rico em aminoácidos "AA" suplementado com 10 μM de dicamba; e meio MS modificado por DHED'A et al. (1991) suplementado com 10 μM dicamba ou 5 μM 2,4-D.

As observações sob microscópio invertido foram feitas para crescimento das células, tipos de células e atividades das células.

3.5 - Isolamento de protoplastos

Para isolamento de protoplastos, usaram-se células em suspensão caracterizadas por células arredondadas, citoplasma denso, rico em grãos de amido e na maioria isoladas; e células de mesofilo da extremidade da bainha foliar. As seguintes etapas foram conduzidas:

- 1) exposição de células em suspensão ou de mesofilo foliar à ação de uma mistura de enzimas contendo celulase RS 1%, pectoliase Y-23 0,2%, Manitol 0,5 M e MES 5 mM, juntamente com sais de CPW com pH ajustado para 5,6. Outra solução enzimática testada foi de celulase RS 4%, macerozyme R-10 1% e pectoliase Y-23 0,02%, com manitol 0,5 M, MES 5 mM, juntamente com sais de CPW e pH 5,6 (ver APÊNDICES 12 e 13) durante 5 horas, em agitação a 30 rpm no escuro. Cerca de 12 ml de solução de enzimas para 2 g de tecido fresco ou para 1×10^5 células de suspensão celular foram utilizados;

- 2) peneiramento da solução enzimática com protoplastos a 30 e 2 X 25 μm e transferência para tubos de centrífuga com capacidade de 10 ml;
- 3) centrifugação dos protoplastos em solução enzimática em tubos (10 ml) a 1.000 rpm por 8 minutos;
- 4) descarte da solução de enzimas e resuspensão dos protoplastos com solução de CPW 13 M, e retirada de uma alíquota de protoplastos resuspendidos para contagem em hemacitômetro;
- 5) nova centrifugação a 1000 rpm por 8 minutos;
- 6) retirada da solução CPW13M, mistura da agarose (1,2 %) e meio de cultivo duas vezes mais concentrado em igual volume;
- 7) mistura do meio ainda líquido com protoplastos e homogeneização;
- 8) plaqueamento dos protoplastos a várias densidades (10^5 protoplastos. ml^{-1}) em meios de cultivos (RMK, GMM e R2MCHK - ver APÊNDICES 15 e 16);
- 9) após solidificação da agarose, usou-se meio líquido sem ou com cerca de 100 mg de células "nurse" de arroz, cultivar IR 52, sobre os protoplastos; e
- 10) incubação sob agitação a 30 rpm no escuro.

Avaliações quanto ao rendimento de protoplastos, tempo de viabilidade e comportamento sob cultivo foram realizadas.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Introdução e cultivo de ápices caulinares

O estabelecimento de ápices caulinares em cultivo é fundamental, principalmente considerando-se que inicialmente há grande exsudação de substâncias fenólicas que inibem o desenvolvimento e emissão de novas brotações. Como observado por CRONAUER & KRIKORIAN (1985) e VUYLSTEKE & DE LANGHE (1985), no início os ápices têm uma coloração branco pálido e a partir de 3-4 dias começam a tornar-se verde e aumentar de volume. Portanto, após 2-3 semanas os ápices caulinares estão verdes e intumescidos, e uma nova limpeza dessas estruturas, retirando-se tecidos necróticos, parece favorecer a ação das condições de cultivos (5 mg.l^{-1} BAP) e novos brotos originam-se, iniciando-se, assim, definitivamente, o processo de micropropagação.

Dessa maneira, após todas 4-6 semanas são necessários subcultivos, haja visto que ocorre exaustão dos nutrientes do meio de cultura, e a tendência natural é formação de raízes nas brotações, ausência de emissão de novas brotações e, com isso, fragilidade do material in

vitro. A partir disso, produziram-se plântulas para realizar os testes de multiplicação e desenvolvimento de plântulas *in vitro*.

4.2 - Multiplicação e desenvolvimento de plântulas *in vitro*

Neste experimento, a Tabela 1 mostra a análise da variância dos resultados obtidos para número de brotos nos quatro meios testados e três subcultivos, indicando que não há diferença significativa entre cultivares, mas há uma ação diferenciada do meio usado em qualquer uma das cultivares avaliadas. Outrossim, há uma interação positiva do meio usado com cultivar, dando melhores respostas de indução de brotações o meio MS suplementado com $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP, confirmando os resultados obtidos por outros autores (CRONAUER & KRIKORIAN, 1985; VUYLSTEKE & DE LANGHE, 1985 e WONG, 1986).

Ressalta-se, ainda, que somente há efeito de interação significativa entre meio e cultivar, que subcultivo não altera significativamente a taxa de multiplicação e que os outros meios testados deram respostas similares quanto à indução de novos brotos. O coeficiente de variação de 33,2% evidencia a grande variabilidade na indução de novas

brotações, alcançando desde 3 até 15 brotos ($4,5 \text{ mg.l}^{-1}$) por frasco em decorrência tanto do efeito de meio quanto da capacidade intrínseca de proliferação de cada explante usado, assim como das condições de cultivo que não foram possíveis de uniformização.

Tabela 1 - Análise conjunta da variância baseada em números de brotos emitidos por cultivares de bananeira em diferentes meios de cultivo a vários subcultivos.

F.V.	G.L.	SQ	QM	F
Tratamentos	35	656,875	18,768	7,23**
Cultivar (C)	2	15,050	7,525	2,90ns
Meio (M)	3	497,631	165,877	63,91**
Subcultivo (S)	2	0,717	0,358	<1
C X M	6	104,261	17,377	6,70**
C X S	4	6,933	1,733	<1
M X S	6	9,994	1,666	<1
C X M X S	12	22,289	1,857	<1
Erro	324	840,900	2,595	
Total	359	1.497,775		

C V = 33,2%

* * = significante ao nível de 1%; ns = não significante

Quanto à comparação de média de brotos obtidos por cultivar sob diferentes meios, a Tabela 2 evidencia uma média significativa com todas as cultivares quando submetidas à ação de meio MS suplementado com $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP, ao

contrário quando sob os outros meios, nos quais não diferiram significativamente um dos outros, exceto que a cultivar Mysore respondeu significativamente com menor número de brotos quando submetida a meio MS suplementado com $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP e $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ AIA, fato mencionado por BANERJEE & DE LANGHE (1985) para clones do grupo AAA que responderam a baixa taxa de multiplicação quando comparados a clones do grupo ABB.

Considerando-se cada repetição com 3 explantes (ápices caulinares), o melhor meio de cultivo emitiu uma taxa de brotos por explantes menor que três brotações e os demais menor que duas brotações por explante, a cada mês, o que permitiria produzir, considerando-se um mês para estabelecimento e um mês para enraizamento, com 10 subcultivos, cerca de $1.024 (2^{10})$ a $59.049 (3^{10})$ plantas por ano por ápice caulinar.

Uma outra característica observada neste experimento foi a grande formação de raízes de todas as cultivares quando submetidas à ação de 2ip ou em menor volume quando AIA estava presente no meio, o que confirma o uso dessas auxinas para enraizamento (CRONAUER-MITRA & KRIKORIAN, 1988). Os outros meios de cultivo estimularam sempre o desenvolvimento da parte aérea e posteriormente formação de raízes, mas em menor quantidade. Por todos esses aspectos, o meio com $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP foi escolhido como o mais favorável para o desenvolvimento e multiplicação dos cultivares, e a

partir de então, foi selecionado para continuar o processo de multiplicação e desenvolvimento de plântulas para fornecer explantes às atividades do processo de embriogênese somática.

Tabela 2 - Comparação de médias de número de brotos emitidos por cultivares a diferentes meios de cultivo após 3 subcultivos e 10 repetições por tratamento.

Meio de Cultivo (M) (M S com)	C u l t i v a r (C)			Média - M
	G N	Prata	Mysore	
4,5 mg.l ⁻¹ BAP	7,93 a	5,90 a	6,77 a	6,87
2,5 mg.l ⁻¹ BAP e 0,1 mg.l ⁻¹ AG ³	3,67 b	3,93 b	5,26 b	4,29
2,0 mg.l ⁻¹ BAP e 0,8 mg.l ⁻¹ AIA	3,60 b	4,30 b	3,73 c	3,88
1,0 mg.l ⁻¹ 2ip	4,17 b	4,33 b	4,70 b	4,86
Média - C	4,84	4,62	5,12	4,86

Na coluna, média seguida por letra comum não são diferentes significativamente ao nível de 5% por DMRT (Duncan's Multiple Range Test).

4.3 - Embriogênese somática

4.3.1 - Tipo de explante

Segundo NOVAK et al. (1989) explantes provenientes de plântulas *in vitro* respondem melhor que provenientes de plantas crescidas em solo, e tecido do rizoma responde mais que de folha em meio SH suplementado com dicamba. Neste trabalho, testes preliminares indicaram que realmente plântulas *in vitro* fornecem explantes mais responsivos que provenientes de plantas crescidas sob solos.

O uso de segmentos de plântulas como explante para iniciar o processo embriogênico, indução de calos e/ou massa globular, são responsivos quer em meio suplementado com dicamba quer 2,4-D. Respostas semelhantes foram encontradas por DOMINGUES (1992) quando inoculou segmentos de plântulas *in vitro* em meio SH suplementado com dicamba. Entretanto, as respostas são variadas, onde se observaram calos esbranquiçados e amarelados com estruturas globulares. Isso se deve ao fato de que vários tecidos com células em diferentes estádios de diferenciação, são expostos à ação de reguladores de crescimento.

