

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**RESTABELECIMENTO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE  
SUSPENSÕES CELULARES E AJUSTES METODOLÓGICOS  
PARA MUTAGÊNESE EM BANANEIRA**

**CLEILTON VASCONCELOS MOREIRA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**JULHO – 2015**

# **RESTABELECIMENTO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE SUSPENSÕES CELULARES E AJUSTES METODOLÓGICOS PARA MUTAGÊNESE EM BANANEIRA**

**CLEILTON VASCONCELOS MOREIRA**

Engenheiro Agrônomo

Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia - 2006

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de concentração: Fitotecnia.

**Orientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva**

**Co-Orientadores:** Dr<sup>a</sup> Janay Almeida dos Santos-Serejo

Dr<sup>a</sup> Lucymeire Morais Lino

Dr. Augusto Tulmann Neto

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

M835 Moreira, Cleilton Vasconcelos.

Restabelecimento do potencial embriogênico de suspensões celulares e ajustes metodológicos para mutagênese em bananeira / Cleilton Vasconcelos Moreira .– Cruz das Almas, BA., 2015.

84 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

Co-Orientadora: Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-Orientadora: Dra. Lucymeire Morais Lino

Co-Orientador: Dr. Augusto Tulmann Neto

Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Área de Concentração: Fitotecnia, 2015.

1. Banana. 2. Mutação induzida. 3. Embriogênese. I. Silva, Sebastião de Oliveira e. II. Serejo, Janay Almeida dos Santos. III. Lino, Lucymeire Morais . IV. Tulmann Neto, Augusto. V. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia V. Título.

CDD: 634.772



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE  
Cleilton Vasconcelos Moreira

---

Membro Presidente: Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva  
Instituição: UFRB

---

Membro Externo ao Programa: Profa. Dra. Daniela Garcia Silveira  
Instituição: IFBAIANO

---

Membro Interno ao Programa: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Instituição: UFRB

---

Membro Externo ao Programa: Dra. Edna Lobo Machado  
Instituição: UFRB

---

Membro Externo ao Programa: Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira  
Instituição: UEFS

Homologada em / /

*A Deus,*

*A minha mãe, Marlene, pelo exemplo de vida e por me transformar em quem sou hoje.*

*Ao meu pai, Américo pelo respeito.*

*Aos meus irmãos Alex Marcos, Cid Vinícius, Américo Júnior e Américo Luiz, e minhas irmãs Ocirema e Ocimara pela amizade e carinho.*

## **DEDICO**

*Tudo o que um sonho precisa para ser realizado, é alguém que acredite nele. Às minhas eternas avós Ambrosina e Geralda, (in memoriam).*

## **OFEREÇO**

*O conjunto do que é moral pode ser comparado a uma árvore: a raiz é o desejo de alcançar a felicidade, o tronco são as virtudes fundamentais, os ramos são as virtudes referentes a cada área da vida, as folhas são os preceitos e os bons costumes reais, os frutos são as boas ações realizadas.*

*Luiz Gonzaga de Carvalho*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida, que em sua bondade e sabedoria, me deu paciência, força e fé nessa jornada. A minha família, meus pais e irmãos, que preenchem minha vida de amor, carinho e dedicação.

A UFRB e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, pela oportunidade da realização do curso. Aos colegas de curso pelo convívio durante esses anos.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela estrutura física para o desenvolvimento da pesquisa, em especial ao Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Núcleo de Biologia Avançada, aos caríssimos e queridos amigos: Honorato, Karen, Tânia. A todos do LCT pela amizade, pelo apoio e momentos de descontração, em especial, Cristina, Mary, Jackson pelo apoio e amizade.

Ao Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, pela orientação e aprendizado longo do curso. À Dra. Janay A. dos Santos-Serejo, Dra. Lucymeire Souza Morais Lino e ao Dr. Dr. Augusto Tulmann Neto pela coorientação.

Ao CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) através do. Dr. Augusto Tulmann Neto, pela irradiação dos materiais vegetais utilizados neste trabalho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção, sugestões e disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

Aos meus verdadeiros amigos da vida e do coração: Fernanda, Jucilayne, Waldete, Arthur, Euzi, Elma, Lorena, Karol, Daniela Garcia, Luanda, meus irmãos Cid e Alex, enfim, pela amizade sincera, pelas inúmeras horas de alegria. E mesmo perto ou longe, bem do lado ou a quilômetros de distância, sempre seremos amigos onde quer que estejamos. Obrigado por todos os momentos.

Ao meu grande amigo Fabrício, companheiro de tantos caminhos, histórias e jornadas, lhe sou muito grato pela presença e amizade. Agradeço-lhe pela pessoa boa em que pude contar sempre.

Aos meus tios, primos e amigos da família: Cremilda, Valnice, Valdete, Silvana, Cleidinha, Heloína, Tio Edvaldo, Elisabete, sempre presentes e emanando força, fé, muito axé e perseverança. Agradeço por sempre me desejarem sorte.

A todos os amigos em Cruz das Almas, BA. Às amizades construídas durante as aulas no Grupo Forró Rodado, registro meu apreço e carinho pelos agradáveis momentos de alegria.

Aos que participaram desta etapa valiosa da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão,  
e vencer com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve,  
e a vida lhe dá de escolha batalhas suficientemente grandes para importar,  
suficientemente pequenas para vencer.”*

(Texto de Augusto Branco com adaptações)

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
Capítulo 1	
RECUPERAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE SUSPENSÕES CELULARES DE CULTIVO PROLONGADO DE BANANEIRA 'TROPICAL'.....	13
Capítulo 2	
IRRADIAÇÃO GAMA EM CALOS EMBRIOGÊNICOS E SUSPENSÕES CELULARES DE BANANEIRA (AAAB) 'TROPICAL' E (AAB) 'TERRA MARANHÃO' PARA INDUÇÃO DE MUTAGÊNESE .....	34
Capítulo 3	
SOBREVIVÊNCIA DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E SUSPENSÕES CELULARES DE BANANEIRA 'TROPICAL' E 'TERRA MARANHÃO' AO ETIL METANO SULFONATO (EMS) .....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	71

# RESTABELECIMENTO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE SUSPENSÕES CELULARES E AJUSTES METODOLÓGICOS PARA MUTAGÊNESE EM BANANEIRA

**Autor:** Cleilton Vasconcelos Moreira

**Orientador:** Sebastião de Oliveira e Silva

**RESUMO:** A mutação tem sido usada em substituição ao sistema convencional no melhoramento em bananeira para cultivares estéreis. No entanto, para o sucesso da mutagênese *in vitro*, é indispensável o estabelecimento de protocolos reprodutíveis de regeneração *in vitro* de plantas e otimização de tratamentos mutagênicos. Este trabalho foi desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura, com o objetivo de ajustar técnicas de mutagênese para serem empregadas em suspensões celulares e calos embriogênicos de bananeira, buscando adaptar a metodologia de indução de mutação, via irradiação com raio gama, e por meio do etil metano sulfonato (EMS). O trabalho foi subdividido em três capítulos: no primeiro foi desenvolvida uma metodologia para recuperação da capacidade embriogênica de suspensões celulares com alta concentração de células não-embriogênicas, cultivadas por mais de três anos, a qual possibilitou também a manutenção contínua da produção de calos embriogênicos por período prolongado, de forma a permitir a rápida obtenção de suspensões celulares e a regeneração de plantas dessas suspensões; no segundo capítulo adaptou-se uma metodologia de indução de mutação, por irradiação gama, para calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC) de bananeira 'Tropical' (AAAB) e 'Terra Maranhão' (AAB); enquanto no terceiro capítulo ajustou-se uma metodologia de indução de mutagênese *in vitro*, via etil metano sulfonato (EMS) pela análise dos índices de sobrevivência e regeneração de plantas a partir do tratamento de CE e SC de bananeira. Melhores respostas em crescimento e multiplicação de novos calos embriogênicos são obtidos com 0,50 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D no meio de cultura, em intervalos de dois meses de subcultivos. O uso do diacetato de fluoresceína FDA revelou a presença de células embriogênicas viáveis com uma regeneração significativa de plantas, nestas condições de cultivo. Assim, a

metodologia desenvolvida nesse trabalho, possibilita resgatar o potencial embriogênico de suspensões celulares não-embriogênicas de cultivos prolongados e induzir novas células embriogênicas com o uso de 2,4-D. Registrou-se que o aumento das doses de radiação gama provocou reduções nos parâmetros estudados. Independente da cultivar usada, as doses de 100 e 200 Gy afetaram negativamente a germinação de embriões somáticos dos calos embriogênicos, bem como o número de raízes e comprimento das plantas. Nas suspensões celulares estas variáveis foram reduzidas com as doses de 60 a 200 Gy. O aumento das doses de radiação gama provocou redução no comprimento das plantas e no índice de sobrevivência. A eficiência dessa metodologia de radiação gama em calos embriogênicos e suspensões celulares abrem perspectivas para uso de mutagênese *in vitro* no melhoramento de bananeira. Calos embriogênicos da cultivar Terra Maranhão são mais sensíveis aos efeitos do mutagênico EMS, comparados às suspensões celulares. Enquanto na 'Tropical', as suspensões celulares são mais sensíveis em relação aos tratamentos de EMS que os calos embriogênicos. Este estudo mostra uma metodologia eficiente e rápida de aplicação de mutagênese *in vitro* via EMS com possibilidade de propagação de mutantes promissores.

Palavras chave: Mutação, *Musa*, embriogênese somática, mutagênico químico e físico.

# RESTORING THE POTENTIAL OF CELLS SUSPENSIONS EMBRYOGENIC AND METHODOLOGY ADJUSTMENTS TO BANANA MUTAGENESIS

**Author: Cleilton Vasconcelos Moreira**

**Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva**

**ABSTRACT:** The mutation has been used in replacement of conventional system in improvement in banana sterile. However, to the success of in vitro mutagenesis indispensable the establishment of reproducible protocols in vitro regeneration of plants and optimization mutagenic treatments. This work was developed at Embrapa Cassava and Fruits, aiming to adjust mutagenesis techniques in order to be employed in cell suspensions and embryogenic callus banana, seeking to adapt the mutation induction methodology via Gamma radiation means and ethyl methane sulfonate (EMS). The work was subdivided into three chapters: in the first was developed a methodology for recovering of embryogenic capacity of cell suspensions with a high concentrations of non-embryogenic cells, which have been grown for more than three years; which also provided a continuous maintenance of embryogenic callus production for a long-term period in order to obtain cell suspensions and plant regeneration of these suspensions; in the second chapter adapted to adapt the mutation induction methodology, via gamma irradiation, to embryogenic callus (EC) and cell suspensions (CS) of banana 'Tropical' (AAAB) and 'Terra Maranhão' (AAB); while in the third chapter was adjusted up an in vitro mutagenesis inducing methodology via ethyl methane sulfonate (EMS) for examining the survival and plant regeneration rates from EC treatment and SC banana. Effective responses in growth and multiplication of new embryogenic callus are obtained with  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D in the culture medium at every two-months subculture. The use of the fluorescein diacetate DF revealed the presence of viable embryogenic cells with significant regeneration of plants in these culture conditions. Thus, the methodology developed in this study, enables rescue the embryogenic potential the embryogenic potential of non-embryogenic cell suspensions of extended crops and induce new embryogenic cells with the use

of 2,4-D. It was recorded that that increasing doses of gamma radiation caused reductions in the parameters under study. Independent of the cultivar used, doses of 100 Gy and 200 affect negatively the germination of somatic embryos from embryogenic callus as well as the number of root and the length plants. All these variables cell suspensions were reduced at the doses from 60 to 200 Gy. The increasing gama radiation doses caused a reduction in the length of the plants and in the survival rate. The efficiency of this radiation methodology in embryogenic callus and cell suspensions brings perspectives on the use of in vitro mutagenesis for the banana improvement. Embryogenic callus of the cultivar Terra Maranhão are more sensitive to the effects of EMS mutagenic, compared to cell suspensions. While in 'Tropical', the cell suspensions are more sensitive in relation to EMS treatments than embryogenic callus. This study shows a rapid and efficient methodology for in vitro mutagenesis via EMS application with the possibility of the propagation of promising mutants.

**Key words:** Mutation, *Musa*, somatic embryogenesis, chemical and physical mutagens.

## INTRODUÇÃO GERAL

A bananeira (*Musa* spp.) é a frutífera tropical mais difundida e apreciada no mundo (RAMU et al., 2015) e constitui um dos cultivos perenes de mais rápido retorno do capital investido. Logo, a banana destaca-se como a fruta de maior produção e comercialização mundial, apresentando grandes áreas de cultivo nas regiões tropicais (CASTELÃO-JÚNIOR et al., 2015), inclusive, em todos os estados brasileiros, principalmente por pequenos agricultores como uma atividade agrícola de relevante papel socioeconômico e agroecológico (PAULA et al., 2015).

Os registros mais antigos indicam que a banana tem como centro de origem a Ásia Meridional (regiões tropicais da Índia e Malásia) com disseminação, posteriormente, para diversas partes do mundo, inclusive para a América, onde a cultura encontrou melhores condições de crescimento. Outros centros secundários ocorrem na África Oriental, em algumas ilhas do Pacífico e uma considerável diversidade genética na África Ocidental (CHAMPION, 1967). As cultivares encontradas nestas regiões evoluíram de espécies selvagens e apresentam três níveis de ploidia, constituindo os diploides com 22 cromossomos (2x), triploides com 33 cromossomos (3x) e tetraploides com 44 cromossomos (4x), que são múltiplos do número básico ( $n=11$ ) (SHEPHERD, 1984).

Durante sua evolução, genótipos com alta ploidia foram selecionados pelos agricultores, em especial devido ao seu vigor e rendimentos elevados (KHAYAT e ORTIZ, 2011). As cultivares triploides e tetraploides surgiram da hibridação natural entre duas espécies selvagens, *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* (CHEESMAN, 1948). Esses genomas são denominados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), de cujas combinações resultam os grupos genômicos AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB

(SIMMONDS e SHEPHERD, 1955). O cruzamento entre espécies e subespécies pode ter levado ao aparecimento das cultivares comestíveis, que selecionadas pelo homem, logo passaram a dominar as áreas de produção de banana (AMORIM et al., 2011).

De maneira geral, essas cultivares possuem características que limitam o progresso do melhoramento genético devido à partenocarpia, poliploidia (CHOPRA, 2005; CAPDEVILLE et al., 2009) e a variabilidade genética estreita resultante da baixa fertilidade feminina (SILVA et al., 2001; PUA, 2007; BAKRY et al., 2009).

Como qualquer espécie cultivada em grandes áreas, a bananeira é, também, severamente prejudicada por várias doenças que limitam a ampliação do seu cultivo em nível nacional. Segundo Silva et al. (2013), as cultivares mais usadas pelos agricultores (Prata, Pacovan, Maçã, Grande Naine e Terra) são muito suscetíveis à Sigatoka-negra e, à exceção da Terra e Maçã, são também suscetíveis à Sigatoka-amarela. Com relação ao mal-do-Panamá, a 'Grande Naine' e a 'Terra' são resistentes, a 'Maçã' é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis.

Uma estratégia para resolver este problema é o desenvolvimento de novas cultivares via hibridação, seguido por seleção de progênies (SILVA et al., 2002; DONATO et al., 2006). No entanto, a esterilidade tem dificultado o melhoramento convencional da bananeira, como tem igualmente afetado a propagação de plantas e a gestão de germoplasma (PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008).

Por outro lado, nos casos em que a variabilidade genética natural é limitada (REIS et al., 2015), ou se existirem dificuldades relacionadas com as aplicações dos métodos tradicionais de melhoramento, a indução de mutações é uma ferramenta que pode ajudar a superar essas barreiras (PESTANA et al., 2010). Nessa perspectiva, a cultura de tecidos vegetais dispõe de ferramentas poderosas para superar essas limitações e tem sido indispensável no suporte aos programas de melhoramento genético. A cultura de tecidos é um ramo da biotecnologia muito utilizada na multiplicação de material genético, avaliação de germoplasma, produção de mudas livres de vírus e, no melhoramento genético de plantas, a grande vantagem da utilização da cultura de tecidos vegetais é o potencial para melhorar a eficácia na indução de mutação em

vários aspectos (PREDRIERI et al., 2001). Primeiramente, por oferecer uma grande variedade de material vegetal *in vitro*, tais como, gemas axilares, ápices caulinares, calos embriogênicos e suspensão celular, sendo essa última a mais adequada para indução de mutação.

De fato, estruturas que darão origem a plantas são compostas de algumas ou mesmo de uma única célula. Isto significa menos risco de obtenção de plantas quiméricas, ou seja, tecidos ou plantas com setores mutados e outros não mutados, e uma maior probabilidade de se obter células mutantes para expressar a mutação no fenótipo (ESCALANT et al., 1994; JAIN e MALUSZYNSKI, 2004; JAIN, 2010).

Ademais, a cultura de tecidos também permite a manipulação de grandes populações para tratamento mutagênico, seleção e clonagem das variantes selecionados. Isso também oferece a possibilidade de executar rapidamente a propagação e os ciclos de subcultura destinados a separar os setores que sofreram mutação do material original, e ampliar aquela região que sofreu mutação (NEWMANN et al., 2009). Outra vantagem dessa metodologia é que as condições fitossanitárias são mantidas durante toda a totalidade do processo (PREDRIERI et al., 2001).

Outra consideração relevante diz respeito à cultura de células em suspensão, que tem contribuído grandemente para a regeneração de plantas de bananeira por meio da embriogênese somática (STROSSE et al., 2003; MORAIS-LINO et al., 2008; JAIN, 2010).

Conforme relatado por Jain (2010), a embriogênese somática é um sistema excelente para a propagação clonal e indução de mutação. O fato de que os embriões somáticos sejam originários de uma única célula impede o surgimento de quimeras em plantas regeneradas *in vitro*, isso os torna material ideal para mutagênese. Além disso, embriões somáticos de mutantes diretos podem ser desenvolvidos a partir de células de embriões somáticos de mutantes, que após germinarem formam plantas inteiras mutantes.

A embriogênese somática pode ser obtida em meio líquido por meio da utilização de suspensões celulares. Geralmente estas suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis em meio líquido sob agitação. Assim, a cultura de células ou suspensão celular é uma técnica que permite a indução, propagação e manutenção de células em meio líquido, as

quais apresentam taxas de divisão muito mais elevadas do que as cultivadas de maneira convencional (GUERRA et al., 1999; MATSUMOTO, 2006; GEORGE et al., 2008).

Embora o desenvolvimento de calos embriogênicos e suspensões celulares têm sido obtidos em diferentes cultivares de bananeira, muitos protocolos não têm sido prontamente reprodutíveis para grande parte dos genótipos (STROSSE et al., 2006).

Uma consideração relevante acerca da cultura de suspensões celulares é que não há registros de pesquisas que visam o reuso pela recuperação da capacidade embriogênica em suspensões celulares de cultivos prolongados, sobretudo, em bananeira. Também não existem estudos que comprovam a conversão de células não embriogênicas à embriogênicas em suspensões celulares de bananeiras. Logo, o desenvolvimento de um método eficaz de recuperação da capacidade embriogênica em suspensões celulares de cultivo prolongado são importantes em bananeira e pode constituir-se em uma boa ferramenta para o melhoramento genético dessa cultura (HOULLOU-KIDO et al., 2005).

Uma estratégia utilizada para superar as dificuldades do melhoramento convencional de cultivares estéreis e acelerar a obtenção de novas variedades resistentes é o uso de mutagênese *in vitro* (DOMINGUES et al., 1994; TULMANN NETO et al., 1995; GARCIA et al., 2002, PESTANA et al., 2010; BARAKAT e EL - SAMMAK, 2011).

Para o sucesso da mutagênese *in vitro*, é indispensável o estabelecimento de protocolos reprodutíveis de regeneração de plantas, otimização de tratamentos mutagênicos e eficiente triagem das populações mutantes para variações desejadas (VAN HARTEN, 1998; JAIN, 2007), tais como a resistência ao *Fusarium* (TANG et al., 2000; JAIN e SWENNEN, 2004).

As técnicas *in vitro* podem melhorar a eficácia da indução de mutação, especialmente ao manipular um grande número de plantas regeneradas (PREDRIERI, 2001; JAIN e MALUSZYNSKI, 2004; JAIN, 2010), e dispor de uma grande variedade de material vegetal para o tratamento mutagênico.

Segundo Escalant et al. (1994) , a utilização de embriões somáticos de origem unicelular, tem o potencial para produzir plantas sem quimerismo, tornando-se uma excelente opção para programas de melhoramento não-

convencional. Dessa maneira, a cultura de células representa uma técnica útil para a indução da mutação e auxiliar os programas de melhoramento de bananeira, uma vez que um grande número de células pode ser tratada usando suspensão de células como explante, o que não ocorre em cultura de meristemas (JAIN e MALUSZYNSKI, 2004; HOULLOU-KIDO et al., 2005).

A ocorrência de mutações pode levar a um aumento da variabilidade genética, essencial para o sucesso do melhoramento, portanto, caracterizá-la é de extrema importância para melhorar uma cultura (COIMBRA et al., 2004b; BORGES et al., 2010; CABRAL et al., 2011; PATIL e WAKODE, 2011; TABASUM et al., 2011).

Mutações naturais ou induzidas são consideradas como boas formas de gerar variabilidade genética. As mutações induzidas são definidas como as alterações hereditárias no DNA (ácido desoxirribonucleico), de ordem qualitativa ou quantitativa, e não derivadas de segregação ou recombinação genética. Como as taxas de mutação espontânea são muito baixas, mutações induzidas estão sendo utilizadas para aumentar a sua taxa e frequências (COIMBRA et al., 2004a). A variabilidade genética criada por meio de mutações é um pré-requisito para seleção natural e artificial.

O mutagênico químico etil metano sulfonato (EMS) pode ser aplicado com sucesso onde nenhuma instalação de irradiação seja acessível. Além disso, em comparação com mutagênicos físicos (ex: raios gama), os químicos podem aumentar as mutações genéticas (mutações ponto) uma vez que causam mudanças cromossômicas (VAN HARTEN, 1998; PREDIERI, 2001; TOKER et al., 2007). A medição da redução de 50% da sobrevivência, crescimento e posterior proliferação para substâncias químicas são determinadas por alteração na concentração e duração do tratamento (PREDIERI, 2001; KODYM e AFZA, 2003).

Bhagwat e Duncan (1997) administraram doses do mutagênico químico em bananeira (*Musa AAA*) para produzir variantes exibindo resistência contra a fusariose (*Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense). Os autores determinaram 200 mM de EMS durante 30 minutos como dose e duração ideais.

As mutações servem como ferramenta aos programas de melhoramento genético, pois levam à produção de novas formas alélicas, que podem conferir

novas características agronômicas, ampliando a base genética dos recursos disponíveis para o melhoramento (RAMALHO et al., 2012).

A resistência a doença e redução da altura da planta são características mutantes bastantes frequentes em *Musa* spp., quando se utiliza a indução de mutação (NEWBURY et al., 2000; TANG et al., 2000; PESTANA et al., 2011a/b; AMORIM et al., 2012; SILVA et al., 2013).

O uso direto de mutação é um processo valioso, especialmente quando o melhoramento é feito para uma ou duas características facilmente identificáveis e desejadas numa variedade bem adaptada. A obtenção de variabilidade mediante o emprego de agentes mutagênicos tem sido utilizada, em função da capacidade de gerar uma ou mais características desejáveis, aprimorando cultivares já estabelecidas e no desenvolvimento de novos genótipos (MALUSZYNSKI, 1998).

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivos (i) desenvolver uma metodologia para recuperação da capacidade embriogênica de suspensões celulares com alta concentração de células não-embriogênicas, cultivadas por mais de três anos; manter calos embriogênicos por período prolongado de forma a permitir a rápida obtenção de suspensões celulares; (ii) adaptar a metodologia de indução de mutação, via irradiação gama e (iii) via etil metano sulfonato (EMS), para calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC) de bananeira 'Tropical' (AAAB) e 'Terra Maranhão' (AAB).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, E. P.; AMORIM, V. B. O.; SILVA, S. O.; PILLAY, M. Quality improvement of cultivated *Musa*. In: PILLAY, M.; TENKOUANO, A. (Org.). **Banana breeding: progress and challenges**. New York: CRC Press, p. 252-280, 2011.

AMORIM, E. P.; PESTANA, R. K. N.; SILVA, S. O.; TULMANN NETO, A. Caracterização agronômica de mutantes de bananeira obtidos por meio da radiação gama. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 1, p. 8-14, 2012.

BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HORRY, J.P. Genetic Improvement of Banana. In: Jain SM, Priyadarshan PM (eds), *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, Springer, p. 3 – 50, 2009.

BHAGWAT, B.; DUNCAN, E.J. Mutation breeding in banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense using chemical mutagens. **Sci Hortic.** v. 73: p. 11 – 22, 1997.

BORGES, K.C.F.; SANTANA, D.G.; MELO, B.; SANTOS, C.M. Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.2, p.471-478, 2010.

CABRAL, P.D.S.; SOARES, T.C.B.; LIMA, A.B.P.; SOARES, Y.J.B.; SILVA, J. A. Análise de trilha do rendimento de grãos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e seus componentes. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.1, p.132-138, 2011.

CAPDEVILLE, G.; SOUZA, M.T.; SZINAY, D.; WIJNKER, E.; de JONG, H. The potential of high-resolution BAC-FISH in banana breeding. **Euphytica**, v. 166, p. 431–443, 2009.

CASTELÃO-JÚNIOR, I.; RIBEIRO, N.P.; GUILHERME, D DE O.; CEREDA, M. P. Use of banana seedlings from tissue culture and vegetative propagation in orchard cultivation. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 92-95, 2015.

CHAMPION, J. **Les bananiers et leur culture**; Tome I: Botanique et genetique. Paris: IFAC,. 214p., 1967.

CHEESMAN, E. E. Classification the bananas. III. Critical notes on species (c) *M. paradisiaca*, *M. sapientum*. **Kew Bulletin**, London, v. 2, p. 147-153, 1948.

CHOPRA, V.L. Mutagenesis: investigating the process and processing the outcome for crop improvement. **Curr. Sci.** v. 89, p. 353–359, 2005.

COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; COSTA-OLIVEIRA, A. Genetic variability induced by chemical and physical mutagenic agents in oat genotypes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 48-56. 2004a.

COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; GUIDOLIN, A.F. Criação de variabilidade genética no caráter estatura de planta em aveia: hibridação artificial x mutação induzida. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.3, p.273-280, 2004b.

DOMINGUES, E.T.; TULMANN-NETO, A.; MENDES, B.M.J.; ANDO, A. Efeitos de doses de raios-gama em ápices caulinares de bananeira (*Musa* sp.) desenvolvidos in vitro visando a indução de mutação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29 n. 7, 1091-109, 1994.

DONATO, S.L.R.; SILVA, S.O.; LUCCA FILHO, O.A.; LIMA, M.B. et al. Correlações entre caracteres da planta e do cacho em bananeira (*Musa* spp.). **Cienc. Agrotecnol.** v. 30, p. 21-30, 2006.

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

GARCIA, L.R.; PÉREZ, P.J.; BERMÚDEZ, I.C.; ORELLANA, P.P.; VEITIA, N. R.; GARCIA, L.R.; PADRÓN, Y.M.; ROMERO, C.Q. Comparative study of variability produced by induced mutation and tissue culture in banana (*Musa* sp.) cv 'Grande naine'. **Infomusa**, v. 11, n. 2, p. 4-6, 2002.

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

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

HOULLOU-KIDO, L.; KIDO, E.A.; FALCO, M.C.; SILVA FILHO, M. de C.S.; FIGUEIRA, A.V. de O.; NOGUEIRA, N de L.; ROSSI, M.L.; TULMANN NETO, A. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana 'MAÇA' regeneration. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1081-1086, 2005.

JAIN, S.M. In Vitro Mutagenesis in Banana (*Musa* spp.) Improvement Proc. IC on Banana & Plantain in Africa, Eds.: T. Dubois et al. **Acta Hort.**, p. 879, ISHS, 2010.

JAIN, S.M. Recent advances in plant tissue culture and mutagenesis. **Acta Hort.** v. 736, p.205–211, 2007.

JAIN, S.M.; SWENNEN, R. 2004. **Banana improvement: cellular, molecular and mutagenesis approaches**. Science Publishers, New Hampshire, 2004.

KHAYAT, E.; ORTIZ, R. Genetic of important traits in *Musa*. In: PILLAY, M.; TENKOUANO, A. (Org.). **Banana breeding: progress and challenges**. New York: CRC Press, p. 71-83, 2011.

KODYM, A.; AFZA, R. Physical and chemical mutagenesis. In: Grotewold E (ed) **Plant functional genomics: methods and protocols**. Methods in Molecular Biology. **Humana Press**, Inc., Totowa, NJ, v. 236, p.189 – 203, 2003.

MALUSZYNSKI, M.; AHOOWALIA, B.; ASHRI, A.; NICHTERLEIN, K.; VAN ZANTEN, L. Induced mutations in rice breeding and germplasm enhancement. In: **Proceedings Of The 19th Session Of The International Rice Commission**. Cairo, Egypt, 7-9 September 1998.

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

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 148 – 158, 2006.

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

NEWBURY, H. J.; HOWELL, E. C.; CROUCH, J. H.; FORD-LLOYD, B.V. Natural and culture-induced genetic variation in plantains (*Musa* spp., AAAB group). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 48, p. 493-500, 2000.

PATIL, G.P.; WAKODE, M.M. Effect of physical and chemical mutagens on soybean, **Current Botany**, v.2, n.4, p.12-14, 2011.

PAULA, Y.C.M.; PASQUAL, M.; PIO, L.A.S.; de PINHO, P.J.; dos SANTOS, D.N. Micropropagação de bananeira sob diferentes concentrações de potássio e magnésio. **Tecnol.& Ciencia Agropec.**, João Pessoa, v. 9, n. 3, p. 43-47, Jun. 2015.

PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.185-210, 2001.

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

PESTANA, R. K. N.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, V. B. O.; OLIVEIRA, L. S.; LEDO, C. A. S.; SILVA, S. O. Genetic dissimilarity of putative gamma-ray-induced 'Preciosa' - AAAB-Pome type banana (*Musa* sp.) mutants based on multivariate statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, p. 3.976-3.986, 2011a.

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

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

PUA, E.C. Banana. In: Pua EC, Davey MR (eds), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. **Springer-Verlag**, v. 60, p. 3-34, 2007.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C.A.B.P.; SOUZA, E.A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. B. **Genética na agropecuária**. Lavras: Ed. UFLA, 566p., 2012.

RAMU, R.; SHIRAHATTI, P.S.; ZAMEER, F.; PRASAD, M.N.N. Investigation of antihyperglycaemic activity of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) pseudostem in normal and diabetic rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 95, n. 1, p. 165-173, 2015.

REIS, R.V.; AMORIM, E.P.; LEDO, C.A.S.; PESTANA, R.K.N.; GONÇALVES, Z.S.; BORÉM, A. Selection of putative Terra Maranhão plantain cultivar mutants obtained by gamma radiation. **Genetics and Molecular Research**, v. 14 n. 2, p. 4687-4695, 2015.

SHEPHERD, K. **Taxonomia e caracterização de cultivares de banana**. Cruz das Almas, BA: Embrapa CNPMF, 5p, 1984.

SILVA, S.D.O.; JUNIOR, M.T.S.; ALVES, E.J.; SILVEIRA, J.R.S.; LIMA, M.B. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breed Appl Biotechnol**. v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.

SILVA, S.O.; FLORES, J.C.O.; LIMA NETO, F.P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesq. Agropec. Bras**. v. 37, p. 1567-1574, 2002.

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

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

STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J.V.; COTE, F. Banana and plantain embryogenic cell suspensions. In: A. Vezina and C. Picq (eds.), *INIBAP Technical Guidelines 8*. **INIBAP**, Montpellier, p.58–62, 2003.

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

TABASUM, A.; CHEEMA, A.A.; HAMEED, A.; RASHID, M.; ASHRAF, M. Radio sensitivity of rice genotypes to gamma radiations based on seedling traits and physiological indices. Pakistan, **Journal of Botany**, v.43, n.2, p.1211-1222, 2011.

TANG, C.Y., HUANG, S.C. AND LIU, C.C. Mutation breeding in bananas: an overview. Chin. Soc. **Hort. Sci.** v. 46, p. 251–258, 2000.

TOKER C, YADAV SS, SOLANKI IS Mutation breeding. In: Yadav et al. (eds) Lentil: an ancient crop for modern times. **Springer**, p. 209 – 224, 2007.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J.; LATADO, R. R.; SANTOS, P. C.; BOLIANI, A. In vitro mutation induction for resistance to Fusarium wilt in the banana. In: **Induced mutations and molecular techniques for crop improvement**, International Atomic Energy Agency, Viena-Austria, p.641-642, 1995.

VAN HARTEN, A. M. **Mutation breeding : theory and practical applications.** Cambridge : Cambridge university press, XIV, 353 p.: ill, 1998.

## CAPÍTULO I

### **Recuperação do potencial embriogênico de suspensões celulares de cultivo prolongado de bananeira ‘Tropical’<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Crop Breeding and Applied Biotechnology.

## Recuperação do potencial embriogênico de suspensões celulares de cultivo prolongado de bananeira 'Tropical'.

**Autor:** Cleilton Vasconcelos Moreira

**Orientador:** Sebastião de Oliveira e Silva

**RESUMO:** Neste trabalho é descrito um método de recuperação da capacidade embriogênica de suspensões celulares de bananeira. Objetivou-se desenvolver uma metodologia para recuperação da capacidade embriogênica de suspensões celulares com alta concentração de células não-embriogênicas, cultivadas por mais de três anos; bem como para manutenção de calos embriogênicos por período prolongado de forma a permitir a rápida obtenção de suspensões celulares. Para recuperar a capacidade embriogênica, amostras de suspensões celulares não-embriogênicas de bananeira 'Tropical' (AAAB) foram transferidas para meio semissólido contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e armazenadas durante 15 meses, sob condições de ausência de luz e à temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{ C}$ . Os calos embriogênicos formados nesse período foram subcultivados em meio de cultura semissólido contendo diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 0,50; 1,0 e  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ). O crescimento dos calos foi baseado no peso fresco dos calos subcultivados a cada dois (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12) e três meses (0, 3, 6, 9, 12). Foram determinadas as curvas de crescimento dos calos embriogênicos com subcultura bimestral e trimestral ao longo de doze meses na presença de 2,4-D, e da subcultura bimestral em meio MS básico na ausência da auxina. Foi mensurado o número de embriões germinados e realizadas avaliações para comprovação de células embriogênicas viáveis nas novas suspensões celulares com o uso do corante indicador diacetato de fluoresceína (FDA) e testes de regeneração de plantas dessas suspensões. Constatou-se que, melhores respostas em crescimento e multiplicação de novos calos embriogênicos são obtidos com  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D no meio de cultura, em intervalos de dois meses de subcultivos. O uso de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D revelam respostas promissoras na manutenção *in vitro* prolongada de calos embriogênicos contendo embriões somáticos de bananeira 'Tropical'. As análises comprovaram a presença de células embriogênicas viáveis com expressiva regeneração de plantas em meio com  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D da subcultura bimestral. Assim, com o uso da metodologia desenvolvida nesse trabalho, é possível resgatar o potencial embriogênico de suspensões celulares não-embriogênicas de cultivos prolongados e induzir novas células embriogênicas com o uso de 2,4-D.

**Palavras chave:** *Musa* ssp., embriões somáticos, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; células embriogênicas.

## Recovery of the embryogenic potential of late cells suspensions of banana 'Tropical'.

**Author:** Cleilton Vasconcelos Moreira

**Adviser:** Sebastião de Oliveira e Silva

**ABSTRACT:** This work describes a method for recovering the embryogenic capacity of cell suspensions of banana. The objective was to develop a methodology for recovering cell suspension with a high concentration of non-embryogenic cells, which have been grown for more than three years, as well as to keep embryogenic callus for a long-term period in order to obtain cell suspensions rapidly. To recover the embryogenic capacity samples from non-embryogenic cell suspensions were transferred to semisolid medium containing  $1 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and stored for 15 months under conditions of no light and temperature  $\pm 27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . The callus formed were subcultured over this period in semisolid culture medium containing different concentrations of 2,4-D (0.0, 0.50, 1.0 and  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). The growth of was based on the fresh weight of callus subcultured every two (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12) and three months (0, 3, 6, 9, 12). This study determined the growth curves of the embryogenic callus subcultured every bimonthly and quartely throughout twelve months on the presence of 2,4-D, and that of bimonthly subculture in MS medium on the absence of auxin. The number of embryos germinated and evaluations to prove viable embryogenic cell in the new cell suspensions using the indicator dye fluorescein diacetate (FDA) and plant regeneration tests of these suspensions was measured. Effective responses in growth and multiplication of new embryogenic callus are obtained with  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D in the culture medium at every two-months subculture. The use of  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D shows promising responses *in vitro* to maintain embryogenic callus containing somatic embryos banana 'Tropical'. The analyzes showed the presence of viable cells with expressive embryogenic plant regeneration in medium with  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D bimonthly subculture. Thus, using the methodology developed in this work, one can restore the embryogenic potential of non-embryogenic cell suspensions of extended crops and induce new embryogenic cells with the use of 2,4-D.

**Keywords:** *Musa* ssp., somatic embryos, acid 2,4-diclorofenoxiacetic, embryogenic cells.

## INTRODUÇÃO

A suspensão celular é um procedimento de cultivo *in vitro* de células vegetais, isoladas a partir de calos embriogênicos, em meio de cultura líquido. A cultura de células e a regeneração de plantas via embriogênese somática, constitui-se como uma técnica de grande aplicabilidade na micropropagação, por permitir a obtenção de grandes quantidades de mudas com qualidade (MORAIS-LINO et al. 2008), bem como na indução de duplicação do número de cromossomos, mutagênese e transformação genética (GANAPATHI et al., 2001; MOHANDAS et al., 2011; MOHANDAS et al., 2013), por facilitar o acesso a células isoladas, diminuindo a ocorrência de quimeras e por aumentar a eficiência na regeneração *in vitro*.

As auxinas são os principais reguladores de crescimento utilizados para indução da embriogênese somática. Segundo Xiao et al. (2007), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) tem sido importante na indução da calogênese e células embriogênicas de *Musa acuminata* cv. Mas, e utilizado para reativar o ciclo da célula e iniciar a formação do embrião. O 2,4-D também se mostrou eficiente no crescimento de calos de bananeira 'Prata Anã' (LIMA, 2009).