Por outro lado, a Tabela 3 mostra dados obtidos do teste 1, na qual segmentos de plântulas da cultivar Prata apresentam uma maior tendência em responder melhor em meio

suplementado com dicamba que com 2,4-D. Outro aspecto a considerar neste experimento é que maiores percentagens de formação de calos verificam-se em menores concentrações de dicamba e 2,4-D. Porém, neste último há grande efeito de oxidação dos explantes, o que inibe a formação de calos, principalmente em concentração alta (7,5 μ M).

Tabela 3 - Percentagem de explantes com resposta à indução de calos de segmentos de plântulas da cultivar Prata após 30 dias de incubação em meio SH suplementado com diferentes concentrações de dicamba e 2,4-D.

M e i o (S H)	Explantes com Respostas (%)	Classificação das respostas			
		calos (%)	raros calos (%)	oxi- dação (%)	s/resp. (%)
20 μ M Dic	66,70	33,50	33,50	16,75	16,75
30 μ M Dic	83,33	33,33	50,00	16,67	-
40 μ M Di	76,67	16,67	60,00	23,33	-
2,5 μ M 2,4-D	34,78	34,78	-	65,72	-
5,0 μ M 2,4-D	3,53	3,53	-	96,47	-
7,5 μ M 2,4-D	6,67	6,67	-	93,33	-

Considerando ainda o uso de segmentos de plântulas para iniciar o processo embriogênico, quando excisados de plântulas de Mysore, como mostra a Tabela 4, a

maior percentagem de resposta para indução de calos é um pouco mais de 60 %, e os resultados evidenciam que quanto maior o índice de oxidação menores são as respostas à indução de calos. A respeito disso, observa-se que, quanto maior a concentração de dicamba, maior a percentagem de oxidação de explantes, protagonizando com os resultados obtidos por NOVAK et al. (1989).

Tabela 4 - Percentagem de explantes com resposta à indução de calos em segmentos de plântulas da cultivar Mysore após 30 dias de incubação em meio SH suplementado com diferentes concentrações de dicamba e 2,4-D.

M e i o (S H)	Explantes com respostas (%)	Classificação das calos (%)	respostas oxi- dação (%)	s/resp. (%)
20 μ M Dic	64,00	64,00	36,00	-
30 μ M Dic	36,00	36,00	64,00	-
40 μ M Dic	16,00	16,00	84,00	-
2,5 μ M 2,4-D	62,50	62,59	37,50	-
5,0 μ M 2,4-D	62,50	62,50	31,25	6,25
7,5 μ M 2,4-D	66,67	66,67	33,33	-

Por todos os aspectos apresentados acima, outros testes foram realizados na tentativa de obter com mais segurança que tecido poderia responder melhor e com padrões específicos para indução de massa globular.

No teste 2 como mostra a Tabela 5 de dados coletados de explantes da cultivar GN após 30 dias de cultivo, observa-se uma forte tendência de indução de calos para explantes provenientes de segmentos de folhas e sem diferença quanto aos outros dois explantes usados. Isto, ao contrário do que verificado por NOVAK et al. (1989), neste estudo segmentos de folhas deram melhores respostas que segmentos de rizoma.

Tabela 5 - Respostas de diferentes segmentos de plântulas da cultivar Prata à ação de meio SH suplementado com dicamba após 30 dias de cultivo

Explante	Classificação das respostas (%)		
	calos	oxidação	estável
Seg. pseudocaule (M)	2,50 2/80	26,25 21/80	71,25 57/80
Seg. rizoma (R)	2,50 2/80	30,00 24/80	67,50 54/80
Seg. foliar (F)	25,00 20/80	3,75 3/80	71,25 57/80

Neste teste 2, grande parte dos explantes permaneceram sem respostas após este período de incubação, acreditando-se que isto se deveu à baixa frequência de estímulo às células mais competentes morfogeneticamente, ou menos diferenciadas. A Figura 12A ilustra a indução de massa globular em regiões específicas do explante de segmento foliar após 70 dias de cultivo. Por conseguinte, montou-se novo teste, com o objetivo sempre de buscar o melhor tecido para indução de calos e/ou massa globular.

A Tabela 6 apresenta dados referentes ao teste 3, considerando como explantes escalpos, segmentos de pseudocaule e segmentos foliares coletados das cultivares GN e Mysore, para indução de calos e/ou massa globular. Os resultados mostram claramente que segmentos de folhas são mais responsivos nos dois cultivares avaliados, nos quais 100 % dos explantes respondem à formação de calos, e não apresentam oxidação. Com este experimento, evidenciou-se que explantes de tecido foliar respondem bem à indução de calos, mas ainda o padrão de resposta não é bem definido, pois observam-se calos esbranquiçados e amarelados, com pouco ou muitas estruturas globulares (Figura 12B).

Tabela 6 - Respostas de diferentes explantes sob a ação de meio SH suplementado com dicamba após 20 e 28 dias de cultivo, das cultivares GN e Mysore, respectivamente.

Explante	G N (AAA)			Mysore (AAB)		
	calos	oxidação	s/resp.	calos	oxidação	s/resp.
Escalpo	7/21	9/21	5/21	5/12	2/12	5/12
Pseudocaule	6/22	-	16/22	5/11	1/11	5/11
Folha	29/29	-	-	14/14	-	-

Então, com este experimento ficou mais claro que o segmento de plântulas que contém bainha foliar favorece a indução de calos. Entretanto, devido à carência de uma resposta mais definida, realizou-se outro teste. Neste teste 4, os explantes foram excisados em cortes longitudinais, onde se procurou expor tecidos com células mais similares possíveis à ação mais direta das condições de meio de cultivo.

Desta maneira, os dados apresentados na Tabela 7 demonstram que a região de inserção das bainhas foliares (explante Tipo F) caracteriza-se por apresentar maiores percentagens de indução de calos tanto na cultivar GN quanto Mysore. Ressalta-se, neste experimento, que as respostas do explante (Tipo F) são bem definidas originando-se especificamente na região de inserção da bainha foliar,

Figura 12 - Resposta de explante à indução de calos e/ou massa globular: **A** - formação de vários glóbulos na região externa de segmento foliar; e **B** - segmento de região foliar

mostrando ao centro estruturas globulares e ao redor calos. geralmente formando ao longo de toda região uma massa globular amarelada, e, quando a ação do regulador de crescimento ocorre no tecido foliar, uma massa celular esbranquiçada é formada e não tem característica nenhuma de ser embriogênica, pois é úmida, sem brilho e, normalmente, quando observada em microscópio caracteriza-se por células alongadas com grande vacúolos e citoplasma vazio, com baixa atividade citoplasmática e sem grãos de amidos evidentes.

Os outros explantes, os tecidos laterais mais compactos do pseudocaule em cortes longitudinais, cultivados verticalmente com pouco contato com o meio de cultivo, horizontalmente com a parte cortada em contato direto com o meio de cultivo e horizontalmente com a parte cortada voltada para cima (Tipos A, B e C, respectivamente) e tecido central dissecado longitudinalmente (Tipo M), quando inoculados, provavelmente exsudam substâncias fenólicas, principalmente se a parte cortada estiver em contato direto com o meio de cultivo, e, conseqüentemente, tornam-se mais oxidados e necróticos e pouco respondem à indução de calos.

Tabela 7 - Respostas de diferentes explantes sob a ação de meio SH suplementado com dicamba após 40 e 60 dias de cultivo para a cultivar GN e 30 dias de cultivo para a cultivar Mysore.

Explante	G N (AAA)			Mysore (AAB)		
	calos	oxidação	s/resp.	calos	oxidação	s/resp.
Tipo M ¹	5/100	28/100	67/100	24/101	64/101	13/101
(%) ^a	(5,00)	(28,00)	(67,00)	(23,76)	(63,37)	(12,87)
(%) ^b	(5,00)	(94,00)	-	-	-	-
Tipo A	-	17/34	17/34	-	-	-
(%)	-	(50,00)	(50,00)	-	-	-
(%)	-	(100,00)	-	-	-	-
Tipo B	-	35/40	5/40	-	-	-
(%)	-	(87,50)	(12,50)	-	-	-
(%)	(2,50)	(97,50)	-	-	-	-
Tipo C	5/81	65/81	10/81	5/135	43/135	87/135
(%)	(6,17)	(77,78)	(12,35)	(3,70)	(31,85)	(64,45)
(%)	(12,35)	(87,65)	-	-	-	-
Tipo F	47/98	29/98	22/98	171/190	8/190	11/190
(%)	(47,96)	(29,59)	(22,45)	(90,00)	(4,21)	(5,79)
(%)	(61,23)	(29,59)	(9,18)	-	-	-

¹ Dados referentes à resposta após 40 e 30 dias de incubação para GN e Mysore, respectivamente.

^a Percentagens referentes à resposta após 40 e 30 dias de incubação para GN e Mysore, respectivamente.

^b Percentagens referentes à resposta após 60 dias da cultivar GN.

Com base neste teste 4 ilustrado na Figura 13, definiu-se com segurança como melhor explante para indução de calos e/ou massa globular, o tecido de inserção das extremidades da bainha foliar (Tipo F), por apresentar

Figura 13 - Resposta de diferentes explantes à indução de calos e/ou massa globular: **A** - região superficial (Tipo B); **B** - região superficial (Tipo C); **C** - tecido central (Tipo M); e **D** - região de inserção das extremidades de bainha foliar (Tipo F).

resposta bem característica. Além do mais, salvo se oxidar o explante, todos respondem à indução de calos e/ou massa globular quando submetidos a meio SH suplementado com dicamba.