No processo de crescimento e desenvolvimento de calos embriogênicos, é fundamental estabelecer o melhor momento para repicagem dos calos e/ou de células em suspensão, pois, com a síntese de biomassa e/ou aumento do número de células formam-se novos agregados que, por conseguinte, traduzem em um ganho potencial na regeneração de plantas (SOARES, 2003).

Loyola-Vargas e Vázquez-Flota (2006) explicam que para quantificar o crescimento de células em suspensão, são utilizados, principalmente, os métodos baseados no número de células, peso de matéria seca, peso de matéria fresca, volume de células e proteína total da célula.

A cultura de células em suspensão de bananeiras tem sido relatada por vários autores (MONTEIRO et al., 2011; HOULLOU-KIDO et al., 2005; LIMA, 2009; MORAIS-LINO et al., 2008; STROSSE et al., 2006, 2003; KOSKY et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2010). No entanto, não há registros de pesquisas que visam o reuso pela recuperação da capacidade embriogênica em suspensões celulares de cultivos prolongados, sobretudo, em bananeira. São incipientes, ou inexistentes estudos que avaliem o restabelecimento do

potencial embriogênico de suspensões celulares após um período prolongado de cultivo *in vitro*, tampouco, estudos que comprovam a conversão de células não embriogênicas à embriogênicas em suspensões celulares de bananeiras.

As suspensões celulares não-embriogênicas tendem a proliferar células com baixa competência para se desenvolver a embriões somáticos, de modo que apresentam agregados celulares mais desuniformes, com baixa frequência de células embriogênicas (GEORGET et al., 2000). O desenvolvimento de protocolos que visem reintegrar o estado de homogêneas as suspensões celulares, sobretudo, àquelas de cultivos prolongados, são absolutamente indispensáveis para recrescer e aumentar a frequência de células embriogênicas. Neste contexto, é necessário desenvolver e ampliar as potencialidades das aplicações da cultura de células em suspensão, pois, isso exprime uma importância essencial em pesquisas com fins biotecnológicos e, logo, possibilita gerar novos processos para otimização dos sistemas de protocolos de embriogênese somática.

À vista disso, esse trabalho teve como objetivos desenvolver uma metodologia para recuperar a capacidade embriogênica de suspensões celulares com alta concentração de células não embriogênicas, cultivadas por mais de três anos, e para manter por período prolongado os calos embriogênicos obtidos a partir de células em suspensão de bananeira 'Tropical' com baixa capacidade embriogênica de forma a permitir a rápida obtenção de suspensões celulares.

Espera-se, dessa maneira recuperar a qualidade das suspensões celulares cultivadas por período prolongado, com formação de novos agregados celulares ou células isoladas, resgatar e manter o potencial embriogênico dessas suspensões celulares para que sejam induzidas a produzir embriões somáticos quando desejado. Além disso, com as aplicações dessas estratégias, espera-se contribuir no desenvolvimento de protocolos eficientes para produção e manutenção de embriões somáticos a partir de suspensões celulares não embriogênicas, que poderão ser utilizados para o estabelecimento de novas suspensões celulares, uma vez que o processo para nova indução de embriogênese somática em bananeiras a partir de inflorescências masculinas imaturas até alcançar a etapa de estabelecimento de uma nova suspensão celular é laborioso e demanda muito tempo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Núcleo de Biotecnologia Avançada (NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia.

### **Material vegetal e condições de cultivo**

Como material inicial de estudo foram utilizadas suspensões celulares de bananeira 'Tropical' (AAAB), cultivadas por mais de três anos e que já estavam com baixa capacidade embriogênica, com presença de aglomerados de tamanhos variados constituído de células densas, apresentando escurecimento oxidativo e aspecto viscoso. Durante os três anos as suspensões foram subcultivadas a cada 10 dias em meio líquido constituído de sais e vitaminas do MS, suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0,219 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (MORAIS-LINO et al., 2008) e mantidas no escuro a 27 ± 2°C, sob agitação de 120 rpm.

### **Obtenção de calos embriogênicos de bananeira a partir de suspensões celulares cultivadas por mais de três anos**

Aproximadamente 600µL de volume da suspensão celular não-embriogênica foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura semissólido, constituído de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 0,219 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 8 g L<sup>-1</sup> de agarose e pH ajustado para 5,8. Para a transferência dos agregados das suspensões celulares em fase de multiplicação, foi utilizada uma peneira (diâmetro de 100 µm) esterilizada. Após essa etapa, 50 mg de agregados celulares foram transferidos para o meio semissólido e distribuídos em quatro partes com auxílio de uma espátula estéril.

As placas foram incubadas durante 15 meses, com realização de dois subcultivos, sendo o primeiro realizado no sexto mês após o dia da inoculação, e o segundo subcultivo aos onze meses, sob condições de ausência de luz e à temperatura de 27 ± 2°C. A partir desse período foram realizadas observações semanais para detectar a formação de pró-embriões e embriões somáticos,

constituindo os calos embriogênicos que seriam utilizados para produção de grande volume de calos embriogênicos e obtenção de novas suspensões celulares.

### **Produção de calos embriogênicos a partir de suspensões celulares cultivadas por longos períodos**

Amostras contendo 20 mg de calos embriogênicos de bananeira 'Tropical' originados das suspensões celulares cultivadas por período prolongado foram coletadas com auxílio de uma espátula esterilizada, colocadas sobre uma membrana de poliéster e distribuídas em placas de Petri contendo meio MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com diferentes concentrações de 2,4 D (0,0 mg L<sup>-1</sup>; 0,50 mg L<sup>-1</sup>; 1,0 mg L<sup>-1</sup>; 1,5 mg L<sup>-1</sup>) e pH ajustado para 5,8 e solidificado com 8,0 g L<sup>-1</sup> de agarose. Os calos foram mantidos em sala de crescimento nas condições de ausência de luz e à temperatura de 22 ± 1 °C.

A fim de se determinar o melhor manejo das culturas de calos para obtenção de maior crescimento dos calos embriogênicos foram testados intervalos de transferência para novo meio de cultura (60 e 90 dias) e acompanhados durante um ano.

O crescimento dos calos foi baseado no peso fresco dos calos subcultivados a cada dois (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12) e três meses (0, 3, 6, 9, 12). As membranas contendo os calos foram pesadas e as culturas foram transferidas para novo meio de cultivo. Ao final dos 12 meses de cultivo, realizou-se a contagem do número de embriões germinados nos calos.

Amostras de calos mantidos nas diferentes concentrações de 2,4-D foram transferidas para meio MS sem 2,4-D, e o crescimento dos calos foi acompanhado por um ano mediante pesagem a cada dois meses.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em parcela subdividida no tempo com 28 tratamentos (4 concentrações de 2,4-D x 7 intervalos de coleta: (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses), 20 tratamentos (4 concentrações de 2,4-D x 5 intervalos de coleta: 0, 3, 6, 9, 12 meses), e 28 tratamentos (calos oriundos de 4 concentrações de 2,4-D cultivados no meio básico MS na ausência da auxina x 7 intervalos de coleta: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12

meses). A curva de crescimento dos calos foi plotada a partir da média de 12 repetições por ponto da curva em cada tempo de determinação de massa fresca dos calos. As médias foram submetidas à análise de variância pelo teste F e quando significativas a regressão polinomial foi aplicada.

### **Restabelecimento de suspensões celulares e regeneração de plantas**

Os novos embriões somáticos formados a partir das subculturas dos calos tratados com diferentes concentrações de 2,4-D foram submetidos à avaliação do seu potencial de gerar novas suspensões celulares com conteúdo de células viáveis de características embriogênicas e, na sequência, foram avaliados quanto ao potencial de regenerar plantas normais.

Amostras dos calos embriogênicos oriundos de cada meio de cultura (com diferentes concentrações de 2,4-D), foram transferidas para Erlenmeyers contendo meio líquido utilizado para o estabelecimento de células em suspensão desenvolvido por Morais-Lino et al. (2008), constituído de sais e vitaminas do MS, suplementado com 2,4-D (0,0; 0,50; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>), 0,219 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e mantidos no escuro a 27 ± 2 °C, sob agitação de 120 rpm para estabelecimento do cultivo de células em suspensão. As suspensões foram subcultivadas a cada 10 dias.

Para detecção de células embriogênicas duas amostras de suspensão celular de cada tratamento foram depositadas sobre lâminas de vidro e adicionadas duas a três gotas de solução de FDA a 0,01%. As lâminas foram cobertas com uma lamínula e, após 5 minutos, observadas em microscópio de fluorescência (Olympus DP 71), utilizando-se o filtro Wiba com aumento total de 100X. As células que apresentaram fluorescência de coloração verde e formato isodiamétrico foram consideradas viáveis.

Aos 60 dias de estabelecimento das suspensões celulares, foram procedidos os testes de regeneração de plantas, utilizando-se o meio de regeneração constituído por sais e vitaminas do meio MS, solidificado com 0,7% de ágar, suplementado com BAP (0,45 mg L<sup>-1</sup>), AIA (0,35 mg L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (10 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) de acordo com protocolo estabelecido por Morais-Lino et al. (2008). Os embriões somáticos foram

transferidos para a sala de crescimento sob iluminação com fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fóton de  $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Foram utilizadas 24 repetições para os testes de regeneração e para os testes de viabilidade das suspensões celulares foram utilizadas duas amostras provenientes de cada tratamento.

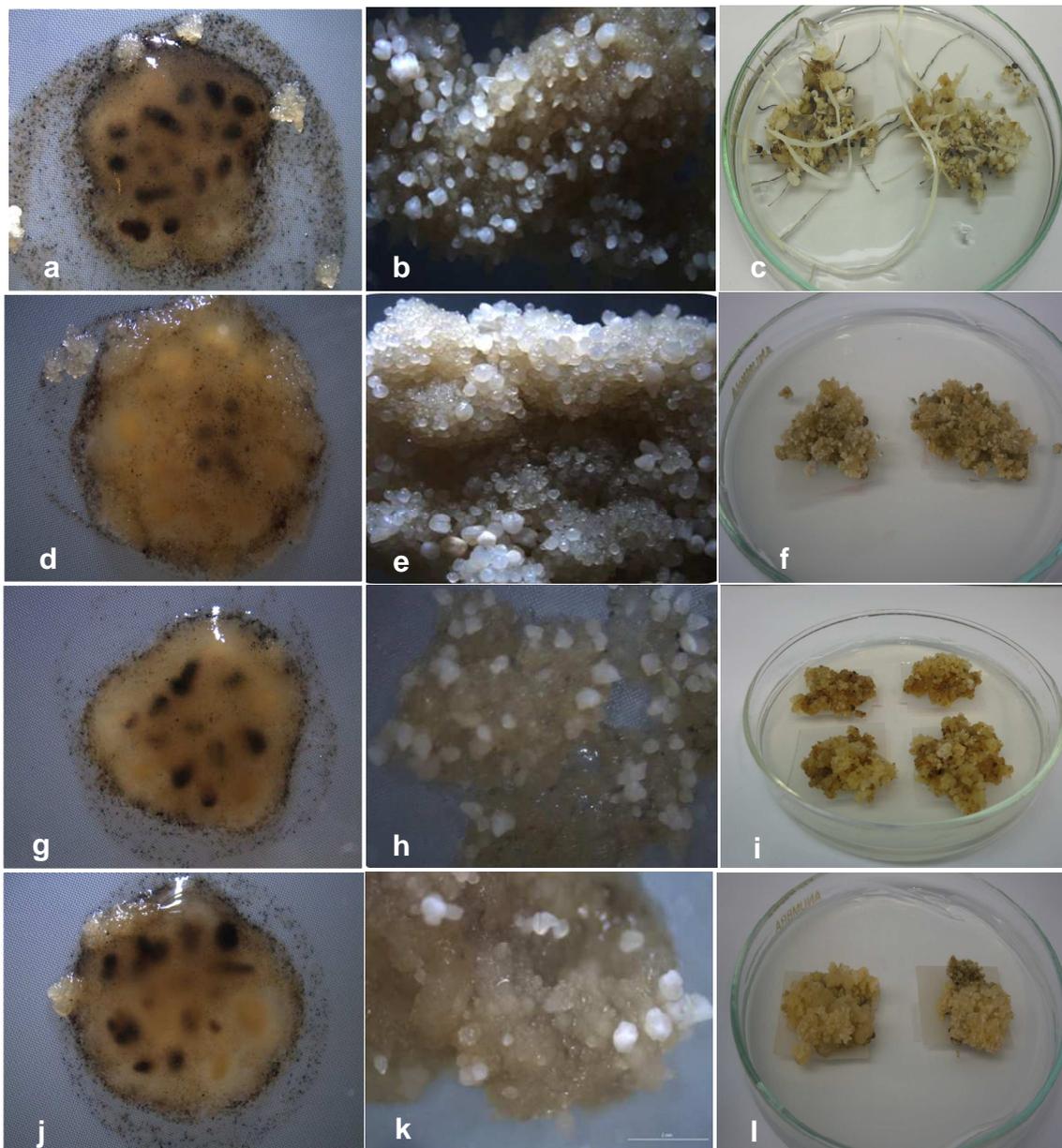
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Produção de calos embriogênicos a partir de suspensões celulares cultivadas por longos períodos**

Houve interação significativa entre as concentrações da auxina 2,4-D e o intervalo de subcultivos de dois meses (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses) para o crescimento dos calos embriogênicos. Foi constatado que o meio MS com as concentrações de 2,4 D não diferiram significativamente para a produção de calos. Apesar desse resultado, a auxina 2,4-D apresentou grande eficiência na indução de embriogênese somática de *Musa* (AAAB) cv. Tropical a partir da cultura de calos embriogênicos com subculturas a cada dois meses.

Aos três meses após inoculação, nas amostras coletadas de suspensões celulares de bananeira cv. Tropical as células não-embriogênicas em suspensão com presença de aglomerados de tamanhos variados constituído de células densas, apresentando escurecimento oxidativo e aspecto viscoso, foi observada a diferenciação de agregados celulares com a formação inicial de calos nas extremidades (Figuras 1a, 1d, 1g e 1j). Aos 60 dias de cultivo, verificou-se o crescimento e desenvolvimento dos calos (Figuras 1b, 1e, 1h e 1k). A partir dos 90 dias, os calos embriogênicos mantidos em meio de cultura suplementado com diferentes níveis de 2,4-D apresentaram a formação de novos proembriões e embriões somáticos de coloração esbranquiçada.

As maiores médias de peso fresco dos calos embriogênicos foram obtidas no meio suplementado com  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 1e). Este tratamento foi o mais eficiente para a formação de novos embriões somáticos, quando a cultura foi transferida para novo meio, que podem ser utilizados para o estabelecimento rápido de suspensão celular.

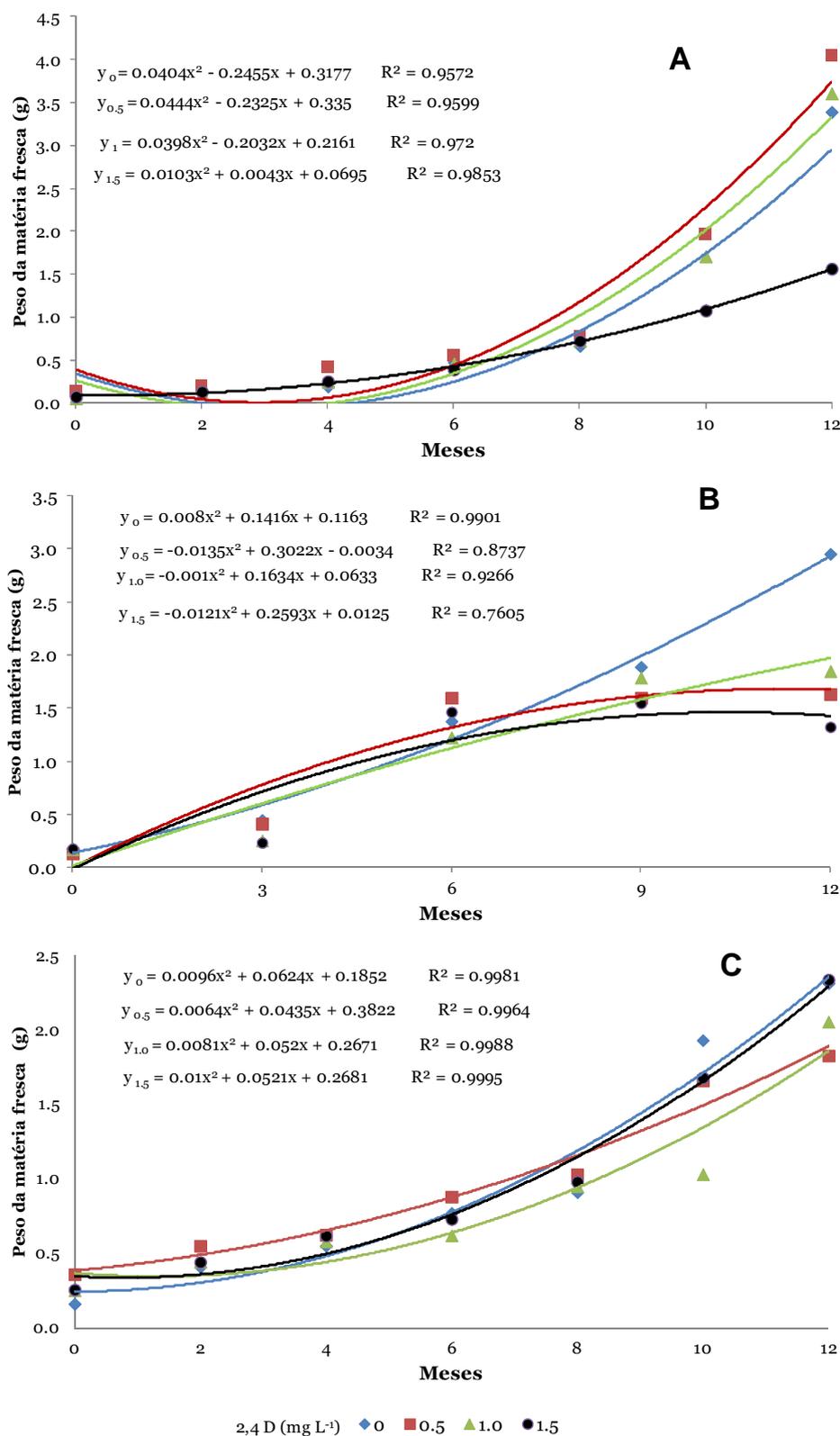


**FIGURA 1** Indução de calos embriogênicos a partir de suspensões celulares de bananeira 'Tropical' cultivadas por período prolongado. Fase inicial de formação (a, d, g, j) e desenvolvimento de embriões somáticos após 60 dias (b, e, h, k) e 90 dias de cultivo em meio MS semissólido com diferentes concentrações de 2,4-D. a-c) ausência de 2,4-D; d-f)  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D; g-i)  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D; j-l)  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Com relação ao crescimento dos calos, notou-se que os maiores coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram obtidos com o uso do peso da matéria fresca, e que os dados obtidos com essa característica de avaliação ajustaram-se à equação logística, sendo as equações significativas ao nível de 1% de probabilidade (Figura 2A). Esses resultados decorrem do fato dessa característica de avaliação ser menos sujeita a erros de determinação.

De acordo com a análise de regressão foi possível verificar que os calos embriogênicos cultivados em intervalos de dois meses, em meio MS contendo 2,4-D, mantinham o crescimento contínuo e ascendente. No entanto, nos seis primeiros meses de cultivo não foram registrados incrementos significativos em peso da matéria fresca (g) comparados ao controle (ausência do fitorregulador). A partir do 6º mês nos intervalos de subcultivos bimestrais observou-se a proliferação intensa de novos calos com presença de embriões somáticos, confirmados pelo incremento no peso de matéria fresca, sendo que a concentração mais elevada de 2,4-D ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) apresentou menor crescimento. Estes resultados mostraram que a renovação do meio nutritivo em intervalos de dois meses de cultivo mantém a viabilidade de calos embriogênicos com potencial para formação de embriões somáticos viáveis de bananeira 'Tropical'.

Por outro lado, nos calos com subcultivo trimestral (0, 3, 6, 9, 12 meses) em meio com diferentes concentrações de 2,4-D (Figura 2B) foi observado que até o sexto mês de cultivo houve um incremento de matéria fresca um pouco mais elevado quando comparado com os subcultivados a cada dois meses. Entretanto, a partir do 6º mês os calos cultivados em meio contendo 2,4-D reduziram a taxa de crescimento, comprometendo a qualidade dos calos embriogênicos. Na ausência da auxina houve uma de incremento de matéria fresca dos calos ao longo dos 12 meses. Porém, esse incremento pode ter sido influenciado pela elevada maturação e germinação dos embriões somáticos (Figura 1c).



**FIGURA 2** Crescimento de calos embriogênicos de bananeira ‘Tropical’ com subcultivos bimestral (A) e trimestral (B) em meio MS contendo diferentes concentrações de 2,4-D e subcultivo bimestral de calos oriundos do cultivo em meio MS com diferentes concentrações de 2,4-D e transferidos para meio básico MS na ausência da auxina (C).

Analisando as subculturas no intervalo bimestral (Figura 2A) e trimestral (Figura 2B), verifica-se que, o aumento da concentração da auxina 2,4-D tem efeito estimulador em alguns casos, e também, pode levar a efeitos inibitórios quando utilizadas concentrações de até  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D. Simultaneamente, ambos os intervalos de subcultura também influenciaram na indução de calos com novos embriões somáticos. O subcultivo bimestral de calos embriogênicos de bananeira 'Tropical' permitiu a manutenção do crescimento contínuo e ascendente.

Por outro lado, nos subcultivos trimestrais os calos cultivados em meio com diferentes concentrações de 2,4-D, reduziram o crescimento a partir do 6º mês, enquanto os cultivados em meio sem 2,4-D continuaram aumentando o conteúdo de matéria fresca (Figura 2B). Durante os intervalos das subculturas dos calos, após os primeiros meses de cultivo, observou-se uma grande proliferação de embriões somáticos, e esses entraram em processo de maturação e germinação sem induzir a formação de novos embriões somáticos, refletindo o seu baixo estado nutricional pelo esgotamento do meio de cultivo. Esse comportamento não é desejado quando o objetivo é a manutenção contínua da qualidade dos calos embriogênicos com a formação de proembriões.

Assim sendo, esses resultados indicaram que, possivelmente, intervalos mais distantes de subcultivos e elevadas concentrações dessa auxina levariam mais rapidamente a um possível descontrole nas exigências metabólicas para o crescimento, maturação e germinação dos embriões somáticos.

Para os calos embriogênicos transferidos dos meios de cultivo com diferentes concentrações de 2,4-D para o meio básico MS na ausência da auxina (Figura 2C) e subcultivados a cada dois meses, não foram identificados efeitos significativos entre os calos oriundos das diferentes concentrações de 2,4-D. Possivelmente o efeito residual da auxina promoveu um constante crescimento expresso em aumento da produção de matéria fresca dos calos. Essas respostas confirmam que, independente da concentração de 2,4-D administrada nos meios de cultivo e do tempo de exposição dos calos a estes meios, o incremento de matéria fresca foi potencializado quando os calos embriogênicos foram transferidos para o meio MS na ausência da auxina 2,4-D.

Além disso, foi verificado que os calos originados dos tratamentos com a concentração elevada de 2,4-D ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) quando transferidos para o meio sem a auxina, com intervalo bimestral de cultivo, produziram menos matéria fresca em relação as subculturas bimestral e trimestral na presença do 2,4-D.

Ao final dos 12 meses de cultivo, por meio da contagem do número médio de embriões germinados nos calos embriogênicos provenientes das subculturas bimensais e trimensais tratadas com 2,4-D e da subcultura bimestral na ausência da auxina 2,4-D, foram observados variações na germinação de embriões somáticos nos tratamentos que envolveram as concentrações da auxina 2,4-D (Tabela 1).

**TABELA 1.** Número de embriões somáticos germinados a partir de calos embriogênicos de bananeira 'Tropical' oriundos dos intervalos das subculturas bimestral (A) e trimestral (B) em diferentes concentrações de 2,4-D e da subcultura bimestral na ausência da auxina 2,4-D. (C) ao longo de 12 meses.

Concentração 2,4 -D	Número de embriões somáticos germinados		
	Intervalo de subcultura		
	A	B	C
Controle	504	873	98
0,50 $\text{mg L}^{-1}$	0	0	190
1,0 $\text{mg L}^{-1}$	0	26	12.195
1,5 $\text{mg L}^{-1}$	0	0	33

Observou-se que, na subcultura bimestral (A), a presença do 2,4-D promoveu a manutenção do crescimento dos calos, de modo que os proembriões e os embriões formados não foram induzidos a processos de diferenciação, maturação e germinação. Uma total de 504 embriões somáticos germinaram quando os calos embriogênicos foram mantidos em meio MS na ausência do 2,4-D. No entanto, o tratamento controle para o intervalo de subcultura trimestral (B), obteve-se 873 embriões germinados. Foi observado que embriões globulares surgiram diretamente a partir dos calos embriogênicos.

Os calos embriogênicos subcultivados em intervalo bimestral mantidos no meio com ausência da auxina (C), oriundos de cultivos com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de

2,4-D, foram os que apresentaram maior número de embriões germinados (12.195). A metodologia aplicada nesse trabalho, utilizando calos embriogênicos contendo proembriões e embriões cultivados *in vitro*, com posterior formação de novos embriões somáticos promoveu um número expressivo de germinação seguida da regeneração *in vitro* de planta de bananeira cv. Tropical.

Para Arnold et al. (2002), os embriões maduros com uma morfologia normal, e que tenham acumulado material de armazenamento suficiente, alcançam uma maturação e podem converter em plantas normais. Segundo esses autores, a competência para a indução à embriogênese somática pode ser o resultado da sensibilidade da auxina.

### **Restabelecimento de suspensões celulares e regeneração de plantas**

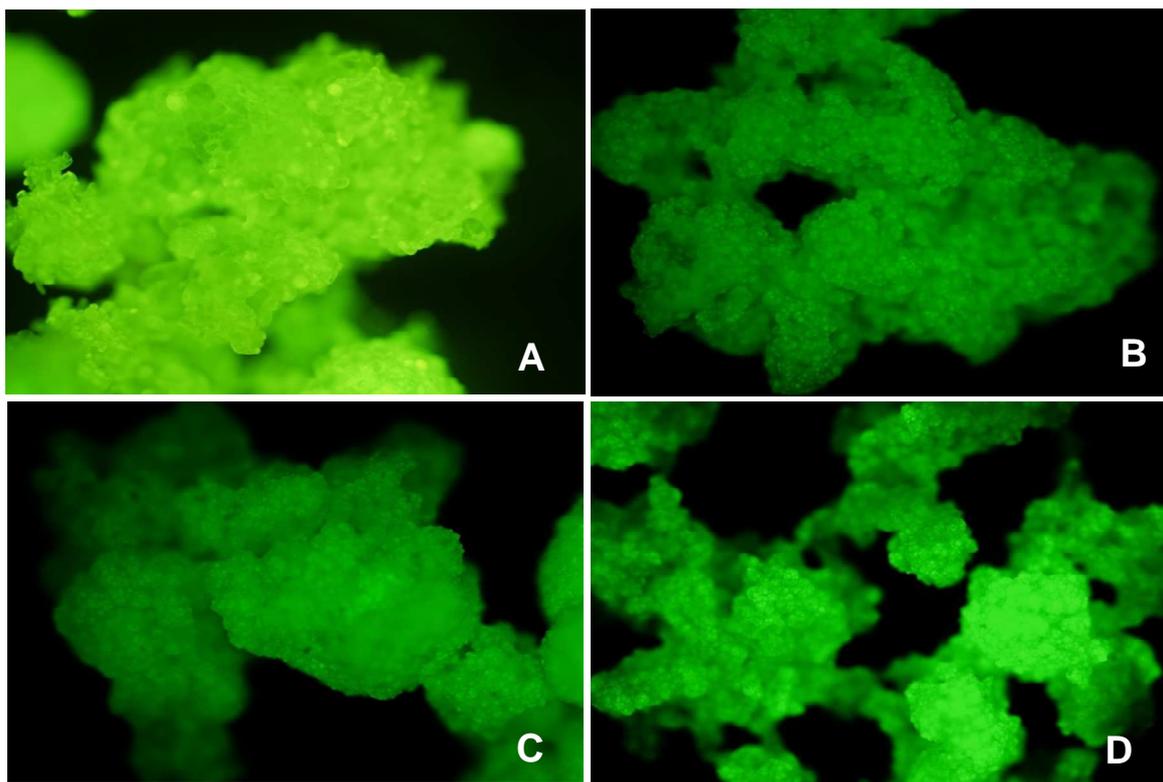
Com relação ao restabelecimento de novas suspensões celulares, foi verificado que a cultura de células em suspensão provenientes dos tratamentos com 2,4-D apresentou competência embriogênica. Observou-se a multiplicação das células em suspensão, no entanto, foi verificado que a cultura dessas células provenientes do tratamento ausência do 2,4-D não se manteve após 63 dias, levando ao escurecimento e morte celular desse tratamento. Provavelmente a presença do fitorregulador 2,4-D foi requerida, de modo que, mesmo sendo disponibilizada no meio de cultivo, sua ausência endógena conduziu a essa resposta. Isso revela a importância do 2,4 D e seu efeito residual no início do estabelecimento das culturas de calos embriogênicos.

Além disso, outra observação importante registrada foi referente à influência dos estádios de maturação dos embriões somáticos formados sobre os calos para obtenção das suspensões celulares. Embriões somáticos em estádios avançados de maturação não foram fontes adequadas para estabelecimento da suspensão celular. Assim, mesmo utilizando embriões somáticos em fases iniciais de formação, ou seja, proembriões e embriões somáticos mais jovens, nas condições de cultivo impostas desse tratamento com ausência da auxina, os embriões alcançaram imediata maturação, o que levou a não formação dos agregados celulares e a iniciação rápida do processo

de morte celular. Isso explica o período curto da cultura dessas células oriundas desse tratamento.

Quanto à detecção de células embriogênicas, essas possuem divisões celulares contínuas e núcleos proeminentes que resultam na formação de massas de células, chamadas de agregados embriogênicos (SILVA et al., 2012). Neste trabalho, os pontos verdes fluorescentes descrevem este tipo celular, portanto, sendo potencialmente embriogênicas. Foi visualmente perceptível a presença de grandes pontos de concentrações dessas células nas suspensões celulares dos tratamentos com 2,4-D. Todavia, em menores proporções naquelas provenientes do tratamento em ausência dessa auxina. Possivelmente essas suspensões retomariam ao estado de não-embriogênico pela possibilidade de multiplicação de células desse tipo.

Agregados não-embriogênicos apresentam em maior parte células grandes, alongadas, vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado, não sendo viáveis (NOGUEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2012). O método de detecção de células embriogênicas das suspensões celulares pelo uso do diacetato de fluoresceína (FDA), permitiu comprovação da presença elevada de agregados celulares com alto potencial embriogênico, praticamente ao longo de todo o ciclo de crescimento (Figura 3).

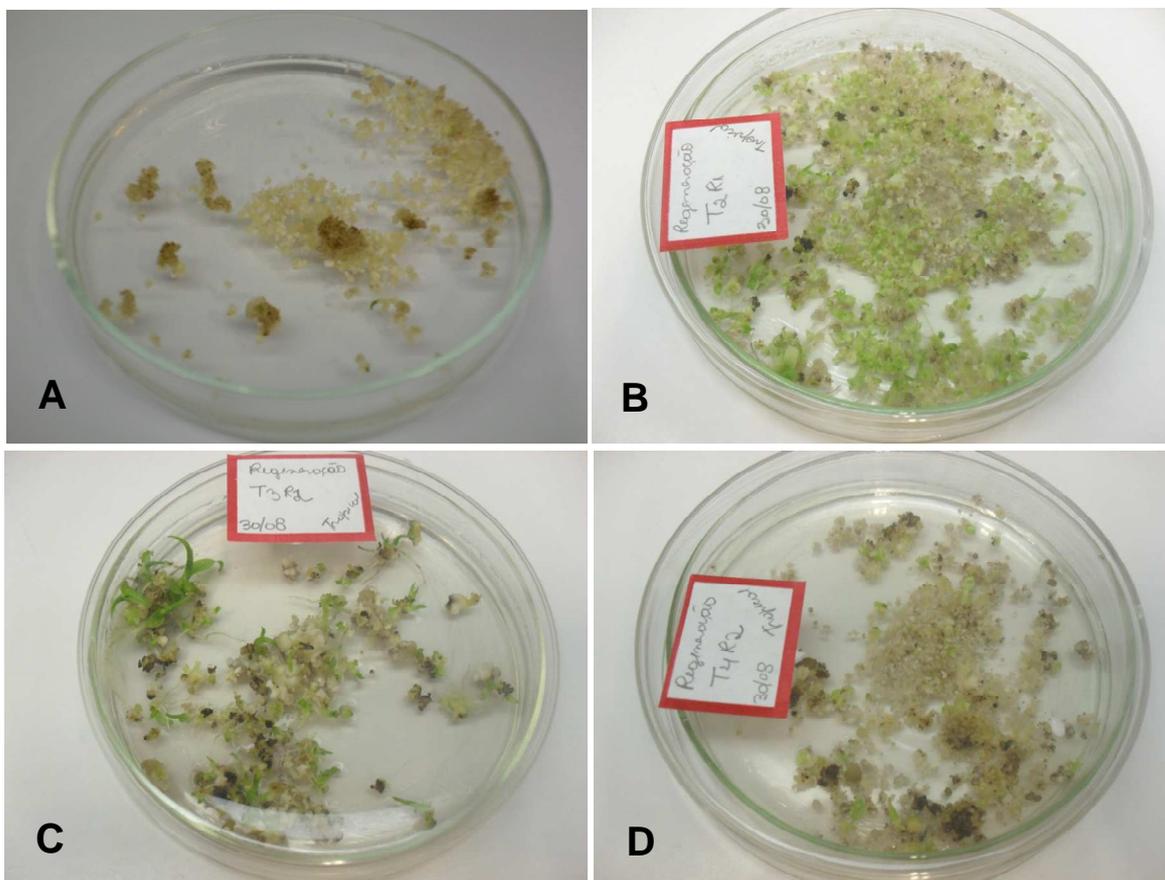


**FIGURA 3** Agregados celulares em suspensão de bananeira 'Tropical' coradas com diacetato de fluoresceína (FDA) de subcultura bimestral submetidas a diferentes concentrações de ácido 2,4 diclorofenoxiacético: (A) Controle; (B) 0,50 mg L<sup>-1</sup>; (C) 1,0 mg L<sup>-1</sup>; (D) 1,5 mg L<sup>-1</sup>.

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

Como resultado para a regeneração *in vitro*, verificou-se que após três meses de observação, as suspensões dos tratamentos com presença do 2,4-D regeneram plantas em maior ou menor proporção (Figura 4). Houve regeneração de plantas em maior proporção no tratamento com 0,50 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D da subcultura bimestral. Enquanto aquelas suspensões provenientes do tratamento na ausência da auxina apresentaram escurecimento oxidativo, morte celular e baixa competência de regeneração de plantas (Figura 4).

Resultados obtidos por outros autores (KHALIL et al., 2002; KULKARNI et al., 2006; XIAO et al., 2007; LIMA, 2009) indicam a grande variabilidade das respostas de *Musa* spp em relação a diferentes concentrações de reguladores de crescimento empregados, isoladamente ou em combinações.



**FIGURA 4** Aspecto das células em regeneração de banana cv. Tropical oriundos de suspensões celulares cultivadas sob diferentes concentrações de ácido 2,4 diclorofenoxiacético: (A) Controle; (B) 0,50 mg L<sup>-1</sup>; (C) 1,0 mg L<sup>-1</sup>; (D) 1,5 mg L<sup>-1</sup>.

Com a estratégia adotada na metodologia deste trabalho, foi possível comprovar que, células não-embriogênicas presentes nas suspensões celulares de cultivo prolongado podem ser induzidas a proliferar células embriogênicas, e, portanto, restabelecer o crescimento com potencial formação de novos embriões somáticos e, por conseguinte, obter suspensões celulares compatíveis com células embriogênicas que podem ser destinados a regenerar plantas fisiologicamente normais.

## CONCLUSÕES

É possível recuperar a capacidade embriogênica de suspensões celulares com alta concentração de células não-embriogênicas, cultivadas por mais de três anos; bem como manter calos embriogênicos por período prolongado de forma a permitir a rápida obtenção de novas suspensões celulares.

Suspensões celulares não embriogênicas de bananeira ‘Tropical’ (AAAB) podem recuperar o potencial embriogênico mediante o cultivo em meio MS sólido na presença de 0,50 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D para geração de embriões somáticos, e posterior cultivo em meio líquido.

Culturas de calos embriogênicos apresentam um crescimento contínuo quando subcultivados a cada dois meses no meio de cultura com 0,50 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, havendo a formação de novos embriões somáticos. E o uso de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D revela resposta promissora na manutenção *in vitro* prolongada de calos embriogênicos de bananeira ‘Tropical’.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, S.V.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

DOMERGUE, F.G.R.; FERRIÈRE, N.; CÔTE, F. X. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 8, p. 748-754, July 2000.

GANAPATHI, T.R.; HIGGS, N.S.; BAILINT-KURTI, P.J.; ARNTZEN, C.J.; MAY, G.D.; VAN ECK, J.M. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 2, p. 157-162, 2001.

GEORGET, F.; DOMERGUE, R.; FERRIÈRE, N.; CÔTE, F. X. Morphohistological study of the different constituents of banana (*Musa* AAA, cv. Grand nain) embryogenic cell suspension. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 748-754, 2000.

HOULLOU-KIDO, L.; KIDO, E.A.; FALCO, M.C.; SILVA FILHO, M. de C.S.; FIGUEIRA, A.V. de O.; NOGUEIRA, N de L.; ROSSI, M.L.; TULMANN NETO, A. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana

'MAÇA' regeneration. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1081-1086, 2005.

KHALIL, S.M., CHEACH, K.T., PEREZ, E.A., GASKILL, D.A., HU, J.S. Regeneration of banana (*Musa* spp.AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. **Plant Cell Rep.** v. 20, p. 1128–1134, 2002.