4.3.2 - Testes de concentrações de dicamba na indução de calos e/ou massa globular

No teste 1 para escolha da melhor concentração de dicamba para indução de calos e/ou massa globular, de acordo com a Tabela 8, observa-se que em todas concentrações desde 10 a 40 μM há indução. Quase todos os explantes respondem, exceto se o explante sofre oxidação devido à exsudação de substâncias fenólicas ao meio, cuja tendência é crescente, à medida que a concentração de dicamba aumenta no meio. Fato este observado por NOVAK et al. (1989).

Outro fato evidenciado foi quanto à indução de massa globular. Em todas as cultivares, verificou-se que à concentração de 10 μM é notadamente mais alta a resposta à formação de massa globular, reduzindo-se com o aumento da concentração de dicamba. Essa massa globular torna-se mais amarelada nas concentrações mais altas. PICKARDT et al. (1989) observaram que a quantidade de tecidos de calos produzidos em ápices caulinares de *Vicia narbonensis*,

declinou também levemente e atrasou a formação de embriões com o aumento do nível de 2,4-D, cuja maior percentagem de explantes induzindo calos embriogênicos foi à concentração de 10 μ M 2,4-D.

Tabela 8 - Efeitos de diferentes concentrações de dicamba em meio SH sobre explantes (Tipo F) das cultivares GN, Mysore e Prata, aos 35, 22 e 30 dias de cultivo, respectivamente.

Cultivar	Efeito	D i c a m b a (μ M)			
		10	20	30	40
	somente calos (%)	-	-	-	-
G N (AAA)	massa globular (%)	100,00	100,00	100,00	85,71
	baixa	-	1/17	2/12	4/14
	média	-	1/13	3/12	2/14
	alta	13/13	11/13	7/12	6/14
	somente calos (%)	-	39,47 15/38	-	-
Mysore	massa globular (%)	100,00	52,63	89,29	88,89
	baixa	23/40	20/38	8/28	17/35
	média	17/40	-	17/28	15/35
	alta	-	-	-	-
	somente calos (%)	-	-	-	-
Prata	massa globular (%)	100,00	100,00	100,00	100,00
	baixa	5/14	-	-	1/15
	média	7/14	17/17	12/12	14/15
	alta	2/14	-	-	-

Uma característica importante observada foi aquela onde os explantes da cultivar Mysore respondem em menor tempo (20 dias) à formação de calos e/ou massa globular, seguido de GN e Prata. Esta formação de massa globular inicia-se pelo intumescimento do tecido com tonalidade amarela, e a partir de 10-15 dias os glóbulos começam originar-se ao longo de toda extensão de inserção das bainhas foliares, com continuada proliferação até aos 45-70 dias. A tendência natural, após este período, é oxidação e necrose, provavelmente pela carência ou exaustão de nutrientes no meio e acúmulo de compostos inibidores de crescimento no ambiente de cultivo, ou pela máxima ação dos reguladores de crescimento sobre o processo de dediferenciação e diferenciação, conseqüente desequilíbrio no balanço de reguladores de crescimento e, por fim, morte das células.

Para avaliar a redução da concentração de dicamba, montou-se o teste 2 com 2,5; 5,0 e 10,0 μM de dicamba, tomando como base explantes da cultivar Mysore. A Tabela 9 mostra os resultados de dados coletados de respostas de explantes da cultivar Mysore, pelos quais se nota que a maioria dos explantes submetidos a 2,5 μM de dicamba somente formam calos ou baixa indução de massa globular. Porém, com o aumento da concentração de dicamba, há maior formação de massa globular e a 10 μM , após 30 dias de incubação, somente

se observa massa globular. Além disso, observou-se que explantes em meio sem reguladores de crescimento, dados não mencionados, raramente formam calos e freqüentemente desenvolvem raízes.

Tabela 9 - Efeitos de diferentes concentrações de dicamba em meio SH sobre explantes (Tipo F) da cultivar Mysore após 15 e 30 dias de cultivo.

Dicamba (μ M)	tempo (dias)	somente calos	<u>massa globular</u>			oxidado s/resp.	
			baixa	média	alta		
2,5	15	11/45	4/45	-	-	-	30/45
	30	14/45	11/45	1/45	-	19/45	-
	Resposta (%)	(57,78) 100,00	(31,11) 53,84	(26,67) 46,16			
5,0	15	13/43	7/43	-	-	-	23/43
	30	4/43	16/43	11/43	5/43	7/43	-
	Resposta (%)	(83,72) 100,00	(9,3) 11,11	(74,42) 88,89			
10,0	15	23/40	16/40	5/40	-	5/40	14/40
	30	-	9/40	15/40	6/40	10/40	-
	Resposta (%)	(75,00) 100,00	(0,0) 0,0	(75,00) 100,00			

FITCH (1993) observou também formação de calos em seções de hipocótilo de mamão em meio sem reguladores de crescimento e formação de raízes em muitos desses explantes. Por outro lado, em meio MS, contendo de 2,3 a 112,5 μM 2,4-D induziram calos embriogênicos ou diretamente embriões somáticos, cujos calos subcultivados em meios sem reguladores de crescimento, freqüentemente diferenciaram embriões somáticos e germinaram. A Figura 14 resume as respostas a diferentes concentrações de dicamba.

Pelo exposto acima, a concentração de 10 μM dicamba parece ser a mais recomendada para a indução de massa globular, independentemente da cultivar utilizado. Pelas observações realizadas, quanto mais jovens forem as plantas nesse processo, menos exsudação de substâncias fenólicas e todos os explantes delas provenientes respondem em meio SH suplementado com dicamba. Tecidos do rizoma do cilindro central, tomados de brotos de *Musa* por NOVAK et al. (1989), proliferaram calos proembriogênicos sobre meio SH suplementado com dicamba a concentrações entre 10 e 160 μM dentro de 5 a 6 semanas. Similares resultados dentro de 3 a 7 semanas obtiveram-se neste estudo, porém numa variação de concentração de dicamba entre 2,5 a 40 μM .

Figura 14 - Indução de calos e/ou massa globular a diferentes concentrações de dicamba em explante Tipo F: A - 30 μM ; B - 20 μM ; e C - 10 μM .

Explantes de bainhas basal da folha de todos os genomas, testados de *Musa* (grupos AA, AAA e ABB) por NOVAK et al. (1989), apresentaram um padrão similar de formação globular sem crescimento de calos. Entretanto, genomas AA induziram mais intensa proliferação de calos embriogênicos que triplóides (AAA e ABB). Comparativamente, formação de massa globular bem definida de todos os genomas (AAA e AAB) obteve-se, porém sem diferença quanto à intensidade de formação, a não ser quanto a diferentes concentrações de dicamba.

Foi observado ainda por NOVAK et al. (1989) que explantes provenientes de plântulas in vitro respondem melhor que os provenientes de plantas crescidas em solo, e que tecido do rizoma responde mais que de folha em Meio SH suplementado com dicamba. Em contraste, neste estudo, observou-se que tecido de inserção da extremidade de bainhas foliares (Tipo F) responde melhor.

4.3.3 - Testes para melhorar a formação de calos e/ou massa globular

Com o objetivo de melhorar a qualidade de indução de massa globular em meio SH suplementado com 10 μ M de dicamba, adicionou-se zeatina nas concentrações de 0,0;

0,2 e 0,5 mg.l⁻¹. Entretanto, pelas observações realizadas não houve diferenças quanto à indução de massa globular, pois todos os tratamentos apresentaram comportamento similar quando observados sob lupa binocular. Contudo, NOVAK et al. (1989) observaram que a combinação de dicamba (30 μ M) com 5 μ M de thidiazuron melhorou a formação de calos e contornou o problema de escurecimento que os explantes apresentavam.

Ademais, diferenças entre esses testes foram verificadas na etapa seguinte do processo de embriogênese somática, ou seja, quando do desenvolvimento de estruturas globulares, onde foram observadas redução na ocorrência de embriões adventícios e maior ocorrência de estruturas globulares lisas sem calos superficiais, indicando que houve uma melhora na formação de massa globular, quando adicionado zeatina no meio de indução. REDENBAUGH et al. (1988) observaram que maltose foi efetiva para a maturação dos embriões de alfafa durante o último estágio prévio à conversão. Ao contrário, quando obtidos embriões de baixa qualidade, as respostas típicas eram calos, hipertrofia do hipocótilo, crescimento de raiz sem crescimento de caule, produção de embriões secundários, produção de cotilédones fusionados, e desenvolvimento de folhas morfológicamente anormais. Então, a busca de melhor qualidade de formação dos embriões somáticos é fundamental no processo normal de regeneração de plantas via embriogênese somática.

Os testes realizados mostraram que estruturas globulares originaram-se à superfície dos explantes, desde que em meios suplementados com auxina, preferencialmente dicamba, ou auxina em combinação com zeatina. NADOLSKA-ORCZYK (1992) também observou embriões globulares originarem-se sobre cotilédones imaturos de espécies de lúpulo, quando submetidos a meios básicos com 5 mg.l⁻¹ 2,4-D sozinho ou combinado com 0,25 mg/l Cinetina.

4.3.4 - Desenvolvimento de estruturas globulares

Esta etapa caracterizou-se pela transferência de calos e/ou massa globular para meio líquido em frascos de 250 ml sob agitação a 70 rpm. Observou-se que, após transferência dessas massas globulares originadas sobre a superfície dos explantes para meio líquido sob agitação, foram liberadas várias estruturas globulares e células para o meio. McWILLIAM et al. (1974) observaram que embrióides de cenoura são iniciados à superfície ou próximo à superfície de agregados de células características (grupos embriogênicos) e liberados desses agregados como estruturas livres flutuantes para meio líquido em agitação. Todavia, o desenvolvimento dos embrióides foi promovido pela

transferência de um meio contendo 2,4-D para outro meio livre de 2,4-D.