KOSKY, R.G.; SILVA, M. de F.; PÉREZ, L.P.; GILLIARD, T.; MARTINEZ, F.B.; VEGA, M.R.; MILIAN, M.C.; MENDOZA, E.Q. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scalp-up in a bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 21-26, 2002.

KULKARNI, V.M., SUPRASANNA, P., BAPAT, V.A. Plant regeneration through multiple shoot formation and somatic embryogenesis in a commercially important and endangered Indian banana cv. Rajeli. **Curr. Sci.** v. 60, p. 842–846, 2006.

LIMA, C.D.F. **Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões somáticos de bananeira cv. Prata Anã.** 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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

MATSUMOTO, K.; MONTE, D.C.; TEIXEIRA, J.B.; HAICOUR, R.; DAVEY, M.R. Banana protoplasts: culture and its applications. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, Tokyo, v.4, n.1, p.32-38, 2010.

MOHANDAS, S.; SOWMYA, H.D.; SAXENA, A.K.; MEENAKSHI, S.; RANI, R. T.; MAHMOOD, R. Transgenic banana cv. Rasthali (AAB, Silk gp) harboring Ace-AMP1 gene imparts enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* race 1. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 164, p. 392-399, 2013.

MOHANDAS, S.; MANJULA, R.; SAXENA, A.K.; AJAY, K.M.; SHAKUNTHALA, B.; SOWMYA, H.D.; MEENAKSHI, S. Transformation of the banana cultivar 'Nanjangud Rasbale' (syn. 'Rasthali', AAB, silk subgroup) with the amp gene and screening for *Fusarium* resistance with a bioassay. **ISHS Acta Horticulturae**, v. 897, p. 293-296, 2011.

MONTEIRO, T.R.; LUIS, Z.G.; FREITAS, E.O.; MATSUMOTO, K.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Diluição celular, características do meio de cultura e biorreatores de imersão temporária na diferenciação e regeneração de células em suspensão de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. p. 213-221, 2011.

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

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

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; PORTO, J.M.P.; NICIOLI, P.M.; STEIN, V.C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise Ultra-estrutural de Calos Embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 48-50, 2007.

SILVA, L.C.; PAIVA, R.; VARGAS, D.P.; SILVA, D.P.C.; HERRERA, R.C.; BARBOSA, S.; NETTO, A.P.C. Cell viability of *Byrsonima intermedia* A Juss Calli. **Journal of Agricultural Science and Technology**. v. 2, p.713-720, 2012.

SOARES, G.A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]**. Dissertação 2003. 90f. (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

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

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

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

## CAPÍTULO II

**Irradiação gama em calos embriogênicos e suspensões celulares de  
bananeira 'Tropical' (AAAB) e 'Terra Maranhão' (AAB)  
para indução de mutagênese <sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Crop Breeding and Applied Biotechnology.

**Irradiação gama em calos embriogênicos e suspensões celulares de  
bananeira ‘Tropical’ (AAAB) e ‘Terra Maranhão’ (AAB)  
para indução de mutagênese**

**Autor: Cleilton Vasconcelos Moreira**

**Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva**

**RESUMO:** Este trabalho objetivou adaptar a metodologia de indução de mutação, via irradiação gama, para calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC) de bananeira ‘Tropical’ (AAAB) e ‘Terra Maranhão’ (AAB). O trabalho foi desenvolvido em duas etapas para avaliar o efeito da radiação do Cobalto-60 em doses de 2,5 a 200 Gy em culturas embriogênicas (calos e suspensões celulares). Decorridos 60 dias da irradiação, em meio de cultura de regeneração realizaram-se avaliações para mensurar o número de embriões germinados, número médio de raízes, comprimento médio de plantas e o índice de sobrevivência. Os resultados mostraram que o aumento das doses de radiação gama provocou reduções nos parâmetros estudados. Independente da cultivar estudada, as doses de 100 e 200 Gy afetaram negativamente a germinação de embriões somáticos dos calos embriogênicos, bem como o número de raízes e comprimento das plantas. Nas suspensões celulares estas variáveis foram reduzidas com as doses de 60 a 200 Gy. O aumento das doses de radiação provocou redução no comprimento das plantas e no índice de sobrevivência. A radiosensibilidade aos raios gama em CE de bananeira ‘Terra Maranhão’ foi verificada entre 60 e 80 Gy com reduções mais próximas a 50% para sobrevivência, enquanto a de 80 Gy para SC. Para a cultivar Tropical as doses de radiação gama sugeridas são de 60, 80 e 100 Gy para CE, e para irradiação de SC, foi possível identificar a radiosensibilidade com 40 Gy. A eficiência dessa metodologia de irradiação gama em calos embriogênicos e suspensões celulares abrem perspectivas para uso de mutagênese *in vitro* no melhoramento de bananeira em pesquisas de determinação da dose letal LD<sub>50</sub>.

**Palavras-chave:** *Musa* spp., Melhoramento genético, indução de mutação, embriogênese somática.

**Gamma irradiation in embryogenic callus and cell suspensions of banana  
'Tropical' (AAAB) and 'Terra Maranhão' (AAB)  
to induce mutagenesis**

**Author: Cleilton Vasconcelos Moreira**

**Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva**

**ABSTRACT:** This study aimed to adapt the mutation induction methodology, via gamma irradiation, to embryogenic callus (EC) and cell suspensions (CS) of banana 'Tropical' (AAAB) and 'Terra Maranhão' (AAB). The study was conducted into two stages to evaluate the effect of radiation from Cobalt-60 in doses from 2.5 to 200 Gy in embryogenic cultures (callus and cell suspensions). After 60 days of irradiation, in regeneration medium culture, evaluations were carried out to measure the number of germinated embryos, number of roots, length of plants and the survival rate. The results showed that increasing doses of gamma radiation caused reductions in the parameters under study. Independent of the cultivar at issue, doses of 100 Gy and 200 affect negatively the germination of somatic embryos from embryogenic callus as well as the number of root and the length plants. All these variables cell suspensions were reduced at the doses from 60 to 200 Gy. The increasing radiation doses caused a reduction in the length of the plants and in the survival rate. The radio-sensitivity of gamma irradiating embryogenic callus of banana 'Terra Maranhão' was recorded between 60 and 80 Gy under further reductions close to 50% for survival, while 80 Gy in cell suspensions (CS). To cultivate Tropical, it was suggested the gamma radiation doses of 60, 80 and 100 Gy for EC and CS irradiation; it was possible to identify the radio-sensitivity with 40 Gy. The efficiency of this gama irradiation methodology in embryogenic callus and cell suspensions brings perspectives on the use of in vitro mutagenesis for the banana improvement in researches regarding the determination of the LD<sub>50</sub> lethal dose.

**Keywords:** *Musa* spp, Breeding, mutation induction, somatic embryogenesis.

## INTRODUÇÃO

Bananas e plátanos estão entre as mais importantes culturas alimentares em todo o mundo e são cultivados em mais de 80 países tropicais, inclusive, em todos os estados brasileiros, principalmente por pequenos agricultores. O Brasil é o quinto produtor mundial de banana, com produção de 6,9 milhões de toneladas em uma área de 481.116 ha (FAO 2015).

Entre os problemas que impedem a obtenção de altos rendimentos na cadeia produtiva da banana estão as sigatokas amarela e negra, e o mal-do-Panamá, principais doenças que causam perdas significativas na produção. As cultivares mais conhecidas (Prata, Pacovan, Maçã e Grande Naine) são muito suscetíveis à Sigatoka-negra e, à exceção da 'Maçã', são também suscetíveis à Sigatoka-amarela. Com relação ao mal-do-Panamá, a 'Grande Naine', é resistente, a 'Maçã' é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis (SILVA et al., 2013).

Uma das estratégias para a solução dos problemas relacionados às doenças da bananeira é a criação de novas variedades resistentes, via hibridação, tarefa que é dificultada pela esterilidade, ploidia e a falta de produção de pólen e de sementes em alguns cruzamentos, nesse caso sugere-se o uso de técnicas biotecnológicas como a mutação (SILVA et al. 2013).

A mutação é indicada para cultivares elites e é mais adequada para características agronômicas governadas por um ou poucos alelos, uma vez que conserva as outras características do fenótipo original (BERMUDEZ E CARABALLOSO et al., 2010, PESTANA et al., 2011).

A radiação gama tem sido empregada para induzir mutação em gemas de bananeira (BERMÚDEZ et al., 2002; HIRIMBUREGAMA et al., 2004; RESENDE, 2005). Bermúdez et al. (2002), ao tratar gemas adventícias de clones de bananeira das cultivares Maçã (AAB) e Gros Michel (AAA) obtiveram mutantes de bananeira com porte reduzido, por meio da radiação gama de 25 Gy. Hirimburegama et al. (2004), após irradiação de ápices caulinares de bananeira (AAB) com 45 Gy, alcançaram sucesso para redução de altura e frutificação precoce.

A aplicação de radiação gama de 20 Gy em ápices caulinares de triploides AAB (Pacovan) e 30 Gy em tetraploides AAAB (Pacovan Ken) criou uma ampla variabilidade para porte e um grande número de mutantes para

diversas características agronômicas de interesse em bananeiras, como resistência a pragas desenvolvidas na Embrapa Mandioca e Fruticultura (RESENDE, 2005). Estes resultados confirmam a possibilidade de emprego da indução de mutação em bananeira para a obtenção de características agronômicas desejáveis.

Todavia, são incipientes os trabalhos que empregaram calos embriogênicos e ou suspensão celulares para indução de mutagênese de bananeira (BECKER et al., 2000; MATSUMOTO et al., 2002; KHANNA et al., 2004). Culturas de calos embriogênicos podem ser utilizadas diretamente para a micropropagação (MORAIS-LINO et al., 2008) e para transformação genética (ACERETO-ESCOFFIÉ et al., 2005), e serem cultivadas em meio líquido para obtenção de suspensões celulares (MONTEIRO et al., 2011), as quais podem ser importantes para induzir a mutação e um grande número de mutantes promissores podem ser propagados muito rapidamente por essa via.

Os tratamentos mutagênicos em meristemas multicelulares de plantas propagadas vegetativamente, geralmente resultam na formação de plantas quiméricas ou falsos mutantes (ADAMES et al., 1999). Uma das alternativas para corrigir tal problema seria a indução de mutação em calos embriogênicos e suspensões celulares uma vez que o novo indivíduo regenerado resulta de uma única célula (NEWMANN et al., 2009), ou seja, aquela que sofreu mutação.

Na cultura de calos embriogênicos é possível obter embriões somáticos e suspensões celulares, cujas culturas têm permitido regenerar plantas em grandes quantidades e com baixo custo de produção (MORAIS-LINO et al., 2008). Logo, com a aplicação da radiação gama nessas culturas pode-se induzir mutações, num período de tempo mais curto, e produzir um número expressivo de clones regenerados idênticos. Assim, a indução de mutação por meio da radiação gama em calos embriogênicos e suspensões celulares podem constituir instrumentos de grande utilidade para a obtenção de mutantes com características agronômicas desejáveis.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para mutagênese com o uso de radiação gama em calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira e, por meio dessa técnica,

seja possível estabelecer um protocolo eficiente para uso no melhoramento de bananeira.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Núcleo de Biotecnologia Avançada (NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA e as irradiações realizadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), em Piracicaba, SP.

### **Material vegetal e indução de embriogênese somática**

Inflorescências masculinas imaturas das bananeiras 'Tropical' (AAAB) e 'Terra Maranhão' (AAB), foram coletadas e reduzidas para um tamanho de 10 cm de comprimento e posteriormente, lavadas em solução de água e detergente. Em condições assépticas, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, as inflorescências foram borrifadas com álcool 70% e flambadas duas vezes, as flores imaturas foram removidas e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura constituído de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 3% de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolilacético (AIA), 4,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA), 100 mg L<sup>-1</sup> de glutamina (MORAIS-LINO et al., 2008), com pH ajustado para 5,8 e autoclavagem durante 20 minutos a 121°C. As culturas foram mantidas em sala escura, com temperatura de 27 ± 1° C, até a formação de calos embriogênicos.

Os calos embriogênicos formados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura semissólido constituído de sais e vitaminas do MS, suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 0,219 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 8 g L<sup>-1</sup> de agarose e pH ajustado para 5.8. As culturas foram mantidas em sala escura com temperatura de 27 ± 1° C. Foram realizadas observações semanais nesses calos para verificar a formação de embriões somáticos.

### **Estabelecimento de suspensão celular**

Para o estabelecimento de suspensões celulares, embriões somáticos de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão' foram transferidos para erlenmeyers contendo meio de cultura líquido constituído de sais e vitaminas do MS, suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D,  $0,219 \text{ mg L}^{-1}$  de zeatina,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico, e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose de acordo com o protocolo sugerido por MORAIS-LINO et al. (2008), e então mantidos no escuro a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação de 120 rpm, subcultivados a cada dez dias.

### **Irradiação gama em culturas embriogênicas de bananeira**

Culturas embriogênicas (calos e suspensões celulares) foram distribuídas, separadamente, em membrana de nylon em placa de Petri sobre o meio básico MS suplementado com  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, solidificado com  $8 \text{ g L}^{-1}$  de agarose e pH ajustado para 5.8.

O trabalho foi realizado em duas etapas para determinação da radiosensibilidade. Placas de Petri contendo amostras de 20 mg/membrana de calos embriogênicos de bananeira 'Tropical' (Experimento 1) foram enviadas para irradiação em fonte de Cobalto<sup>60</sup> no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP). Foram administradas as doses de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0 e 22,5 Gy a uma taxa de  $0,332 \text{ kGy h}^{-1}$ .

No Experimento 2 foram utilizados, calos embriogênicos (20 mg/membrana) e suspensões celulares ( $100 \text{ } \mu\text{L/membrana}$ ) de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão'. Foram usadas radiação gama de 0,0; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180 e 200 Gy, a uma taxa de  $0,332 \text{ kGy h}^{-1}$ .

Após exposição à radiação gama, os calos embriogênicos e as suspensões celulares (irradiados e testemunhas) foram reenviados para Cruz das Almas, BA. As placas contendo os materiais irradiados permaneceram no mesmo meio de cultura por uma semana, no escuro. Após este período, as membranas de cada tratamento foram transferidas para o meio de regeneração constituído de sais e vitaminas do meio MS, acrescido de  $0,45 \text{ mg L}^{-1}$  de benzilaminopurina (BAP) e  $0,35 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e mantidos em sala de crescimento sob iluminação com fotoperíodo de 16

h e densidade de fluxo de fóton ( $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Decorridos 60 dias da irradiação e permanência no meio de regeneração, as avaliações do material irradiado do primeiro experimento consistiram na mensuração do número de embriões germinados, número médio de raízes, comprimento médio de plantas e o índice de sobrevivência. O material irradiado do segundo experimento foi avaliado quanto ao número de embriões germinados e o índice de sobrevivência.

Para a verificação da sobrevivência utilizou-se o cálculo do índice de sobrevivência:

$$S\% = \frac{N - n}{N} \times 100$$

Onde, S%: Índice de sobrevivência; N: número de embriões somáticos germinados; n: número de embriões somáticos não germinados.

### **Delineamento estatístico**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez tratamentos e dez repetições para o experimento 1, com duas testemunhas, constituídas pelas placas que foram mantidas no laboratório em Cruz das Almas, e as que foram enviadas ao Cena, mas não foram irradiadas.

No experimento 2, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com doze tratamentos em dez repetições, em arranjo fatorial  $2 \times 2 \times 12$  (cultivar x tipo de material vegetal x dose de radiação gama), e usadas as mesmas testemunhas do Experimento 1.

As médias foram submetidas à análise de variância pelo teste F (5% de probabilidade) e regressão, com transformação dos dados quantitativos para  $\sqrt{x+0,5}$  e analisados através do programa estatístico SISVAR, (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1

Os resultados obtidos para determinação da radiosensibilidade de calos embriogênicos demonstraram que, apenas algumas doses causaram reduções significativas ( $p < 0,05$ ) na germinação *in vitro* dos embriões somáticos, no índice de sobrevivência, número de raízes e comprimento de plantas regeneradas da bananeira 'Tropical' (Tabela 1 e 2).

**TABELA 1.** Número de embriões somáticos germinados e índice de sobrevivência obtidos nos diferentes tratamentos com doses de radiação gama em calos embriogênicos de bananeira 'Tropical' aos 60 dias após radiação. Cruz das Almas, BA, 2015.

Radiação gama (Gy)	Embriões somáticos germinados	Índice de sobrevivência (%)
0,0	6340	99,7
2,5	4186	66,0
5,0	4640	73,2
7,5	4796	75,6
10,0	4564	72,0
12,5	3448	54,4
15,0	3751	59,2
17,5	8819	99,1
20,0	2508	39,6
22,5	3448	54,4

Para a germinação *in vitro* de embriões somáticos, observou-se redução no número de embriões germinados com aumento da dose de radiação gama, Apesar disso, esse efeito não foi contínuo para todas as doses de radiação gama, haja vista que, a radiação de 17,5 Gy apresentou o maior número de embriões (8819 embriões germinados), superando as testemunhas (6340 embriões germinados) (Tabela 1). De modo geral, a exposição à radiação gama nas doses de 2,5 a 17,5 Gy não influenciou expressivamente a germinação *in vitro* dos embriões somáticos. Por outro lado, a aplicação de 20 Gy provocou reduções acentuadas na germinação *in vitro* dos embriões somáticos (2508) em relação ao controle (6340). Assim, verifica-se que os

resultados de germinação *in vitro* não foram proporcionais às intensidades de radiação.

Quanto ao índice de sobrevivência, observa-se uma redução na sobrevivência de embriões somáticos, em função do aumento da dose de radiação gama, quando comparado com o controle. O menor índice foi verificado na utilização da dose 20 Gy com taxa de 39,6 %. As doses mais baixas de 5,0, 7,5 e 10 Gy apresentaram valores próximos e semelhantes de sobrevivência de 73,2, 75,6, e 72 %, respectivamente.

A dose de 17,5 Gy apresentou índice de sobrevivência de 99,1 %, sendo considerada, portanto, de pouco efeito nessa característica, cujo valor é próximo ao da testemunha que apresentou 99,7 %. A sobrevivência obtida na dose 12,5 Gy foi a mesma observada com a radiação de 22,5 Gy, ou seja, de 3448 embriões germinados. Possivelmente, os efeitos da redução do índice de sobrevivência, nesses dois casos decorreram da ação de outros fatores, como a ocorrência de uma desaceleração dos estádios de desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos. Ademais, o baixo poder germinativo efetivamente causado pela exposição às doses mais elevadas de radiação gama (22,5 Gy), pode não manifestar efeitos deletérios aos 60 dias após a irradiação. Logo, poderiam atingir maiores danos fisiológicos e decréscimos na germinação após um maior período de tempo. Apesar disto, é possível observar que houve alta redução de sobrevivência quando utilizada a dose elevada de 20 Gy.

De uma forma geral os efeitos da radiação foram aleatórios para as diferentes intensidades de radiação, provavelmente devido às baixas taxas de raio gama usadas (2,5 a 22,5 Gy), que para ápices caulinares de tetraploide foi recomendada 35-40 Gy (NOVAK et al., 1990). No entanto, quando se avalia doses mais elevadas de radiação gama (0 a 60 Gy) foi verificado um decréscimo de sobrevivência com aumento das doses de radiação gama em ápices caulinares de bananeira 'Terra Maranhão' (PESTANA et al., 2010; REIS et al., 2015).