As estruturas que se observou serem liberadas em meio, preferencialmente livre de auxinas, em princípio eram globulares e, à medida que se desenvolveram, tornaram-se translúcidas (Figura 15A). Isto foi verificado com mais ênfase em glóbulos provenientes de meio a menor concentração de dicamba ($10 \mu\text{M}$), enquanto em glóbulos provenientes de concentrações de dicamba superiores a $10 \mu\text{M}$ são menos translúcidas, tendendo a amarelo-pálido.

Nesta fase, em todos os meios usados, houve liberação e desenvolvimento de estruturas globulares. Os meios sem reguladores de crescimento favoreceram mais este desenvolvimento. DHED'A et al. (1991) e PANIS et al. (1993), quando transferiram células para meios $\frac{1}{2}$ MS sem reguladores de crescimento, também obtiveram grande número de estruturas globulares. A formação de embrióides em cenoura também foi possível, quando transferiram calos ou células em suspensão para meios de cultivo livre de 2,4-D, e, mesmo havendo formação de embrióides na presença de 2,4-D (1 mg.l^{-1}), o desenvolvimento destes foi inibido (SMITH & STREET, 1974).

Verificou-se, ao usar meio R2 suplementado com vitaminas de MS, que as estruturas globulares desenvolvidas apresentavam uma superfície mais lisa, o que caracteriza mais os embriões somáticos, enquanto que em outros meios ($\frac{1}{2}$ MS e

R2 completo com reguladores de crescimento), ocorreu maior formação de calos na superfície das estruturas globulares desenvolvidas.

Outro fato observado diz respeito à grande quantidade de estruturas globulares desenvolvidas nesta etapa. Independente do genoma utilizado, centenas dessas estruturas foram vistas a olho nu com cerca de 15 a 30 dias de cultivo (Figura 15C). Ressalta-se que houve maior ocorrência de embriões anormais (Figura 15B) a partir de massa globular proveniente de meios suplementados com altas concentrações de dicamba ($\geq 20 \mu\text{M}$). Essas massas globulares provenientes desses meios também apresentaram menores quantidades de estruturas globulares desenvolvidas.

DHED'A et al. (1991) observaram também freqüente formação de embriões somáticos adventícios sobre glóbulos isolados nos estádios de formação e maturação dos glóbulos, os quais também apresentaram a característica de invaginação em um pólo. Nos testes que se realizaram, essas estruturas adventícias nunca originaram plântulas e somente desenvolveram raízes.

107

Figura 15 - Desenvolvimento de estruturas globulares: A - estruturas mostrando invaginação em um pólo e em outro pólo oposto alongamento; B - desenvolvimento de estrutura anormal; e C - obtenção de centenas de estruturas isoladas em meio líquido.

Entretanto, mesmo não havendo diferenças quanto à formação de massas globulares em meios suplementados com 10 μ M dicamba com e sem adição de zeatina, a qualidade de desenvolvimento das estruturas globulares isoladas, considerando-se estruturas globulares desenvolvidas com superfície lisa, foi mais freqüente em meios suplementados com zeatina (Figura 16).

4.3.5 - Maturação e germinação de estruturas globulares

Esta fase caracterizou-se geralmente pela invaginação de uma das extremidades e alongamento da extremidade oposta, possivelmente de onde emergem parte aérea e raízes, respectivamente. Contudo, na maioria dos casos, o que se viu foi a formação de raízes ou apenas aumento dessas estruturas, sem contudo haver germinação completa. Fato semelhante foi observado por EMONS & DE DOES (1993) em embriões somáticos isolados de milho, os quais formaram somente rudimentar ou não escutelo, careciam de coleoptilo e primórdios foliares, e desenvolveram raízes mas não se converteram em plântulas, nos meios submetidos.

Figura 16 - Formação de estruturas globulares verdes com superfície lisa em meio SH com 10 μM dicamba combinado com zeatina (1-2 μM) sob luz.

DHED'A et al. (1991) e PANIS et al. (1993) observaram que estruturas globulares de *Musa* submetidas a meios com BAP ou zeatina, uma semana depois tornaram-se translúcidas com um centro opaco, e numa das extremidades da estrutura globular invaginaram numa forma circular. Do lado invaginado, observaram uma fenda cotiledonária com a zona meristemática apical e, próximo ao procâmbio, o eixo de conexão da zona apical com o meristema radicular. Morfologicamente, assemelharam-se ao que se obteve neste estudo, onde inicialmente as estruturas eram opacas e posteriormente desenvolveram e apresentaram dois pólos, um invaginado e outro alongado.

Considerou-se que zeatina melhorou o processo de desenvolvimento e maturação das estruturas globulares, e isto também pôde ser verificado por FUJIMURA & KOMAMINE (1975) que conseguiram uma alta taxa de formação de embriões somáticos (70-80%) em cenoura, quando zeatina (10^{-7} M) foi adicionada em meio livre de auxina. NADOLSKA-ORCZYK (1992) também conseguiu maturação de embriões globulares de lúpulo, em meio contendo ABA (0,1-0,5 mg.l⁻¹) sozinho ou combinado com zeatina ou com BAP (0,1 mg.l⁻¹) e alta relação NH_4/NO_3 . Ademais, observaram que embriões somáticos mais maduros formados em meio contendo NAA (5 mg.l⁻¹) mais BAP (1; 0,5 ou 0,1 mg.l⁻¹), tornaram-se necróticos após primeira transferência para meio de subcultivo, fato que geralmente se

observou neste estudo, quando se transferiram estruturas globulares bem desenvolvidas para meios de maturação e germinação de estruturas globulares.

Poucas estruturas, isoladas com superfícies lisas e bem desenvolvidas, sofreram maturação, germinação e originaram pequenas plântulas. Enfatiza-se que primeiramente emergiu a parte aérea para subseqüentemente emitir raízes. DHED'A et al. (1991) mencionaram que a germinação dos glóbulos é prolongada e demora de 3 a 4 semanas, e o principal evento morfogênético que ocorre por ocasião da germinação do embrião somático diz respeito ao desenvolvimento da plúmula. Outrossim, observou-se que estruturas verdes maduras com superfície lisa provenientes de meios com adição de zeatina, iniciaram germinação a partir de uma semana em meio R2 semi-sólido suplementado com 10 μ M BAP (Figura 17).

Dentre os meios utilizados, mesmo comportamento foi observado, principalmente o escurecimento das estruturas globulares ou apenas emissão de raízes. Porém naqueles meios suplementados com zeatina, diminuiu a emissão precoce de raízes, particularmente surgidas quando ainda em meio sem reguladores de crescimento ($\frac{1}{2}$ MS ou R2).

Figura 17 - Sequência de conversão de embrião somático isolado em plântula: A - embrião em fase de maturação; B - embrião em início de germinação; C - desenvolvimento do sistema caulinar; D - plântula em fase de desenvolvimento; e E - formação de plântula completa.

Estruturas globulares ainda agregadas ao explante original desenvolveram-se melhor que isoladamente, principalmente em meio com $\frac{1}{2}$ MS ou R2 sem reguladores de crescimento. Tornaram-se verdes e posteriormente desenvolveram parte aérea e emitiram raízes, como mostra a Figura 18. Tanto raízes quanto parte aérea foram observadas, desenvolverem-se em um mesmo meio, indicando que o processo se dá por via embriogênica, posto que não é necessária a transferência para meios específicos de enraizamento.

Houve fortes indícios, através da germinação de estruturas desenvolvidas isoladas em meio R2 com 10 μ M de BAP, de que o uso de citocinina deve ter um papel importante no processo de conversão de embriões somáticos em plantas. Isso foi observado tanto por NOVAK et al. (1989) quanto por DHED'A et al. (1991), os quais enfatizaram que o uso de citocinina, mais especificamente zeatina, é fundamental para germinação de embriões somáticos de bananeira. Além do mais, como verificado nos experimentos sem reguladores de crescimento, há desenvolvimento dos embriões somáticos isolados, porém nunca se converteram em plantas, o que evidencia que deve estar faltando um estímulo externo, provavelmente zeatina ou BAP, para desencadear o processo de desenvolvimento de meristema caulinar e radicular, e, conseqüentemente, regenerar plântulas.

Figura 18 - Seqüência de conversão de embrião agregado ao explante em plântula: A - maturação dos embriões somáticos; B - germinação e desenvolvimento do sistema caulinar; e C - formação de plântulas completas.

DHED'A et al. (1991) mencionaram, que quando meio líquido é usado para a germinação de glóbulos, no mais alto nível de citocininas ($10 \mu\text{M}$), também estimula a transformação de embriões somáticos em plântulas normais. Outrossim, ressaltaram que BAP foi melhor que zeatina, mas produziu com maior frequência plântulas anormais. Mesmo assim, a relação plântulas normais/anormais foi maior em meio com BAP que com zeatina.

4.3.6 - Formação e desenvolvimento de plântulas

Para a formação e desenvolvimento de plântulas, resultados indicaram que após a maturação e germinação das estruturas globulares, ou seja, o desenvolvimento de estrutura bipolar (embriões somáticos), que contém meristema radicular e caulinar, a regeneração de plântula pode ser facilmente obtida em meios líquidos sob agitação (30 rpm) ou meios semi-sólidos sem reguladores de crescimento, tanto em $\frac{1}{2}$ MS quanto em R2 com vitaminas de MS. Acredita-se que, após processo de desenvolvimento das estruturas bipolares desencadeado anteriormente, somente se necessita de condições nutricionais para completar desenvolvimento, pois a partir de então, já sintetizam reguladores de crescimento endógenos suficientes para formarem plântulas (Figura 19). Em

contraste, com embriões somáticos de mamão, após germinados, formaram plântulas completas normais, quando submetidos a meio com 1 μ M BA e 0,5 μ M cinetina (FITCH, 1993).

Nas condições testadas observou-se formação e desenvolvimento de plântulas em todos os meios testados. Regeneraram-se plântulas tanto de estruturas desenvolvidas individualmente quanto agregadas a tecidos dos explantes, de todos as cultivares como mostra a Tabela 10.

Tabela 10 - Número de plântulas regeneradas via embriogênese somática das três cultivares envolvidas no trabalho.

Cultivar	Número de frascos	Tipos de estruturas embrionárias		Total
		agregadas	isoladas	
G N	20	31 (75,6%)	10 (24,4%)	41
Prata	10	19 (86,4%)	03 (13,6%)	22
Mysore	05	15 (83,3%)	03 (16,7%)	18
Total	35	65 (80,2%)	16 (19,8%)	81

Figura 19 - Formação e desenvolvimento de plântulas em meio líquido sem reguladores de crescimento

A eficiência de regeneração de plântulas foi baixa, não sendo possível determiná-la com exatidão, mas, considerando-se 500 estruturas globulares desenvolvidas por frasco, ter-se-ia uma taxa de regeneração de 0,4% (2/500). Isso é compreensível inicialmente, pois na maioria das outras espécies, observou-se o mesmo, sendo que eficiência foi aumentada, melhorando-se a formação dos embriões somáticos, usando outros compostos no meio, tais como: maltose, agarose, zeatina, BAP, ABA, cinetina, L-prolina, carvão ativado, e outros.

PICKARDT et al. (1989), ao reduzirem a concentração de citocinina, favoreceram o desenvolvimento de raízes, porém a regeneração de plantas completas em *Vicia narbonensis* foi relativamente baixa. Todavia, DHED'A et al. (1991) conseguiram nos melhores tratamentos testados, regeneração de plântulas normais de bananeira da cultivar Bluggoe (grupo ABB) entre 10-14%, enquanto NOVAK et al. (1989) conseguiram que embriões somáticos, totalmente desenvolvidos em meio líquido, convertessem em plântulas verdes a uma taxa de regeneração baixa, que não excedeu 1,5% de embriões em germinação. Foi melhorada quando usaram meio de dupla camada obtendo maior frequência de regeneração para genótipos AA e menor para AAB, a primeira alcançando 12% para cultura de células embriogênicas do clone diplóide "Bocadillo" (AA).

Neste trabalho, da cultivar GN (AAA) conseguiu-se maior número de plântulas regeneradas, particularmente de estruturas globulares desenvolvidas isoladas, o que demonstra uma tendência de cultivar deste grupo (AAA) ser mais responsivo ao processo de regeneração de plântulas via embriogênese somática em relação aos cultivares do grupo AAB, como observado por NOVAK et al. (1989).

É possível aumentar a eficiência de regeneração de plântulas, melhorando a qualidade dos embriões desenvolvidos. Em arroz, ELLA & ZAPATA (1990) aumentaram a regeneração de plântulas verdes, quando calos foram previamente cultivados em meio com ABA a $0,5 \mu\text{M}$ por duas semanas, antes de serem submetidos ao meio de regeneração livre de ABA mas suplementado com $5,0 \mu\text{M}$ BAP e $2,5 \mu\text{M}$ NAA, ou quando transferiram calos diretamente para meio de regeneração, mas suplementado com $2,5 \mu\text{M}$ Zeatina.

Para regeneração de plântulas de bananeira, a partir de suspensão de células via embriogênese somática, DHED'A et al. (1991) usaram cinco meios definidos, NOVAK et al. (1989) usaram sete meios definidos, enquanto neste trabalho, usaram-se geralmente, quatro meios definidos.

4.3.7 - Aclimação e crescimento das plantas

Após obtenção das plântulas, a aclimação inicialmente sob câmara úmida, por 3-5 dias, é bastante viável, a partir da qual, na maioria das vezes, 100% das plantas sobreviveram. Quando transferidas para sacos de polietileno pretos com substratos, continuaram a crescer e tornaram-se mudas (Figura 20). NOVAK et al. (1989) também, antes das plântulas de embriões somáticos serem transferidas para solos, aclimataram por uma semana em câmara úmida, e, quando em solos, cresceram vigorosamente.

Uma característica muito favorável dessas mudas provenientes do processo de embriogênese somática foi o vigor apresentado pelas plantas, pois foram obtidas plântulas com raízes e parte aérea bem desenvolvidas. Além disso, tiveram comportamento semelhante às plantas provenientes de micropropagação por ápices caulinares, particularmente quanto às características morfológicas, idênticas a uma planta normal.

Considerando-se desde a obtenção de suspensão de células embriogênicas (4 a 6 meses), conversão de embriões somáticos a plântulas (3 a 4 meses) e desenvolvimento das plântulas (2 meses), DHED'A et al. (1991) obtiveram plântulas aptas à aclimação com cerca de 9 a 12 meses, enquanto neste

Figura 20 - Aclimação e crescimento normal das plantas, regeneradas via embriogênese somática, sob casa de vegetação.

trabalho foi possível aclimatar plântulas de 3 a 6 meses. Isso foi obtido, graças à não passagem prévia do material pela fase de suspensão de células e sim, pela indução direta de estruturas globulares a partir das células do explante original.

As plantas aclimatadas estão em crescimento e aptas a serem transplantadas para campo de produção. Essas plantas em campo deverão ser acompanhadas quanto a crescimento e produção de frutos.

4.4 - Células em suspensão

As suspensões de células embriogênicas obtidas por DHED'A et al. (1991) caracterizaram-se por um relativamente grande núcleo, nucléolos muito densos, múltiplos pequenos vacúolos e minúsculos grãos de amido e proteína, que são qualidades associadas à competência morfogênética. Células em suspensão, como descritas acima, foram obtidas como mostram as Figuras 21A e 21B, que inicialmente eram alongadas e após vários subcultivos tornaram-se arredondadas, isoladas ou em pequenos grupos. Porém na maioria dos casos, após contínuos subcultivos no mesmo meio, oxidaram e não permitiram mantê-las e usá-las

como rotina para trabalhos de embriogênese somática e/ou isolamento de protoplastos.

As suspensões de células de *Musa* obtidas por NOVAK et al. (1989) provenientes de calos proembriogênicos foram mantidas sem maturação de embriões somáticos por subcultivo regular em metade de MS suplementado com 20 μ M de dicamba, caracterizadas por células, na sua maioria, dissociadas, que ocasionalmente formaram agregados. Essa característica também foi observada quando se cultivaram células em meio R2 suplementado com 10 μ M dicamba e 1 μ M zeatina.

4.5 - Isolamento de protoplastos

Usando como fonte células em suspensão da cultivar Prata (AAB) para isolamento de protoplastos, caracterizadas por células arredondadas, ricas em minúsculos grãos de amido, isoladas ou em pequenos grupos, não se obteve êxito no isolamento de protoplastos, quando expostas nas duas misturas de enzimas (A - celulase RS 1% e pectoliase Y-23 0,2%, e B - celulase RS 4%; macerozyme R-10 1% e pectoliase Y-23 0,02%), por um tempo de 5 a 24 h.

Figura 21 - Células em suspensão e isolamento de protoplastos de mesofilo foliar: A - células em suspensão da cultivar Mysore; B - células em suspensão da cultivar GN; C - isolamento de protoplastos de mesofilo em solução de enzimas; e D - protoplasto isolado apresentando atividade citoplasmática.

Em contraste, PANIS et al. (1993) obtiveram um rendimento superior a 6×10^7 protoplastos/ml de células empacotadas da cultivar Bluggoe de *Musa* quando expostas por 24 h a uma mistura de enzimas (celulase, macerozyme e pectoliase, 1% cada), a partir dos quais regeneraram plantas via embriogênese somática direta, enquanto MEGIA et al. (1993), usando mesma fonte, mas com células expostas a uma mistura de enzimas (celulase 1,5%; pectoliase 0,15% e hemicelulase 0,2%) por 5 h, obtiveram rendimento de $6-15 \times 10^5$ protoplastos por grama de peso fresco, e taxa de 10% e acima de 50% de regeneração de plantas via embriogênese somática direta e indireta, respectivamente, dos embriões obtidos, particularmente quando protoplastos foram co-cultivados com "feeder layer" (células alimentadoras de *Lolium multiflorum* ou de *M. acuminata* (AA) ssp *burmannica* cv "Long Tavoy").

Outrossim, RHODES et al. (1988), trabalhando com células de milho, em suspensão, conseguiram isolamento de protoplastos entre $1-5 \times 10^6$ protoplastos por grama de células em suspensão, dos quais também regeneraram plantas via embriogênese somática.

Quando se usaram células de mesofilo foliar de extremidade basal de bainhas de folhas de plântulas *in vitro* da cultivar GN (AAA), obteve-se isolamento de protoplastos quando expostos por 5 h à mistura de enzimas B, de $1,5 \times 10^6$ protoplastos por grama de tecido fresco (Figuras 21C e 21D),

superior àquele obtido por MATSUMOTO et al. (1984) de $8,6 \times 10^5$ protoplastos por grama de explantes (brácteas), os quais formaram parede celular, sofreram divisões mas não regeneraram plântulas.

Contudo, os protoplastos obtidos quando foram plaqueados nas densidades de 4,2 ou 1×10^5 protoplastos/ml em diferentes meios de cultivo com ou sem "nurse cells" (células auxiliadoras) da cultivar de arroz IR 52, permaneceram viáveis por 10-15 dias sem contudo regenerarem parede celular ou sofrerem divisões. Conseqüentemente, tornaram-se débeis e morreram.