Em todas as doses de radiação gama houve uma redução estatisticamente significativa quanto à emissão de raízes em relação ao tratamento controle. Na Tabela 2, nota-se que as plantas obtidas da germinação *in vitro* dos embriões somáticos, obtidos de calos embriogênicos

irradiados com 0 e 2,5 Gy apresentaram médias respectivas de 10,30 e 13,65 de raízes, embora não tenham sido diferentes entre si, foram estatisticamente superiores às demais doses de radiação.

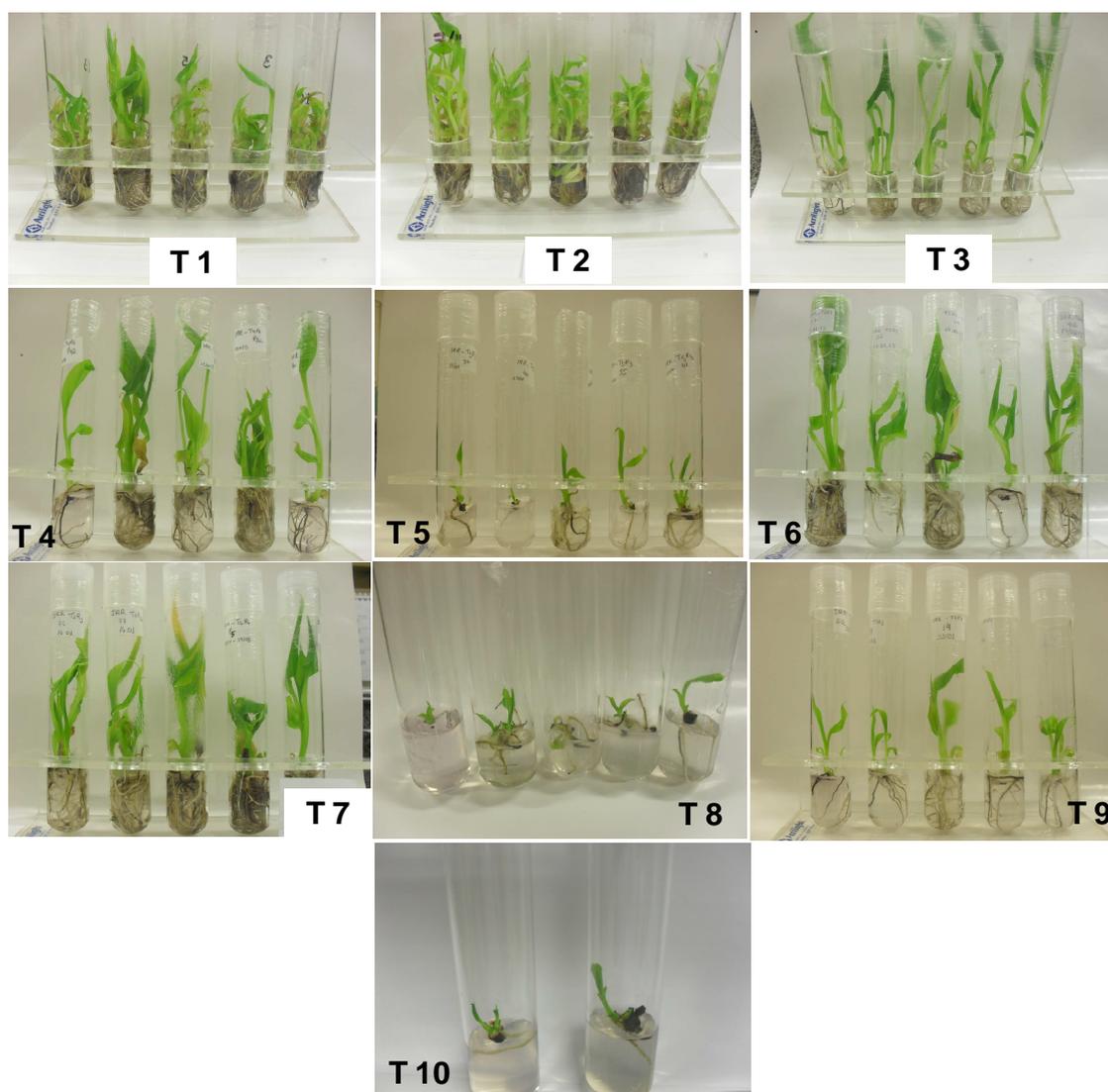
**TABELA 2.** Número de raízes e comprimento médio de plantas de bananeira 'Tropical', obtido a partir da exposição de calos embriogênicos *in vitro* à radiação gama, após 60 dias em sala de crescimento. Cruz das Almas, BA, 2015<sup>1</sup>.

<b>Radiação gama (Gy)</b>	<b>Número de raízes</b>	<b>Comprimento de plantas (cm)</b>
<b>0,0</b>	10,30 a	8,26 a
<b>2,5</b>	13,65 a	8,29 a
<b>5,0</b>	8,50 bc	4,67 a
<b>7,5</b>	9,55 bc	6,91 a
<b>10,0</b>	7,90 bc	3,46 a
<b>12,5</b>	9,15 bc	7,00 a
<b>15,0</b>	8,70 bc	5,98 a
<b>17,5</b>	4,80 c	4,50 a
<b>20,0</b>	3,70 c	3,01 a
<b>22,5</b>	5,70 c	3,26 a

\* <sup>1</sup>Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Para o comprimento de plantas regeneradas, cuja variação foi 8,29 a 3,01 cm, respectivamente para dose 2,5 Gy e 20 Gy, verificou-se que não houve diferenças significativas, apesar de ser observada a redução no comprimento das plantas em todos os tratamentos utilizados, à exceção das doses 2,5 e 12,5 Gy (Tabela 2). Esta redução no comprimento das plantas foi também observada em ápices caulinares bananeira irradiada com raios gama. (HIRIMBUREGAMA et al., 2004; BERMÚDEZ et al., 2002; RESENDE, 2005; PESTANA et al., 2010; REIS et al., 2015).

Observou-se que as plantas regeneradas apresentaram alturas e número de raízes semelhantes, mas apresentam diferenças quanto ao vigor (Figura 1).



**FIGURA 1** Plantas regeneradas de embriões somáticos de bananeira Tropical' após tratamento com diferentes doses de radiação gama (T1 :0,0; T2 : 2,5; T3 : 5,0; T4 : 7,5; T5 : 10,0; T6 : 12,5; T7 : 15,0; T8 : 17,5; T9 : 20,0 e T10 : 22,5 Gy) em condições *in vitro*, mantidas na sala de crescimento. Cruz das Almas, BA, 2015.

## Experimento 2

Verificou-se efeito significativo das doses de radiação gama, e das cultivares de bananeira estudadas ('Tropical' e 'Terra Maranhão'), e observou-se, ainda, que não houve significância para o tipo de material vegetal (calos embriogênicos e suspensões celulares) ( $p > 0,05$ ). Dessa forma, calos embriogênicos e suspensões celulares de cultivares de bananeira ao serem irradiados apresentam respostas que dependem do genótipo, como ocorrem

em gemas apicais e ápices caulinares submetidas à irradiação (RESENDE, 2005; PESTANA et al., 2010).

Notou-se que nas cultivares, as equações significativas atribuíveis à dose para o agente mutagênico raio gama foram do tipo quadrática, indicando que, dentro do intervalo estudado (0 a 200 Gy), a germinação *in vitro* de embriões somáticos dos calos embriogênicos e suspensões celulares decresceu de forma quadrática com o aumento da dose de radiação gama.

De maneira geral, calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira 'Terra Maranhão' tiveram maior sensibilidade às doses do mutagênico quando comparados aos calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira 'Tropical', pois as médias observadas de embriões somáticos provenientes dos calos embriogênicos foram maiores (Tabela 3). Logo, pode-se inferir que, para uma mesma dose de mutagênico, a redução da germinação *in vitro* dependeu da cultivar.

Ademais, altas doses de radiação gama produzem efeitos deletérios e influenciam de forma negativa no crescimento causando danos genéticos conforme relatado por Watanabe et al. (2000) e Reis et al. (2015) em bananeira. A radiação gama interfere nos processos de divisão celular culminando em crescimento alterado e variabilidade morfológica (AMJAD & AMJUN, 2007). Nesse sentido, as doses elevadas podem gerar alta frequência de mutações, mas levam a baixas taxas de regeneração de culturas *in vitro*. Segundo Lu et al. (2007), o nível crítico da radiação gama nos quais mutações são induzidas devem estar dentro da tolerância para a regeneração de brotos, como observado para a germinação *in vitro* de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos e suspensões celulares da cultivares.

As doses de mutagênico mais comumente utilizadas para propágulos *in vitro* de banana variam muito principalmente em função do explante utilizado. Como exemplos podem ser citados o uso de 20 e 30 Gy de raios gama para irradiação ápices caulinares de bananeira 'Terra Maranhão' (PESTANA et al., 2010), 38 Gy para ápices caulinares da cultivar Pisang Berangan (AAA)(CHAI et al., 2004), e 20 Gy para gemas *in vitro* de 'Terra Maranhão' (REIS et al., 2015).

Em face aos resultados obtidos (Tabela 3), verifica-se que as doses aplicadas de 10 e 20 Gy em calos embriogênicos da cultivar Terra Maranhão e 10 Gy para calos embriogênicos e suspensões celulares da cultivar Tropical não provocaram um efeito deletério significativo.

**TABELA 3** Número de embriões germinados *in vitro* obtidos a partir da irradiação gama com diferentes intensidades em calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC) de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão', aos 60 dias após radiação, em sala de crescimento. Cruz das Almas, BA, 2015.

Cultivar	Radiação gama (Gy)	Germinação de embriões <i>in vitro</i> <sup>1</sup>		
		CE	SC	Equações de regressão
Terra Maranhão	0,0	299,70a	521,1a	CE $y = 0,0118x^2 - 3,6745x + 280,43$ $R^2 = 0,9601$
	10	243,20a	750,9a	
	20	226,40a	115,9b	
	40	110,60a	97,1b	
	60	82,40b	41,5b	
	80	82,40b	175,1b	
	100	7,10c	0c	SC $y = 0,0286x^2 - 7,9946x + 514,66$ $R^2 = 0,6723$
	120	33,60c	0c	
	140	12,00a	0c	
	160	7,60c	3,2c	
	180	2,70c	2c	
	200	0,20c	0c	
Tropical	0,0	1529,1a	988,30a	CE $y = 0,07177x^2 - 18,7035x + 106,22$ $R^2 = 0,6670$
	10	1160,2a	1019,8a	
	20	35,9c	57,2b	
	40	97,5b	48,3b	
	60	107,7b	20,5b	
	80	45,8c	0c	
	100	15,7c	0c	SC $y = 0,0552x^2 - 14,239x + 786,14$ $R^2 = 0,6762$
	120	3,6c	0c	
	140	8,1c	0a	
	160	5,7c	0c	
	180	0c	0c	
	200	0c	0c	

<sup>1</sup>Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ).

Comparando os tipos de materiais vegetais analisados, para a cultivar Terra Maranhão (Tabela 3), pode-se observar que suspensões celulares apresentam diferenças significativas e maior sensibilidade aos raios gama em relação aos calos embriogênicos. A germinação *in vitro* de embriões somáticos via suspensões celulares apresentou menores valores médios nas doses de 20, 40 e 60 Gy, respectivamente. Essas doses são consideradas efetivas para determinação da dose letal  $DL_{50}$ , e ao mesmo tempo vantajosa, uma vez que indução de mutagênese *in vitro* a partir de suspensões celulares eliminaria a dependência das sucessivas repicagens e as chances de ocorrência da mutação individual seria ampliada, tendo vista que cada célula pode gerar um indivíduo que sofreu mutação.

Em relação aos calos embriogênicos, também foram registrados os menores valores médios de embriões germinados para estas mesmas doses do mutagênico. Ademais, pôde-se observar que a aplicação das doses mais elevadas de 100 a 200 Gy não apresentaram diferenças significativas para os dois tipos de materiais vegetais, e, portanto, ocasionaram danos fisiológicos severos e, conseqüentemente, uma alta letalidade, o que pode inviabilizar a utilização das mutações.

Para a 'Tropical', as médias de germinação *in vitro* de embriões somáticos, via calos embriogênicos de 107,7 e 45,8 foram maiores nas doses 60 e 80 Gy, respectivamente. Em relação às suspensões celulares, foram registradas médias de 20,5 e também ausência de germinação para as mesmas doses do mutagênico. As doses mais elevadas de 120 a 200 Gy levaram a grandes reduções na germinação *in vitro* e a efeitos deletérios, logo, não diferiram estatisticamente entre calos embriogênicos e suspensões celulares (Tabela 3).

As análises mostraram que o índice de sobrevivência, a partir da irradiação em calos embriogênicos de 'Terra Maranhão' com doses mais baixas de raios gama de 10, 20 e 40 Gy, apresentaram taxas de 85,49, 66,54 e 92,79 %. Enquanto para suspensões celulares, constataram taxas de sobrevivência de 99,98, 36,32 e 21,20 % para as mesmas doses respectivamente (Tabela 4).

**TABELA 4** Índice de sobrevivência (%) de embriões somáticos de bananeira ‘Terra Maranhão’ e ‘Tropical’ obtidos de calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC) irradiados *in vitro*, com diferentes doses de raio gama, após 60 dias em sala de crescimento. Cruz das Almas, BA, 2015.

Radiação gama (Gy)	Índice de sobrevivência (%)			
	Terra Maranhão		Tropical	
	CE	SC	CE	SC
0,0	98,88	99,87	97,38	97,69
10	85,49	99,98	73,55	96,22
20	66,54	36,32	74,49	69,08
40	92,79	21,20	66,20	56,11
60	51,39	11,19	50,11	1,42
80	55,22	56,49	53,16	0,00
100	3,38	0,00	52,20	0,00
120	14,60	0,00	0,49	0,00
140	4,56	0,00	19,33	0,00
160	2,01	0,37	0,37	0,00
180	0,20	0,00	0,00	0,00
200	0,18	0,00	0,00	0,00

Para a cultivar Tropical, foram registradas taxas de 73,55, 74,49 e 66,20% de sobrevivência de embriões somáticos, via calos embriogênicos, para as doses mais baixas. Já nas suspensões celulares foram registrados os índices de sobrevivência de 96,22, 69,08 e 56,11 % nas doses de 10, 20 e 40 Gy, respectivamente.

Para ‘Terra Maranhão’, as doses intermediárias de 60, 80 e 100 Gy, obtiveram-se índices de 51,39, 55,22 e 3,38 % em calos embriogênicos e de 11,19, 56,49 e 0,0 % para suspensões celulares (Tabela 4). Na cultivar Tropical, foram obtidos para essas mesmas doses intermediárias, índices de 50,11, 53,16 e 52,20 % provenientes da irradiação de calos embriogênicos, e apenas 1,42 % na dose de 60 Gy em suspensões celulares. Índices de 50 % de sobrevivência são promissores e esperados para determinação da dose letal  $DL_{50}$ , assim, calos embriogênicos também pode ser uma fonte alternativa eficiente para obtenção rápida de uma população mutante induzida por radiação gama. A partir da dose de 80 Gy foram verificados efeitos severos de

letalidade, não sendo constatada sobrevivência via irradiação de suspensões celulares.

Segundo Kulkarni et al. (1997), em *Musa* spp., as doses de 50 Gy raramente induziram multiplicação de brotos. Assim, nesse estudo, as doses consideradas altas (120 a 200 Gy) afetaram negativamente a sobrevivência dos calos embriogênicos e suspensões celulares de ambas as cultivares.

De maneira geral, a determinação da radiosensibilidade a radiação gama para calos embriogênicos de bananeira 'Terra Maranhão' foi verificada entre 60 e 80 Gy com reduções mais próximas a 50% para sobrevivência, enquanto para suspensão celular foi de 80 Gy. Para a 'Tropical' a radiosensibilidade de radiação gama foi detectada entre as doses de 60, 80 e 100 Gy para calos embriogênicos, e para irradiação de SC foi possível identificar a radiosensibilidade com a dose de 40 Gy, indicada como a mais promissora para pesquisas de determinação da  $DL_{50}$ .

Embora não tenha sido determinada a dose letal  $LD_{50}$ , adaptou-se uma metodologia para trabalhos de radiação gama em calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira. A indução de mutação a partir dessas culturas embriogênicas é de grande relevância para o melhoramento de bananeira, pois, o estado de desenvolvimento das células é relativamente uniforme, além de ser uma técnica eficiente de multiplicação rápida de produção de uma população mutante induzidos por raios gama.

## CONCLUSÕES

Em bananeira, as suspensões celulares são mais sensíveis que os calos embriogênicos á alta radiações, e doses raios gama acima de 100 Gy causam redução no número de embriões germinados, raízes e no comprimento de plantas.

Efeitos deletérios e reduções na sobrevivência de calos embriogênicos e/ou suspensões celulares de bananeira tem sido demonstrado com uso de doses de 120 a 200 Gy.

A eficiência dessa metodologia de radiação de calos embriogênicos e suspensões celulares abrem perspectivas para uso de mutagênese no melhoramento de bananeira em pesquisas de determinação da dose letal LD<sub>50</sub>.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERETO-ESCOFFIÉ, P.O.M. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. Grand Nain scalps by vacuum infiltration. **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 359–371, 2005.

ADAMES, A.H.; LATADO, R.R.; CAMARGO, N.M.; TULMANN NETO, A. Posição da gema axilar e a indução de mutação em mudas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 939-945, 1999.

AMJAD, M.; ANJUM, M. A. Effect of post-irradiation ageing on onion seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.29, p.63–69, 2007.

BECKER, D.K.; DUGDALE, B.; SMITH, M.K.; HARDING, R.M.; DALE, J.L. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv Grand Nain via microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports** v. 19, p. 229–234, 2000.

BERMUDEZ-CARABALLOSO, I.; GARCÍA, L.R.; VEITÍA, N.; TORRES, D.; ADRÓN, Y.; ROMERO, C.; ORELLANA, P. Mutant plantains (*Musa* spp.) with height reduction obtained by *in vitro* mutagenesis. **Euphytica**, v. 176, p. 105-12, 2010.

BERMÚDEZ, I.; HERRERA, I.; ORELLANA, N.; VEITIA, N.; ROMERO, C.; CLAVELO, J.; GARCIA, L.; ACOSTA, M.; GARCIA, L.R.; PADRÓN, Y. Study of experimentally-induced variants of 'Manzano' (AAB) and 'Gros Michel' (AAA)

bananas for their potencial resistance to *Fusarium* wilt. **Infomusa**, Montpellier, v.11, n.2, p. 7-8, 2002.

CHAI, M.; HO, Y.W.; LIEW, K.W.; ASIF, J.M. Biotechnology and *in vitro* mutagenesis for banana improvement. In: JAIN, S.M.; SWENNEN, R. (Ed.). Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Enfield: **Science Publishers**, p. 59-77, 2004.

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

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production**. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

HIRIMBUREGAMA, W.K.; DIAS, W.K.G.; HIRIMBUREGAMA, K. Banana improvement through gamma irradiation and testing for banana bract mosaic virus in Sri Lanka. In: JAIN, S.M.; SWENNEN, R. (Ed.). Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Enfield: **Science Publishers**, p. 79-85, 2004.