Por outro lado, GUPTA & PATANAYAK (1993) isolaram protoplastos de células do mesofilo da base de folha ou tecido de bainha de plântulas *in vitro* de arroz (2×10^7 protoplastos/g tecido fresco) que sofreram divisões sustentáveis quando co-cultivados com "feeder layer" (células em suspensão de arroz "Meghalaya 1") e regeneraram plântulas de quatro variedades estudadas.

Outrossim, esses testes preliminares indicaram que é possível isolamento de protoplastos de mesofilo de *Musa*, porém mais estudos precisam ser realizados para concretizar regeneração de plântulas. Acredita-se nessa possibilidade, pois esse explante apresenta grande potencial como fonte de protoplastos, considerando-se que foram

competentes para regeneração de plantas via embriogênese somática.

4.6 - Prospecto do trabalho para o futuro

A obtenção de embriões somáticos e regeneração de plântulas nas cultivares comerciais de bananeira triplóides estudadas cria várias oportunidades não praticáveis, quando plantas são regeneradas via organogênese, particularmente, sabendo-se da grande dificuldade para cruzamento sexual e que a propagação é vegetativa.

Portanto, a embriogênese somática constitui-se numa atrativa alternativa para regeneração de plantas na cultura da bananeira, principalmente considerando-se embriogênese somática em meio líquido, onde, a partir de um frasco, grande quantidade de embriões são produzidos e originarão plantas. Esse aspecto é importantíssimo para esta cultura, cujos custos para produção de mudas, transporte e manipulação das mudas são elevados. Além disso, este método permite produzir mudas em qualquer época, menor espaço físico e baixo custo de produção.

Outro ponto importante deste trabalho foi provar que é possível desenvolver o processo de embriogênese somática para todas as cultivares envolvidas. Portanto, abre

novas perspectivas para o melhoramento da cultura, principalmente através do método de melhoramento por mutação, onde se poderão obter mutantes sólidos sem quimerismo, admitindo-se que embriões somáticos são de origem unicelular.

Um outro propósito a que se presta seria usá-lo para resolver vários problemas que a cultura apresenta, como susceptibilidade às doenças, a estresses ambientais, através da manipulação genética pela introdução de genes exógenos, clonados e de interesses agrônômicos, diretamente nas células competentes do explante selecionado, podendo-se obter, via embriogênese somática, regeneração das plantas transgênicas com a característica desejável introduzida. Entretanto, a eficiência de regeneração de plantas deve ser otimizada.

Para tanto, um aspecto importante, nesse sentido, é melhorar a qualidade dos embriões, posto que a obtenção de embriões somáticos parece estar definitivamente viabilizada, pois todos os explantes determinados por este trabalho, quando submetidos a meio de indução de embriogênese somática, são capazes de iniciar o processo.

Entretanto, para conseguir esses objetivos, além de testar outros compostos no meio (maltose, agarose, L-prolina, carvão ativado, ABA, e outros), sugere-se que todas as etapas do processo sejam acompanhadas de um estudo anatômico e morfológico das estruturas desenvolvidas. Dessa maneira, certamente será determinada com segurança que etapa

do processo precisa ser melhorada. Além do mais, não restará dúvidas quanto à originalidade do processo e se realmente a origem dos embriões é uni ou multicelular.

Ademais, abre a possibilidade de obtenção de sementes artificiais, o que é plenamente justificável para esta cultura. Os embriões são considerados órgãos naturais de perenidade, muitos dos quais se tornam dormentes. Logo, se dormência puder ser induzida nos embriões somáticos de bananeira, surge a possibilidade de incorporá-los em sementes artificiais, seja por revestimento ou encapsulamento. Por conseguinte, facilitará a manipulação dessas sementes artificiais para plantações, armazenamento, transporte, etc.

Considerando-se ainda que a conservação de germoplasma de clones de *Musa* é fundamental como banco de genes para trabalhos de melhoramento, a conservação de células em suspensão e posterior regeneração de plantas, via embriogênese somática, surge como uma alternativa viável para esse propósito.

Acredita-se, pelos resultados preliminares obtidos de isolamento de protoplastos a partir de mesofilo de folhas de plântulas *in vitro*, ser outra alternativa promissora para regeneração de plantas, posto que as células desses explantes mostraram-se competentes para os trabalhos de embriogênese somática.

5 - CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido com as cultivares GN (AAA), Mysore (AAB) e Prata (AAB), permite as seguintes conclusões:

- 1) a multiplicação e desenvolvimento de plântulas, a partir de ápices caulinares, é plenamente obtida em meio MS suplementado com $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP;
- 2) é possível regenerar plantas de bananeira pelo processo de embriogênese somática;
- 3) o explante, região de inserção das extremidades da bainha foliar (Tipo F), é ideal para iniciar o processo de embriogênese somática;
- 4) o meio SH suplementado com $10 \mu\text{M}$ de dicamba é eficiente para induzir formação de massa globular;
- 5) há maior formação de embriões adventícios, quando massa globular é formada em meio de indução com concentração de dicamba acima de $20 \mu\text{M}$, e a adição de zeatina no meio de indução parece favorecer o desenvolvimento de estruturas globulares verdes e individualizadas, sem embriões adventícios, em meio líquido sob agitação.

6) a transferência de massa globular e/ou calos para meios líquidos, sem reguladores de crescimento sob agitação, é determinante para individualização dos glóbulos e permite desenvolvimento dos embriões;

7) os embriões somáticos desenvolvidos com superfície verde e lisa ser o tipo ideal para converter-se em plantas;

8) há maior regeneração de plantas quando os embriões somáticos são desenvolvidos agregados ao explante do que isoladamente;

9) iniciado o processo de desenvolvimento do meristema radicular e caulinar, a formação e desenvolvimento de plântulas pode ser viabilizada tanto em meio (R2 ou $\frac{1}{2}$ MS) líquido quanto em meio semi-sólido sem reguladores de crescimento;

10) as plântulas obtidas por embriogênese somática apresentam-se com sistema radicular bem desenvolvido e são vigorosas;

11) as plântulas regeneradas crescem normalmente, quando aclimatadas em câmara úmida inicialmente, e posteriormente sob casa de vegetação em substrato composto de solo e vermiculita;

12) Estes são os primeiros resultados positivos de plantas regeneradas via embriogênese somática no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P. V. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. **Plant Physiology**, Rockville, **59**: 579-86, 1977.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. ed. **Handbook of plant cell culture**. New york, MacMillan, 1983. v.1, p. 82-123.
- BANERJEE, N. & DE LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **4**: 351-4, 1985.
- BARKER, W. G. & STEWARD, F. C. Growth and development of the banana plant. 1. The growing regions of the vegetative shoot. **Annals of Botany**, London, **26**: 389-411, 1962.
- BISWAS, G. C. G. & ZAPATA, F. J. Plant regeneration from long-term cell suspension culture of indica rice (*Oryza*

sativa L. cv. IR 43). *Journal Plant Physiology*, Stuttgart, 139: 523-7. 1992.

BISWAS, G. C. G. & ZAPATA, F. J. High-frequency plant regeneration from protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L.) using maltose. *Journal Plant Physiology*, Stuttgart, 141: 470. 1993.

CHEE, P. P. & TRICOLI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Reports*, Heidelberg, 7: 274-277. 1988.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y. & BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*, 5: 659-68, 1975.

CRONAUER, S. S. & KRIKORIAN, A. D. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. *Annals of Botany*, London, 53: 321-8, 1984a.

CRONAUER, S. S & KRIKORIAN, A. D. Rapid multiplication of bananas and plantains by in vitro shoot tip culture. **HortScience**, Alexandria, **19**: 234-5, 1984b.

CRONAUER, S. S. & KRIKORIAN, A. D. Banana (*Musa* spp.) In: BAJAJ, Y. P. S., Ed. **Biothecnology in agriculture and forestry trees**. Springer-Verlag, 1986. v.1., p. 233-52.

CRONAUER-MITRA, S. S. & KRIKORIAN, A.D. Adventitious shoot production from calloid cultures of banana. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **6**: 443-5, 1987.

CRONAUER-MITRA, S. S. & KRIKORIAN, A. D. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **7**: 23-5, 1988.

DE SMET, K. & VAN DEN HOUWEN, I. The banana germplasm collection at the INIBAP transit center. In: INIBAP, **Annual Report**, Montpellier, 1991. p. 35-37.

DE GUZMAN, E.; UBALDE, E. M.; ROSARIO, A. B. Banana and coconut in vitro cultures for induced mutation studies. In: International Atomic Energy Agency. **Improvement of**

vegetatively propagated plants and tree crops through induced mutations. Vienna, IEA, 1976. p.33-54.

DE VRIES, S. C.; BOOIJ, H.; MEYERINK, P.; HUISMAN, G.; WILDE, H. D.; THIMAS, T.L. & KAMMEN, A.V. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. **Planta**, Berlin, **176**: 196-204. 1988.

DHED'A, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B.; VUYLSTEKE, D. & DE LANGHE, E. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). **Fruits**, Paris, **46**(2): 125-35, 1991.

DOMINGUES, E. T. Cultura de tecidos visando o melhoramento de bananeira (*Musa* spp.) através de indução de mutações. Piracicaba, 992, 199p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz)

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. & APPEZATO DA GLÓRIA, B. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, London, **70**: 477-82. 1992.

ELLA, E. S. & ZAPATA, F. J. Plant regeneration from rice seed-derived callus using abscisic acid and zeatin.

Proceedings of the Sixth Annual Philippine Chemistry Congress, Cebu, p. 89-90. 1990.

EMONS, A. M. C. & DE DOES, H. Origin and development of embryo and bud primordia during maturation of embryogenic calli of *Zea mays*. **Canadian Journal of Botany, Ottawa, 71: 1349-56. 1993.**

EMONS, A. M. C.; SAMALLO-DROPPERS, A. & VAN DER TOORN, C. The influence of sucrose, Mannitol, L-proline, abscisiic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. **Journal Plant Physiol, 142: 597-604. 1993.**

FAO. Quarterly bulletin of statistics, Rome, 1993.

FUJII, J. A. A.; SLADE, D. T.; REDENBAUGH, K. & WALKER, K. A. Artificial seeds for plant propagation. **Trends in Biotechnology, Cambridge, 5: 335-9. 1987.**

FITCH, M. M. M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht 32: 205-12. 1993.**

FUJIMURA, T. & KOMAMINE, A. Effects of various growth regulators on the carrot cell suspension culture. **Plant Science Letters**, Amsterdam, 5: 359-361. 1975.

FUJIMURA, T. & KOMAMINE, A. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Plant Physiology**, Rockville, 64: 162-164. 1979.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-8, 1968.

GHOSH, S. & SEN, S. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* Baker. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, 13: 381-5. 1994.

GIRI, A.; AHUJA, P. S. & KUMAR, P. V. A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* wall. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 32: 213-18. 1993.

GUPTA, P. F. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 6: 33-9, 1986.

- GUPTA, H. S. & PATTANAYAK, A. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/technology*, New york, 11: 90-4. 1993.
- GUPTA, P. K.; PULMMAN, G.; TIMMIS, R.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.; GROS, J. & WELTY, E. Forestry in the 21st Century: The biotechnology of somatic embryogenesis. *Bio/Technology*, New York, 11: 454-9. 1993.
- ISRAELI, Y.; REUVENI, O. & LAHAV, C. Qualitative aspectos of somaclonal variations in banana propagated by in vitro techniques. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 48: 71-88. 1991.
- KRIKORIAN, A. D. & CRONAUER, S. S. Banana. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P.; YAMADA, Y., ed. *Handbook of plant cell culture*. New York, Macmillan Publ., 1984. v.2, p.327-48.
- KRIKORIAN, A. D.; CRONAUER-MITRA, S. S. & CORBIN, M. S. F. Protoplast culture of perennials. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 37: 277-93. 1988.

- KRIKORIAN, A. D. Baseline and cell studies for use in banana improvement schemes. In: PLOETZ, R.C., ed. **Fusarium wilt of banana**. St. Paul, APS Press, 1990. p. 127-33.
- KRIKORIAN, A. D.; IRIZARRY, H.; CRONAUER-MITRA, S.S. & RIVERA, E. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa* AAB) regenerated from vegetative stem and floral axis tips in vitro. **Annals of Botany**, London, **71**: 519-35, 1993.
- LI, Z. & MURAI, N. Efficient plant regeneration from rice protoplasts in general medium. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **9**: 216-20, 1990.
- MATSUMOTO, K.; CREPY, L.; TEIXEIRA, J. B. & FERREIRA, F. R. Isolation and culture of bract protoplasts of banana. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GENETIC MANIPULATION IN CROPS. Beijing, 1984. **Genetic Manipulation in Crops**, Philipines, IRRI, 1984. 414-5.
- MATSUMOTO, K. & YAMAGUCHI, H. Selection of aluminium-tolerant variants from irradiated protocorm-like bodies in banana, **Tropical Agriculture**, Trinidad, **67**(3): 229-32. 1990
- McWILLIAM, A. A.; SMITH, S. M. & STREET H. E. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot

(*Daucus carota*). **Annals of Botany**, London, **38**: 243-59. 1974.

MEDINA, J. C. Cultura. In: MEDINA, J. C. coord. **Banana**. Campinas, ITAL, 1978. p.7-62.

MEGIA, R.; HAICOUR, R.; ROSSIGNOL, L. & SIHACHAKR, D. Callus formation from cultured protoplasts of banana (*Musa* sp.). **Plant Science**, Amsterdam, **85**: 91-8, 1992.

MEGIA, R.; HAICOUR, R.; TIZROUTINE, S.; TRANG, V. B.; ROSSIGNOL, L.; SIHACHAKR, D. & SCHWENDIMAN, J. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **13**: 41-4. 1993.

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

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **15**:473-97, 1962.

NADOLSKA-ORCZYK, A. Somatic embryogenesis of agriculturally important Lupin species (*Lupinus angustifolius*, L. albus,

L. mutabilis). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht **28**: 19-25. 1992.

NOVAK, F. J.; AFZA, R.; DUREN M. Y.; PEREA-DALLOS, M.; CONGER, B. V. & XIAOLANG, T. Somatic embryogenesis and plant regeneration cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.) **Bio/technology**, New York, **7**: 154-9. 1989.

NOVAK, F. J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M. & OMAR, M. S. Mutation induction by gamma irradiation of in vitro cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa* cvs). **Tropical Agriculture**, Trinidad, **67**(1): 21-8. 1990.

NOVAK, F.J.; BRUNNER, H.; AFZA, R.; & VAN DUREN, M. Mutation Breeding of *Musa* sp (Banana, plantain). In: FAO/IAEA, **Mutation Breeding Newsletter**, Vienna, **40**: 2-4, 1993

OHIRA, K.; OJIMA, K. & FUJIWARA, A. Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple defined medium for rapid growth in suspension culture. **Plant Cell Physiology**, Tokio, **14**: 1113-21.

PANIS, B. J.; WITHERS, L. A. & DE LANGHE, E. A. L. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and

subsequent regeneration of plants. *Cryo-Letters*, 11: 37-50. 1990.

PANIS, B. & SWENNEN, R. Embryogenic *Musa* plant cell cultures: Current and future applications. *Infomusa*, 2(1): 3-6. 1993.

PICKARDT, T.; PERALES, E. H. & SCHIEDER, O. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Vicia narbonensis*. *Protoplasma*, Leipzig, 149: 5-10. 1989.

REDENBAUGH, K.; FUJII, J. A. & SLADE, D. Encapsulated plant Embryos. In: *Biotechnology in Agriculture*. p. 225-48. 1988.

REDENBAUGH, K. Application of artificial seed to tropical crops. *HortScience*, Alexandria, 25(3): 251-5. 1990.

RHODES, C. A.; LOWE, K. S. & RUBY, K. L. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Bio/Technology*, New York, 6: 56-68. 1988.

SAGI, L.; REMY, S.; PANIS, B.; SWENNEN, R. & VOLCKACRT, G. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp. cv. 'Bluggoe', ABB group) protoplasts isolated from

regenerable embryogenetic cell suspension. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, 13: 262-6, 1994.

SCHENK, R. U. & HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 50: 199-204, 1972.

SHEPHERD, K. Melhoramento genético da bananeira. In: **SIMPÓSIO SOBRE BANANEIRA PRATA**, 1., Cariacica-ES, nov. 1983. **Anais**. Cariacica, EMCAPA; EMBRAPA, 1983. p.121-46 (Emcapa, Doc. 4).

SILVA, S. de O. & SHEPHERD, K. Análises do germoplasma de banana do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical-CNPMPF. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, 13(3): 115-27, 1991.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo, Ceres, 1971. 530p.

SMITH, S. M. & STREET, H. E. The decline of Embryogenic Potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus Carota* L.) are serially subcultured. **Annals of Botany**, London, 38: 223-41. 1974.

SMITH, M. K.; HAMILL, S. D.; LANGDON, P. W. & PEGG, K. G.
Mutation breeding programme produces a plant with
potential *Fusarium* wilt (race 4) resistant cavendish
variety. In: FAO/IAEA, **Mutation Breeding Newsletter**,
Vienna, **40**: 4-5, 1993.

STOVER, R. H. & SIMMONDS, N. W. **Bananas**, 3.ed., Harlow,
Longman, 1987. 512p.

SWENNEN, R. & VUYLSTEKE, D. Breeding black sigatoka
resistant plantains with a wild banana. **Tropical
Agriculture**, Trinidad, **7**(1): 74-7. 1993

TAN, Y. P.; HO, Y.; MAK, C. & IBRAHIM, R. Fatom-1. An early
flowering mutante derived from mutation induction of Grand
Nain a cavendish banana. In: FAO/IAEA, **Mutation Breeding
Newsletter**, Vienna, **40**: 5-6, 1993

TORIYAMA, K. & HINATA, K. Panicle culture in liquid media
for obtaining anther calli and protoplasts in rice. **Japan
Journal of Breeding**, Tokio, **35**:449-52, 1985.

TORRIZO, L.B. & ZAPATA, F. J. High efficiency plant
regeneration from protoplasts of the indica cultivar IR

58. **Journal of Experimental Botany**, London, 43(257): 1-5
1992.

VARDI, A. & GALUN E. Recent advances in protoplasts culture
of horticultural crops citrus. **Scientia Horticulturae**,
Amsterdam, 37: 217-30, 1988.

VUYLSTEKE, D. & DE LANGHE, E. Feasibility of in vitro
propagation of bananas and plantains. **Tropical
Agriculture**, Trinidad, 62(4): 323-8, 1985.

VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R. & DE LANGHE, E. Somaclonal
variation in plantains (*Musa* spp., AAB group) derived from
shoot-tip culture. **Fruits**, Paris, 46(4): 429-39. 1991.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: A model for early
development in higher plants. **The Plant Cell**, 5: 1411-23,
1993.

WONG, W.C. In vitro propagation of banana (*Musa* spp.)
initiation, proliferation and development of shoot-tip
cultures on defined media. **Plant Cell, Tissue and Organ
Culture**, Dordrecht, 6: 159-66, 1986.