KHANNA, H.; BECKER, D.; KLEIDON, J.; DALE, J. Centrifugation assisted *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (CAAT) of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady finger AAB). **Molecular Breeding**, v. 14, p. 239-252, 2004.

KULKARNI, V.M. et al. Effect of gamma irradiation on in vitro multiple shoot cultures of banana (*Musa* species). **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v. 26, p. 232–240, 1997.

LU, G. et al. Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 88, p. 319–327, 2007.

MATSUMOTO, K.; MORAIS, L.S.; VIANA, G.R.; ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. Genetic transformation of banana embriogenic cells through particle bombardment using a herbicide resistance gene as selectable marker. **Acta Horticulturae**, v. 575, p. 61-67, 2002.

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

MONTEIRO, T.R. et al. Diluição celular, características do meio de cultura e biorreatores de imersão temporária na diferenciação e regeneração de células em suspensão de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, E. p. 213-221, 2011.

NEWMANN, K.H.; IMANI, J.; KUNTAR, A. **Plant cell and tissue culture – A tool in biotechnology** – Basics and application. Berlin: Springer-Verlag, 333p., 2009.

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**, London, v. 67, n. 1, p. 21-28, 1990.

PESTANA, R.K.N.; AMORIM, E.P.; SILVA, S.O.; TULMAM NETO, A. Irradiação gama para mutagênese *in vitro* em bananeira 'Terra Maranhão'. **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1328-1330, Nov. 2010. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010001100015>>

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

REIS, R.V.; AMORIM, E.P.; LEDO, C.A.S.; PESTANA, R.K.N.; GONÇALVES, Z.S.; BORÉM, A. Selection of putative Terra Maranhão plantain cultivar mutants obtained by gamma radiation. **Genetics and Molecular Research**, v. 14 n. 2, p. 4687-4695, 2015.

RESENDE, J.C.F. **Melhoramento da bananeira (*Musa spp.*) utilizando indução de mutação com raios gama e variação somaclonal para redução da altura de plantas**. 2005. 155f. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

WATANABE, Y. et al. Radiation effects on growth and seed germination of *Arabidopsis*. Annual Report 1999–2000. **National Institute of Radiological Sciences**, Anagawa, Chiba-shi, Japan, 2000.

## **CAPÍTULO III**

**Sobrevivência de calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão' ao etil metano sulfonato (EMS)<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Revista Brasileira de Fruticultura.

## **Sobrevivência de calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão' ao etil metano sulfonato (EMS)**

**Autor: Cleilton Vasconcelos Moreira**

**Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva**

**RESUMO:** Muitas cultivares de bananeira são estéreis, o que dificulta o melhoramento genético por hibridação. A mutação tem sido usada em substituição ao sistema convencional no melhoramento dessa cultura. Este trabalho objetivou adaptar a metodologia de indução de mutagênese *in vitro*, via etil metano sulfonato (EMS) em bananeira. Calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC) de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão' foram expostos a diferentes concentrações de EMS (0,025 a 2% v/v). Os tratamentos foram distribuídos em esquema fatorial 2x7x2x2 (cultivar x concentração de EMS x tempo de imersão x tipo de material vegetal), em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. Os resultados apontaram valores decrescentes no número de plantas regeneradas e no índice de sobrevivência com aumento das concentrações do mutagênico. As cultivares estudadas exibiram diferenças significativas na regeneração de plantas quando submetidas ao tratamento com mutagênico EMS nas diferentes concentrações e tempos de imersão. De modo geral, os calos embriogênicos da cultivar Terra Maranhão são mais sensíveis que calos embriogênicos da cultivar Tropical aos efeitos do mutagênico EMS. Os calos embriogênicos da cultivar Terra Maranhão exibiram baixos índices de sobrevivência, muito inferiores ao esperado de 50 %, quando comparado ao controle. Enquanto os CE de bananeira 'Tropical', submetidos ao EMS nas concentrações 0,05 e 0,1 % (v/v) no tempo de imersão de uma hora mostraram índice de sobrevivência de 54,27 e 52,26 %, respectivamente, considerados efetivos para indução de mutagênese *in vitro*. Todavia, quando se utilizou suspensões celulares da cultivar Tropical, observou-se maior sensibilidade ao EMS comparada à SC da cultivar Terra Maranhão. Logo, em SC de bananeira 'Terra Maranhão', a concentração de 0,1 % (v/v) do EMS no tempo de imersão de uma e duas horas, reduziu a sobrevivência em 47,34 e 56,38 %, respectivamente, em relação ao controle, sendo estes tratamentos sugeridos para SC dessa cultivar, por garantir índices de sobrevivência promissores para estudos de determinação da DL<sub>50</sub>. Nestas mesmas condições, o EMS causa letalidade e reduz índices de sobrevivência nas suspensões celulares da cultivar Tropical. Este estudo mostra uma metodologia eficiente e rápida de aplicação de mutagênese *in vitro* via EMS com possibilidade de propagação de mutantes promissores.

**Palavras-chave:** *Musa spp*, indução de mutação, culturas embriogênicas.

**Survival of embryogenic callus and cell suspensions of banana 'Tropical' and 'Terra Maranhão' to the Ethyl methane sulfonate (EMS)**

**Author: Cleilton Vasconcelos Moreira**

**Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva**

**ABSTRACT:** Many banana cultivars are sterile which makes the genetic improvement by hybridization. The mutation has been used to replace the conventional system in the improvement of this culture. This study aimed to adapt the in vitro mutagenesis inducing method by using ethyl methane sulfonate (EMS) in banana. Embryogenic callus (EC) and cell suspensions (SC) of banana 'Tropical' and 'Terra Maranhão' were exposed to different EMS concentrations (0.025 to 2% v/v). The treatments were distributed into factorial 2x7x2x2 (cultivar x EMS concentration x immersion time x type of plant material), in completely randomized design with six replications. The results showed decreasing values in the number of regenerated plants and the survival rate with an increase of the mutagenic concentrations. The cultivars showed significant differences in the regeneration of plants when subjected to treatment with chemical mutagenic within the range studied. Overall, the embryogenic callus of the cv. Terra Maranhão are more sensitive than embryogenic callus of cv. Tropical to the effects of EMS mutagen. The embryogenic callus of the cv. Terra Maranhão showed low rates of survival, lower than the expected 50%, when compared to the control. While the EC banana 'Tropical', EMS at 0.05 and 0.1% (v/v) concentrations in the immersion time of one hour showed survival rate of 54.27 and 52.26% respectively, which are considered effective for the in vitro mutagenesis induce. However, cell suspensions of banana 'Tropical' displayed greater sensitive to the EMS compared to SC cv. Terra Maranhão. Therefore, in SC banana cv. Terra Maranhão, the EMS concentration of 0.1% (v/v) at the immersion time of one to two hours, reduced survival in 47.34 and 56.38% respectively, compared to the control, which makes these treatments being suggested for this cultivar SC for ensuring promising survival rates for studies to determine the LD<sub>50</sub>. Under the same conditions, the EMS causes mortality and reduced survival rates in cell suspensions of the cv. Tropical. This study shows a rapid and efficient methodology for in vitro mutagenesis via EMS application with the possibility of the propagation of promising mutants.

**Keywords:** *Musa spp*, mutation induction, embryogenic cultures.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Musa*, abrange bananas e plátanos, representa a quarta cultura alimentar mais importante em alguns dos países menos desenvolvidos do mundo. O Brasil é o quinto produtor mundial de banana, com produção de 6,9 milhões de toneladas em uma área de 481.116 ha (FAO 2015).

As plantações consistem em plantas clonadas que são geneticamente idênticas e uniformes, o que torna a cultura particularmente suscetível a fungos patogênicos que causam doenças como o as sigatokas amarela e negra e o mal-do-Panamá, que impedem a obtenção de altos rendimentos na cadeia produtiva da banana. Isso levou à especulação de que a produção de banana em todo o mundo deixaria de ser sustentável no futuro próximo, ameaçando a estabilidade econômica e da segurança alimentar nos países em desenvolvimento de regiões tropicais e subtropicais (HESLOP-HARRISON e SCHWARZACHER, 2007).

As variedades de banana comestíveis tendem a ser triploides e partenocárpicas. Logo, o uso do melhoramento convencional nem sempre é possível, pois, muitos genótipos não produzem pólen e nem sementes (SILVA et al. 2011). Esse cenário associado à suscetibilidade às doenças torna a bananicultura brasileira bastante vulnerável (RODRIGUES, 2010).

A mutagênese *in vitro* é uma ferramenta poderosa para o melhoramento genético de alguns genótipos de bananeira. Com o uso da técnica é possível alterar características agronômicas governadas por um ou pouco genes, em genótipos de grande interesse (PÉREZ PONCE, 1998; JAIL et al., 2011) e contornar os problemas que ameaçam a bananicultura.

A indução de mutação em *Musa* pode proporcionar o aumento de variabilidade genética, permitir a seleção e a propagação de mutantes promissores e genotipicamente homogêneos (JAIL et al., 2011), mediante o uso de mutagênicos químicos. Nesse sentido, o etil metano sulfonato (EMS) tem sido relatado como mutagênico efetivo para indução de mutagênese em bananeira (BIDABADI et al., 2011; JANKOWICZ-CIESLAK et al., 2012; BIDABADI et al., 2012; CHEN et al., 2013).

O método descrito aqui têm potenciais aplicações práticas e inovadoras, em que uma população mutante pode ser produzida rapidamente, e revela-se

altamente vantajoso, uma vez que a indução de mutação *in vitro* via aplicação de EMS ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$ ) como mutagênico em culturas embriogênicas (calos embriogênicos e suspensões celulares) dispensaria a dependência das sucessivas repicagens para ampliar aquela região que sofreu mutação (NEWMANN et al., 2009), e reduziria o tempo até que os alelos desejados sejam recuperados, como ocorrem na indução de mutação a partir de ápices caulinares, gemas e tecidos meristemáticos de bananeira.

Dessa forma, com indução de mutagênese *in vitro*, via etil metano sulfonato em calos embriogênicos e suspensões celulares o quimerismo pode ser eficientemente corrigido, com ganho em tempo e de recursos.

Ressalta-se ainda que são incipientes as informações sobre utilização de calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira para indução de mutação via EMS. Portanto, as abordagens nesse estudo serão úteis para trabalhos de mutagênese química, gerando informações que podem auxiliar os protocolos de propagação de mutantes após a indução de mutação.

Diante do exposto, esse trabalho tem como objetivo adaptar a metodologia de indução de mutagênese *in vitro*, via etil metano sulfonato (EMS) em calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Núcleo de Biotecnologia Avançada (NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – Bahia.

### **Indução de embriogênese somática**

Inflorescências masculinas imaturas das bananeiras ‘Tropical’ (AAAB) e ‘Terra Maranhão’ (AAB), foram coletadas e reduzidas para um tamanho de 10 cm de comprimento e posteriormente, lavadas em solução de água e detergente. Em condições assépticas, foram borrifadas com álcool 70% e flambadas duas vezes, em seguida as inflorescências foram removidas e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura constituído de sais e vitaminas do MS, com 3% de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido indolilacético (AIA),  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido naftaleno acético (ANA),

100 mg L<sup>-1</sup> de glutamina (MORAIS-LINO et al., 2008), com pH ajustado para 5,8 e autoclavadas durante 20 minutos a 121 °C. As culturas foram mantidas em sala escura, com temperatura de 27 ± 1 °C, até a formação de calos embriogênicos.

Os calos embriogênicos formados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura semissólido constituído de sais e vitaminas do MS, suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 0,219 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 8 g L<sup>-1</sup> de ágarose e pH ajustado para 5.8. As culturas foram mantidas em sala escura com temperatura de 27 ± 1 °C. Foram realizadas observações semanais nesses calos para verificar a formação de embriões somáticos.

### **Estabelecimento de suspensão celular**

Para o estabelecimento de suspensões celulares, embriões somáticos de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão' foram transferidos para erlenmeyers contendo meio de cultura líquido constituído de sais e vitaminas do MS, suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0,219 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose de acordo com o protocolo sugerido por MORAIS-LINO et al. (2008), e posteriormente, mantidos no escuro a 27 ± 2 °C, sob agitação de 120 rpm, subcultivados a cada dez dias.

### **Aplicação de etil metano sulfonato (EMS)**

Com o emprego de etil metano sulfonato (EMS - CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) como agente mutagênico, em diluições distintas, foram determinados os efeitos de diferentes concentrações do agente mutagênico sobre calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeiras 'Tropical' e 'Terra Maranhão'

Foram coletados 20 mg de peso fresco de calos embriogênicos somáticos e 100 µL/membrana de suspensões celulares, em fase de crescimento ativo, com a densidade ajustada para 33% do volume de células aglomeradas (VCA), das duas cultivares, que foram expostos à solução de EMS nas concentrações 0;0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15 e 0,2 % (v/v), sob agitação de 100 rpm por uma e duas horas. O controle constituiu-se na imersão do material em água estéril.

Após o tratamento com soluções de EMS, procedeu-se a três lavagens em água deionizada. Posteriormente, o conteúdo de calos embriogênicos foi distribuído uniformemente em placas de Petri contendo meio de regeneração.

Para retirar o mutagênico das suspensões celulares, foi descartado excesso do sobrenadante e os agregados celulares foram distribuídas uniformemente em placas de Petri contendo meio de regeneração semissólido, constituído por sais e vitaminas do meio MS, solidificado com 0,7% de Ágar, suplementado com BAP ( $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ ), AIA ( $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e mantidas sob incubação em uma sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , no escuro durante uma semana. A seguir, os calos embriogênicos e as suspensões celulares foram transferidas para uma sala de crescimento com as mesmas condições sob iluminação com fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fóton ( $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Decorridos 60 dias de incubação, realizaram-se as avaliações que consistiram da análise quantitativa do número de plantas regeneradas e o índice de sobrevivência provenientes dos calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC) de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão' dos tratamentos com EMS.

Os parâmetros estudados foram submetidos à análise de regressão para avaliar a sensibilidade de CE e SC das cultivares, por meio da sobrevivência e regeneração *in vitro*, a fim de identificar a concentração ótima de EMS necessária para pesquisas de determinação da dose letal  $DL_{50}$  (dose que causa 50% de letalidade) e fornecer potenciais aplicações práticas do método para uso na indução de mutação e produção rápida de uma população mutante em bananeira.

### **Delineamento estatístico**

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Os tratamentos foram distribuídos em esquema fatorial  $2 \times 7 \times 2 \times 2$  (cultivar x concentração de EMS x tempo de imersão x tipo de material vegetal). As médias foram submetidas à análise de variância pelo teste F (5% de probabilidade) e quando significativas, a regressão polinomial foi aplicada.

Os dados quantitativos foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$ , analisados através do programa estatístico SISVAR, versão 4.3 (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados revelaram que o mutagênico químico EMS (0, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,15 e 0,2% v/v) foi eficiente na alteração da magnitude dos parâmetros avaliados. Observou-se que a análise de variância revelou efeito significativo ( $p < 0,05$ ), apenas para as concentrações (CM) de EMS sobre o número de plantas regeneradas (Tabela 1).

**TABELA 1** Resumo da análise de variância para o número plantas regeneradas de cultivares de bananeira após 60 dias do tratamento com mutagênico EMS. Cruz das Almas, BA, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio
Cultivar (C)	1	1481,14 <sup>ns</sup>
Concentração do mutagênico (CM)	6	34972,04 *
Horas	1	77,78 <sup>ns</sup>
Tipo de material (TM)	1	802,57 <sup>ns</sup>
C * CM	6	854,01 <sup>ns</sup>
C * Horas	1	2064,28 <sup>ns</sup>
C * TM	1	1011,50 <sup>ns</sup>
CM * Horas	6	260,32 <sup>ns</sup>
CM * TM	6	905,11 <sup>ns</sup>
Horas * TM	1	274,57 <sup>ns</sup>
C * CM * Horas * TM	6	791,04 <sup>ns</sup>
Erro	19	668,28
Total	55	-
CV (%)		76,6

GL= Grau de liberdade; CV = Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> = não significativo; \* = significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

As análises de regressões sequenciais com modelo polinomial indicaram significância para o modelo quadrático (Tabela 2). Uma redução significativa foi observada na regeneração *in vitro* das culturas embriogênicas (calos e suspensões celulares) com o aumento da concentração de EMS. Na comparação entre os tipos de materiais genéticos testados, calos

embriogênicos e suspensões celulares de bananeira 'Terra Maranhão' obtiveram-se diferenças no número de plantas regeneradas à medida que se aumentou as concentrações de EMS.

**TABELA 2** Número de plantas regeneradas *in vitro* da cultivar Terra Maranhão obtidos 60 dias após tratamento de etil metano sulfonato em calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC). Cruz das Almas, BA, 2015.

Tempo de imersão (h) e EMS (%)	Número de plantas regeneradas <i>in vitro</i> <sup>1</sup>			Equações de regressão
	CE	SC		
1 hora				
0	164a	249a		
0,025	0c	376a	CE	$y = 8.2976x^2 - 82.488x + 193.29$ $R^2 = 0.578$
0,05	0c	77b		
0,075	0c	0d		
0,1	41b	89b		
0,15	0c	0d		$y = 17.242x^2 - 4918.24x + 348$ $R^2 = 0.7219$
0,2	0c	51c	SC	
2 horas				
0	192a	188a	CE	$y = 14.762x^2 - 134.74x + 283.29$ $R^2 = 0.8722$
0,025	29c	146a		
0,05	0d	19c		
0,075	0d	0d		
0,1	0d	106b		$y = 8.869x^2 - 94.56x + 271.57$ $R^2 = 0.6429$
0,15	0d	0d	SC	
0,2	56b	36c		

<sup>1</sup>Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ).

Quando os calos embriogênicos foram expostos ao EMS na concentração de 0,025 % (v/v), por uma hora, não houve regeneração de plantas, enquanto no tratamento controle foi observada a regeneração de 164 plantas. Os resultados mostraram que não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de 0,05, 0,075, 0,15 e 0,2 % (v/v) para a regeneração de plantas, via calos embriogênicos, quando tratados por uma hora. Essas concentrações levaram ao aumento da letalidade quando o tempo de imersão em EMS foi de duas horas.