APÊNDICES

**APÊNDICE 1 - Situação do Brasil no contexto mundial de
produção de banana**

Principais continentes e países produtores de banana (X1000 ton)				
	1979-81	1990	1991	1992
Mundial	37.087	47.230	48.305	49.630
Ásia	14.482	18.287	19.082	20.310
Índia	4.403	6.734	6.800	7.000
Filipinas	4.006	2.913	2.951	3.900
Indonésia	1.886	2.411	2.472	2.500
América do Sul	9.033	12.381	12.963	12.305
Brasil	4.348	5.506	5.526	5.650
Equador	2.104	3.055	3.525	3.600
Colômbia	1.060	1.600	1.800	1.900
América C. e N.	7.037	8.308	8.020	7.661
México	1.435	1.986	1.889	1.600
Costa Rica	1.134	1.740	1.700	1.633
Honduras	1.402	1.046	973	1.086
Panamá	1.048	1.166	1.106	1.110
África	4.962	6.337	6.326	6.435
Burundi	1.096	1.547	1.585	1.645
Camarões	550	510	520	520
Uganda	366	560	570	570

* Dados extraídos de "Quarterly bulletin of statistics", FAO (1993)

APÊNDICE 2 - O Brasil no contexto mundial de exportação de
banana

Principais Países	Exportadores de Banana (X 1.000 ton)*		
	1989	1990	1991
Mundial	8.348	9.453	10.334
Equador	1.770	2.210	2.714
Costa Rica	1.276	1.444	1.541
Colômbia	985	1.148	1.473
Honduras	850	811	699
Panamá	677	746	707
Guatemala	396	366	332
Brasil	84	53	38

* Dados extraídos de "Quarterly bulletin of statistics",
FAO (1993).

APÊNDICE 3 - O Brasil no contexto mundial de importação de
banana

Principais Países	Importadores de Banana (X 1.000 ton)*		
	1989	1990	1991
Mundial	8.278	9.035	9.927
U S A	3.070	3.242	3.381
Japão	773	757	803
Canadá	322	341	355
Argentina	82	73	70
Chile	57	63	60
Brasil	0	0	0

* Dados extraídos de "Quarterly bulletin of statistics",
FAO (1993)

APÊNDICE 4 - Composição dos meios básicos de Murashige & Skoog (1962) e Schenk & Hildebrandt (1972)

* Macronutrientes	M S (mg.l ⁻¹)	S H (mg.l ⁻¹)
• KNO ₃	1.900	2.500
• NH ₄ NO ₃	1.650	-
• MgSO ₄ .7H ₂ O	370	400
• CaCl ₂ .2H ₂ O	440	200
• KH ₂ PO ₄	170	-
• NH ₄ H ₂ PO ₄	-	300
* Micronutrientes		
• MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	-
• MnSO ₄ .H ₂ O	-	10
• KI	0.83	1
• H ₃ BO ₃	6,20	5
• ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	1
• CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	-
• CuSO ₄	-	0,2
• Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0,1
• CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0,1
• FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	15
• Na ₂ EDTA	37,30	20

APÊNDICE 5 - Composição de vitaminas usadas por NOVAK et al. (1989), modificadas de Staba e composição de vitaminas de Murashige & Skoog (1962) e General Medium (1990)

	Staba modificada (S H) mg.l ⁻¹	M S mg.l ⁻¹	G M mg.l ⁻¹
- Tiamina - HCl	2	0,1	1
- Ác. nicotínico	2	0,5	0,5
- Piridoxina - HCl	2	0,5	0,5
- Pantotenato de Cálcio	1	-	-
- Ác. Para-aminobenzoico	0,5	-	-
- Cianocobalamina	1,5	-	-
- Riboflavina	0,5	-	-
- Colina Cloride	1	-	-
- Ác. fólico	0,5	-	-
- biotina	1	-	-
- Glicina	-	3	2

APÊNDICE 6 - Composição do meio R2 revisado por OHIRA et al. (1973).

Composto	Meio Revisado	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 mM	
KNO_3	40,0 mM	
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	2,5 mM	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 mM	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0 mM	
Fe-EDTA	Fe;	2,5 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Mn;	0,50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Zn;	0,50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
H_3BO_3	B;	0,50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
CuSO_4	Cu;	0,05 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Mo;	0,05 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Tiamina-HCl (Vit.)	1,0 mg/l	
Sacarose	20,0 g/l	
pH	6,0	

APÊNDICE 7 - Meio usado para introdução, multiplicação e desenvolvimento de plântulas *in vitro* a partir de ápices caulinares

- Sais de MS	
- Vit. de MS	
- Inositol	100 mg.l ⁻¹
- Sacarose	30 g.l ⁻¹
- Phytigel	1,8 g.l ⁻¹
- pH	5,8
* BAP, AIA, AG ₃ e 2ip	(concentrações metodologia)

APÊNDICE 8 - Meios usados para indução de calos e/ou massa globular

- Sais de SH	
- Vit. modificadas de Staba (SH)	
- Inositol	100 mg.l ⁻¹
- Cisteína - HCl	40 mg.l ⁻¹
- Sacarose	40 g.l ⁻¹
- Phytigel	1,8 g.l ⁻¹
- pH	5,8
- dicamba, 2,4-D e zeatina	(conf. metodologia)

APÊNDICE 9 - Meios usados para desenvolvimento de
estruturas globulares

- $\frac{1}{2}$ MS		- Sais R2
- Vit. modificada de Staba		- Vit. R2 ou MS
- Cisteína-HCl	40 mg.l ⁻¹	-
- Inositol	100 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹
- Sacarose	20 g.l ⁻¹	20 g.l ⁻¹
- Ác. ascórbico	100 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹
- pH	5,8	5,8
* reguladores de crescimento conforme citado na metodologia		

APÊNDICE 10 - Meios usados para maturação e germinação de estruturas globulares

Fase sólida		
- Sais de R2		- ½ sais de MS
- Vit. MS		- Vit. mod. de Staba
- Inositol	100 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹
- Sacarose	20 g.l ⁻¹	20 g.l ⁻¹
* vários reguladores de crescimento e combinações (ZEA, BAP e ABA)		- Carvão 1,0 g.l ⁻¹
- Phytigel 1,8 g.l ⁻¹ (semi-sólido)		- Cisteína 40 mg.l ⁻¹
		- Phytigel 1,8 g.l ⁻¹
		- Agar 4,0 g.l ⁻¹
		- Zeatina 5 µM
Fase líquida		
		- ½ sais de MS
		- Cisteína 40 mg.l ⁻¹
		- Inositol 100 mg.l ⁻¹
		- Sacarose 20 g.l ⁻¹
		- Sem regulador de crescimento

APÊNDICE 11 - Meios usados para formação e desenvolvimento
de plântulas

- $\frac{1}{2}$ MS	- Sais de R2
- Vit. MS ou mod. de Staba	- Vit. MS
- Inositol 100 mg.l ⁻¹	- Inositol 100 mg.l ⁻¹
- Sacarose 30 g.l ⁻¹	- Sacarose 20 g.l ⁻¹
- Phytigel 2 g.l ⁻¹ (semi-sólido)	- Phytigel 1,8 mg.l ⁻¹ (semi-sólido)

APÊNDICE 12 - Composição dos sais de CPW13M

Compostos	mg.l ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	27,20
- KNO ₃	101,00
- CaCl ₂ .2H ₂ O	1.480,00
- MgSO ₄ .7H ₂ O	246,00
- KI	0,16
- CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
- Manitol 13% (13M)	130.000,00

APÊNDICE 13 - Composição de soluções enzimáticas A e B

	A (mg.l ⁻¹)	B (mg.l ⁻¹)
- Celulase RS	1.000,00	4.000,00
- Pectoliase Y-23	200,00	20,00
- Macerozyme R-10	-	1.000,00
- Manitol 0,5 M	9.110,00	9.110,00
- MES 5 mM	97,60	97,60
- Sais de CPW	+	+
- pH	5,6	5,6

APÊNDICE 14 - Relação dos principais reguladores de
cresciemnto com Molaridade (M) e respectivo
peso/volume

		1 μM = mg.l ⁻¹
- Ác. naftaleno acético (ANA)		0,18620
- Ác. indolbutírico (IBA)		0,20323
- Ác. indolacético (AIA)		0,17518
- Ác. 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D)		0,22104
- 6-benzilaminopurina (BAP)		0,22520
- 6-benziladenina (BA)		0,22520
- Cinetina (KIN)		0,21520
- Isopenteniladenina (2ip)		0,20320
- Zeatina (ZEA)		0,21920
- Ác. giberélico (GA ₃)		0,36440
- Ác. abscísico (ABA)		0,26430
- Ác. 3,6 dicloro-2-metoxibenzóico (dicamba)		0,22100
- Metilsulfonato de etila (MES)		0.01952
- Manitol		0.01822

APÊNDICE 15 - Composição do meio "General Medium" por LI &
MURAI (1990).

Compostos	mg.l ⁻¹
- KNO ₃	3.000
- NH ₄ H ₂ PO ₄	400
- CaCl ₂ .2H ₂ O	166
- MgSO ₄ .7H ₂ O	185
- NaFeEDTA	42,1
- MnSO ₄ .4H ₂ O	4,4
- ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5
- KI	0,8
- H ₃ BO ₃	1,6
- CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
- NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
- CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
- Sacarose	30.000

APÊNDICE 16 - Composição dos meios usados para cultivo de
protoplastos (RMK, R2MCHK e GMM.

RMK	R2MCHK	GMM
- Sais MS	- Sais R2	- Sais GM
- Vit. MS	- Vit. MS	- Vit. GM
- 0,4 M maltose	- Maltose 0,4 M	- Maltose 0,4 M
- 2,4-D 1 mg.l ⁻¹	- 2,4-D 1 mg.l ⁻¹	- 2,4-D 1 mg.l ⁻¹
	- Caseína hidrolisada 500 mg.l ⁻¹	
pH de todos 5,8		