Foram observadas diferenças significativas entre a concentração 0,025 % (v/v) e o controle no tempo de imersão de duas horas, entretanto, não

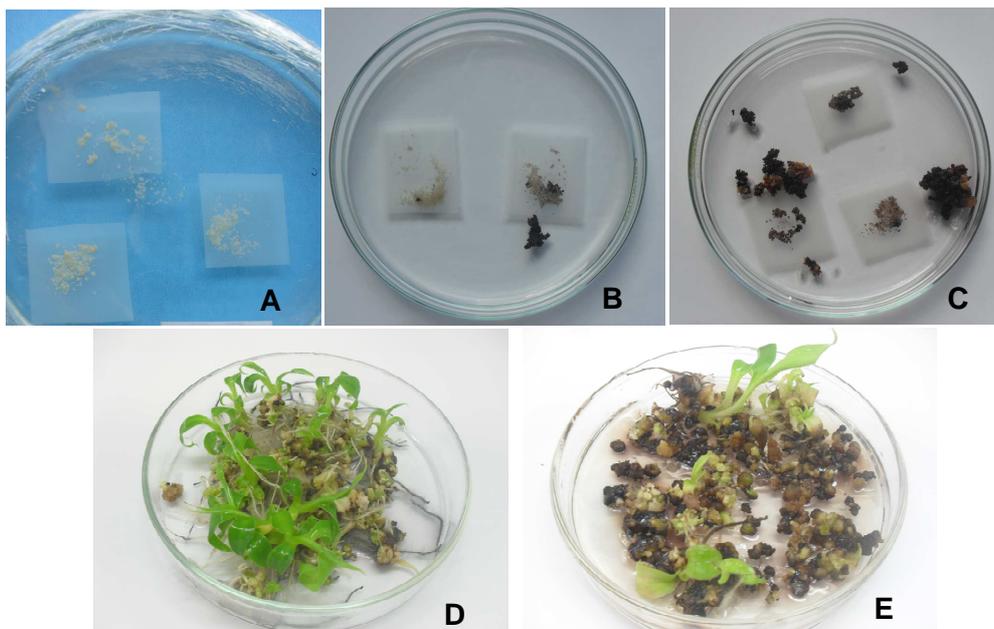
ocorreu regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de 'Terra Maranhão' quando foram submetidos às concentrações de 0,05 a 0,15 % (v/v) de EMS. Nas concentrações maiores 0,1 e 0,2 % (v/v) com imersão de duas horas, a redução da regeneração de plantas pode ser explicada pelo efeito inibitório e letal do EMS nos calos embriogênicos.

Suspensões celulares quando foram imersas em 0,025 % (v/v) de solução EMS não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle e, inclusive, superou o número de plantas dos demais tratamentos com registro de 376 e 188 plantas regeneradas *in vitro* quando tratadas por uma hora e duas horas, respectivamente. No entanto, quando essas suspensões foram tratadas com 0,05 % (v/v) houve redução da regeneração (77 plantas), estatisticamente diferente dos demais tratamentos, exceto da concentração de 0,1 % (v/v) que apresentou 89 plantas regeneradas, quando imersa por uma hora em solução de EMS (Tabela 2).

Efeitos letais com expressiva oxidação dos tecidos em função do aumento das concentrações de EMS foram verificados em suspensões celulares de bananeira 'Terra Maranhão', logo, esse efeito levou a morte celular e a baixa regeneração de plantas, sendo mais frequentes quando foram administrados 0,075, 0,15 e 2,0 % (v/v) por duas horas (Figura 3).

De maneira geral, para a cultivar em questão, os tratamentos controle não diferiram estatisticamente, e levaram a regeneração de 164 e 294 plantas durante uma hora de tratamento dos calos embriogênicos e suspensões celulares, respectivamente. Enquanto em duas horas de imersão foram regeneradas 192 e 188 plantas a partir de calos embriogênicos e suspensões celulares, respectivamente.

Vale ressaltar que, nem todos os tratamentos regeneraram plantas a partir dos calos embriogênicos e suspensões celulares e, um grande número de embriões somáticos não germinados foram considerados dormentes (Figura 3E). Embora esses efeitos de dormência não tenham sido considerados deletérios, esses embriões não alcançaram germinação ou regeneração, mas mostraram um aumento de tamanho e uma coloração esverdeada, mesmo após os 60 dias em meio de regeneração.



**FIGURA 3** Oxidação e efeitos letais em função das concentrações de EMS em suspensões celulares de bananeira ‘Terra Maranhão’. (A) Controle (dia da inoculação), (B) 0,15 % de EMS; (C) 0,2 % de EMS; (D) regeneração de plantas após 60 dias em sala de crescimento (Controle) e (E) presença de embriões esverdeados não germinados.

Bidabadi et al. (2012), evidenciaram efeitos semelhantes de dormência quando submeteram ápices caulinares de bananeira ‘Rastali’ durante 30 min ao tratamento de EMS e registraram a maior percentagem de explantes dormentes em bananeira ‘Berangan Intan’ e ‘Berangan’ com EMS em 250 mM/60 min e 200 mM/30 min, respectivamente.

Conforme relatado por Bidabadi et al. (2012), em ápices caulinares de bananeira, o efeito de dormência mantém vivo, mas retarda as respostas fisiológicas dos explantes, como pode ter ocorrido nos embriões somáticos que permaneceram dormentes após o tratamento com EMS. A ocorrência de embriões somáticos dormentes (embriões esverdeados e não germinados) parece ser resposta dependente de cultivares e das diferentes concentrações e tempo de duração em solução de EMS (BHAGWAT e DUNCAN, 1997; BIDABADI et al., 2012). A ocorrência desses embriões foram mais frequentes nos tratamentos com concentração de 0,2 % (v/v) por uma hora, o que pode estar muito relacionado ao efeito inibitório do EMS.

Por meio da análise de regressão, o modelo que melhor se ajustou à relação número de plantas regeneradas em função das concentrações crescentes do EMS, a partir da imersão dos calos embriogênicos e suspensões celulares por uma e duas horas foi o polinomial quadrático (Tabela 2 e 3).

Os calos embriogênicos de bananeira 'Tropical' (Genoma AAAB) não apresentaram diferença significativa na capacidade de regeneração de plantas para a concentração de 0,025 % (v/v) em relação ao controle (Tabela 3).

**TABELA 3** Número de plantas regeneradas *in vitro* da cultivar Tropical obtido 60 dias após tratamento de etil metano sulfonato em calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC). Cruz das Almas, BA, 2015.

EMS		Número de plantas regeneradas <i>in vitro</i> <sup>1</sup>		
(%) e tempo de imersão		CE	SC	
1 hora				Equações de regressão
0,0	398a	177a		
0,025	348a	8c	CE	$y = 8.6667x^2 - 128.19x + 524.29$ $R^2 = 0.7119$
0,05	216b	0c		
0,075	0d	0c		
0,1	208b	0c		
0,15	122c	0c		
0,2	2d	27b	SC	$y = 12.143x^2 - 113.79x + 242.57$ $R^2 = 0.7837$
2 horas				
0,0	363a	238a	CE	$y = 15.648x^2 - 4608.81x + 326.97$ $R^2 = 0.6923$
0,025	255b	13b		
0,05	14c	0c		
0,075	0d	8c		
0,1	255b	0c		$y = 13.964x^2 - 137.82x + 309.43$ $R^2 = 0.7533$
0,15	0d	0c	SC	
0,2	8d	3c		

<sup>1</sup>Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ).

Foram observadas reduções no número de plantas de bananeira 'Tropical' quando o EMS foi administrado nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,15 % (v/v) por uma hora de tratamento. Essas concentrações são importantes, pois, abrem perspectivas para seu uso em estudos de

determinação da dose letal do EMS para calos embriogênicos. Todavia, na concentração mais alta de 0,2 % (v/v), nos dois tempos de tratamento, as suspensões celulares foram mais sensíveis e exibiram uma média de número de plantas regeneradas significativamente inferior em relação aos tratamentos de calos embriogênicos (Tabela 3).

De maneira análoga a cultivar Terra Maranhão, foi observado um comportamento quadrático da equação de regressão para a 'Tropical'. Assim, não foram observadas diferenças significativas entre o controle e a concentração de 0,025 % (v/v) para o número de plantas regeneradas via calos embriogênicos. Essa concentração é pouco efetiva para reduzir o número de plantas a 50 %, como esperado para estudos de determinação da dose  $DL_{50}$ . Nesse sentido, as concentrações do EMS consideradas eficientes para alcançarem a  $DL_{50}$ , a partir do tratamento em calos embriogênicos, parecem estar próximas de 0,05 e 0,1 % (v/v) com tempo de imersão de uma hora.

Não foi observada significância para o número de plantas regeneradas nos tratamentos com as concentrações de 0,05 a 0,15 % (v/v) quando suspensões celulares foram tratadas com o mutagênico por uma ou duas horas de imersão, sendo verificados, nessas concentrações, registros muito baixos e/ou nenhuma regeneração de plantas.

Na concentração 0,15 % (v/v) do mutagênico, apenas os calos embriogênicos responderam com a regeneração de 122 plantas no tempo de imersão de uma hora, na cultivar em questão. Reduções severas de número de plantas regeneradas e efeitos deletérios foram registradas com aplicação da concentração de 0,2 % (v/v) de EMS. Essa concentração do mutagênico reduziu significativamente em ambos os tempos de tratamento de calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira 'Tropical' (Tabela 3). Nessa concentração foi verificada a regeneração de apenas 27 plantas, obtidas via suspensões celulares na cultivar Tropical, no tratamento de uma hora de imersão, sendo essa a maior média detectada, cuja concentração expressou a grande sensibilidade e o efeito letal do EMS.

As análises mostraram que o índice de sobrevivência, a partir dos tratamentos com EMS, para os calos embriogênicos da cultivar Terra Maranhão proporcionaram variações de 0 a 95,43 %, cuja concentração mais baixa de 0,025 % (v/v) de EMS, apresentou índice de sobrevivência de 0 e

17,57 % quando esses explantes foram imersos por uma e duas horas, respectivamente. Enquanto para suspensões celulares constataram índices de 95,43 e de 77,65 % para a mesma concentração, no tempo de imersão de uma e duas horas, respectivamente (Tabela 4).

Para a 'Tropical', os tratamentos dos calos embriogênicos tratados com 0,025 % (v/v) de EMS foram registrados percentuais de 87,43 % quando a imersão foi por uma hora e 70,24 % de sobrevivência quando as culturas foram imersas por duas horas. Já nas suspensões celulares foram registrados os índices de sobrevivência de 6,83 e 5,46 %, nos tempos de imersão de uma e duas horas, respectivamente (Tabela 4).

**TABELA 4** Índice de sobrevivência (%) de embriões somáticos de bananeira 'Tropical' e 'Terra Maranhão' obtidos de calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (SC) 60 dias após tratamento com etil metano sulfonato. Cruz das Almas, BA, 2015.

EMS (%)	Índice de sobrevivência (%)							
	Cultivar							
	Terra Maranhão				Tropical			
	CE		SC		CE		SC	
	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h
<b>0</b>	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>0,025</b>	0	17,57	95,43	77,65	87,43	70,24	6,83	5,46
<b>0,05</b>	0	0	26,19	10,10	54,27	8,58	0	0
<b>0,075</b>	0	0	0	0	0	0	0	3,36
<b>0,1</b>	25	0	47,34	56,38	52,26	38,94	0	0
<b>0,15</b>	0	0	0	0	30,65	0	0	0
<b>0,20</b>	0	29,16	17,34	12,24	2,04	4,91	23,07	1,26

Os resultados deste estudo mostraram que diferentes concentrações do mutagênico EMS revelaram uma redução gradual na sobrevivência, crescimento e capacidade de regeneração de plantas nas cultivares estudadas quando a concentração e duração da EMS foram aumentadas. Estes

resultados estão de acordo com os relatados em ápices caulinares e gemas meristemáticas de bananeira (BIDABADI et al., 2012; BHAGWAT e DUNCAN, 1997).

Para as concentrações de 0,075, 0,15 e 0,20 % (v/v), não foram detectados percentuais de sobrevivência quando calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira 'Terra Maranhão' foram imersos em solução de EMS nos dois tempos estudados (Tabela 4). Esses efeitos severos e letais também foram verificados na cultivar Tropical, sendo constatada baixa e, em alguns casos, ausência de sobrevivência quando calos embriogênicos e suspensões celulares foram tratados por uma ou duas horas com o mutagênico. Jankowicz-Cieslak et al. (2012) estabeleceram concentrações ótimas para a mutagênese com aplicação EMS em ápices caulinares de banana e verificaram efeito letal com tratamento de 1,5% EMS por 4 horas de incubação.

De maneira geral, os tratamentos controle (água estéril) alcançaram 100 % de sobrevivência (Tabela 4). Os calos embriogênicos e suspensões celulares das cultivares Terra Maranhão (genoma AAB) e Tropical (genoma AAAA) não apresentaram diferença significativa em seu desempenho para a capacidade de regeneração *in vitro* de plantas.

Observou-se que o tratamento das suspensões celulares de 'Terra Maranhão' com 0,1 % (v/v) do mutagênico, imerso por uma e duas horas foi mais efetivo e alcançou os respectivos percentuais de 47,34 e 56,38% de sobrevivência, considerados próximos aos esperados para determinação da  $DL_{50}$ . Nesse sentido, para os calos embriogênicos de 'Tropical' tratados com 0,05 e 0,1 % (v/v) e imersos por uma hora, observou-se significativa eficiência para determinação da  $DL_{50}$ , obtendo-se índices de 54,27 e 52,26 % de sobrevivência, para as respectivas concentrações do EMS. Jankowicz-Cieslak et al. (2012) trataram ápices caulinares de bananeira com EMS a 0,125 % por 24 h e 0,06% por 48 h, e obtiveram variações nas taxas de sobrevivência de 52% e 87% e relataram a eficiência da concentração mesmo com uma diminuição na frequência de brotos regenerados.

Portanto, os resultados deste trabalho mostraram que uma dose ótima de EMS pode ser definida com base em alguns fatores, como a porcentagem de sobrevivência e a redução da capacidade de regeneração de 50%

(BIDABADI et al., 2012). Como também foi possível apresentar um modelo eficiente de ajuste da dose do mutagênico a ser calculada com base em regressão (PREDIERI e VIRGILIO, 2007; PESTANA et al., 2010).

A determinação de concentrações ótimas de EMS tem sido um critério relevante para a mutagênese *in vitro* em bananeira, com base na regeneração *in vitro* e na sobrevivência (JANKOWICZ-CIESLAK et al., 2012; JAIL et al., 2011). Nesse sentido, foi essencial a tentativa de determinação das concentrações ótimas do EMS para uso em calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira como uma alternativa efetiva para indução de mutagênese *in vitro*.

## CONCLUSÕES

Calos embriogênicos da cultivar Terra Maranhão são mais sensíveis aos efeitos do mutagênico EMS, comparados às suspensões celulares. Enquanto na 'Tropical', as suspensões celulares são mais sensíveis em relação aos tratamentos de EMS em calos embriogênicos.

O EMS administrado em 0,15 e 0,2 % (v/v) causa letalidade e reduz índices de sobrevivência em calos embriogênicos e suspensões celulares de bananeira.

Este estudo mostra uma metodologia eficiente e rápida de aplicação de mutagênese *in vitro* via EMS com possibilidade de propagação de mutantes promissores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAGWAT, B.; DUNCAN, E.J. Mutation breeding in banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. **Sci Hortic**, v. 73, p. 11 – 22, 1997.

BIDABADI, S.S.; MAHMOOD, M.; MEON, S.; WAHAB, Z.; GHOBADI, C. Evaluation of in vitro water stress tolerance among EMS — Induced variants of banana (*Musa* spp., AAA), using “morphological, physiological and molecular” traits. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 255-263, December 2011.

BIDABADI, S.S.; MEON, S.; WAHAB, Z.; SUBRAMANIAM, S.; MAHMOOD, M. Induced mutations for enhancing variability of banana (*Musa* spp.) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS). **Australian Journal Crop Science**, v. 6, n. 3, p. 391-401, 2012.

CHEN, Y.F.; CHEN, W.; HUANG, X.; HU, X.; ZHAO, J. T.; GONG, Q.; LI, X.J.; HUANG, X.L. *Fusarium* wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-cross-section cultural system. **Plant Pathology**, v. 62, n. 1, p. 112–119, February 2013.

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

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production**. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Ann. Bot.**, (Lond); v. 100, p. 1073–1084, 2007.

JAIN, S.M.; TILL, B.; SUPRASANNA, P.; ROUX, N. **Mutations and cultivar development of banana**. In: PILLAY, M.; TENKOUANO, A.; editors. *Banana Breeding, Progress and Challenges*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 203–217, 2011.

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

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

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

NEWMANN, K.H.; IMANI, J.; KUNTAR, A. **Plant cell and tissue culture – A tool in biotechnology** – Basics and application. Berlin: Springer-Verlag, 333p., 2009.

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

PÉREZ PONCE, J.N. Mutagêneses *in vitro*. In: PÉREZ PONCE (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, v. 1, p. 297-326, 1998.

PREDIERI, S.; DI VIRGILIO, N. In vitro mutagenesis and mutant multiplication. In: Jain SM, Haggman H (eds) **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Springer, pp 323 – 333, 2007.

RODRIGUES, F.E. **Caracterização de um clone de bananeira Prata Anã (Musa AAB 'Prata Anã') no Norte de Minas Gerais**. 2010. 139p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Norte de Minas Gerais) – Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2010.

SILVA, S.O.; LINO, L.S.M.; SANTOS-SEREJO, J.A. Melhoramento genético de bananeira para resistência à sigatoka-negra. In: CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; SILVA, S.O. (Ed) **Recomendações técnicas sobre a Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas, (BA): Embrapa Mandioca e Fruticultura. p, 61-70, 2011.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe uma grande perspectiva de reuso de suspensões celulares de bananeira de cultivos prolongados, desde que se contorne o problema com células não-embriogênicas no meio de cultivo. Com a metodologia desenvolvida nesse trabalho foi possível recuperar a qualidade das suspensões celulares de cultivos prolongados, induzir a formação de novos agregados celulares, bem como resgatar e manter o potencial embriogênico com elevada produção de embriões somáticos. Logo, o protocolo desenvolvido foi eficiente na manutenção de embriões somáticos e produção de novas suspensões celulares de bananeira.

Apesar dos avanços já alcançados, há necessidade de estabelecer protocolos mais eficientes de regeneração de plantas após mutagênese *in vitro* em bananeiras, haja vista que algumas limitações nas cultivares como, a ploidia e esterilidade, que tem dificultado o melhoramento genético por hibridação e que resultam no uso dessa ferramenta. Vale ressaltar que uso de raios gama e etil metano sulfonato em culturas embriogênicas são técnicas inovadoras e de grande valor, por serem metodologias seguras para mutagênese *in vitro*.

Em bananeira existe uma variedade de material vegetal para a aplicação de técnicas de indução de mutação, tal como ápices caulinares, tecidos meristemáticos e gemas adventícias, calos embriogênicos e suspensões celulares. No entanto, o uso de suspensões celulares é vantajoso por manipular um grande número de indivíduos (células) num espaço reduzido e fornecer disponibilidade de material genético durante todo o ano. O uso dessas estruturas na mutagênese *in vitro* permite desenvolver uma população de plantas mutantes, apresentando-se como material apropriado, em conformidade com os objetivos do programa de melhoramento em bananeira, onde a ocorrência de quimerismo pode ser evitada.

Embora a indução de mutação em culturas embriogênicas em bananeira ainda apresente alguns entraves como, falta de protocolos eficientes para obter células embriogênicas, os ajustes metodológicos desenvolvidos nessa pesquisa apresentam concentrações promissoras, bem como tempo eficiente de exposição aos mutagênicos que auxiliam em trabalhos de determinação da

dose letal e obtenção de mutantes após mutagênese *in vitro*. Portanto, com a metodologia desenvolvida é possível produzir centenas de plantas mutantes que poderão ser selecionados e apresentar características agronômicas desejáveis.

Como se pôde observar, os resultados, tanto do uso de radiação gama quanto do EMS foram aleatórios, portanto, semelhantes a ação do mutagênico na geração de características desejáveis no melhoramento. O que leva a necessidade de fazer mais pesquisa para o estabelecimento de metodologias adequadas.