

# I. BIOTECNOLOGIA, FISILOGIA DE PLANTAS E FITOQUÍMICA

## INDUÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIOGÊNICAS EM TECIDOS DE RIZOMA E PSEUDOCAULE DE BANANEIRA <sup>(1)</sup>

EDSON TOBIAS DOMINGUES<sup>(2)</sup>, AUGUSTO TULMANN NETO<sup>(3)</sup>  
e BEATRIZ M. JANUZZI MENDES<sup>(3)</sup>

### RESUMO

Tecidos de rizoma e pseudocaule de bananeira (*Musa* spp.), de plântulas micropropagadas, dos cultivares Maçã, Nanicão e GN-60 foram utilizados para indução de estruturas embriogênicas. Explantes obtidos desses tecidos foram cultivados em meio de cultura, segundo Schenk & Hildebrandt, com vitaminas de Staba em concentrações modificadas por Novak et al., acrescido do regulador de crescimento Dicamba, nas concentrações de 0; 2,0; 3,5 e 6,63 mg/L. A formação de tecidos com capacidade embriogênica (calos e estruturas globulares) foi observada em tecidos localizados próximo ao ápice meristemático, para os três cultivares testados. A partir dessas estruturas, foram obtidas suspensões celulares que deram origem a estruturas semelhantes a embriões somáticos, que, após germinação, emitiram raiz ou parte aérea, não apresentando, no entanto, germinação satisfatória.

**Termos de indexação:** bananeira, embriogênese somática, Dicamba, micropropagação.

### ABSTRACT

#### INDUCTION OF EMBRYOGENIC STRUCTURES ON RHIZOMA AND PSEUDOSTEM TISSUES OF BANANA

Structure formations with embryogenic capacity were induced on rhizoma and pseudostem tissues of micropropagated plants of the banana (*Musa* spp.) cultivars Maçã, Nanicão e GN-60. Explants obtained from these tissues were cultivated in a media as cited by Schenk & Hildebrandt, with Staba vitamins in modified concentration by Novak et al., supplemented with Dicamba, a growth regulator, used at concentrations of 0, 2.0, 3.5, 6.63 mg/L. The treatments induced the formation

---

<sup>(1)</sup> Parte de trabalho de dissertação apresentado pelo primeiro autor para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP, Piracicaba (SP). Recebido para publicação em 8 de maio e aceito em 19 de setembro de 1995.

<sup>(2)</sup> Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agronômico, Caixa Postal 04, 13490-970 Cordeirópolis (SP).

<sup>(3)</sup> Seção de Radiogenética, Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, Caixa Postal 96, 13400-970 Piracicaba (SP).

of structures with embryogenic capacity in tissues (callus and globular structures) originated from regions immediately above and below the meristematic apex, on the three tested cultivars. Starting from these structures, cellular suspensions were obtained. These structures were cultivated and gave origin to structures similar to somatic embryos which after germination produced roots or aerial parts. Germination, however, was not satisfactorily present.

**Index terms:** banana, somatic embryogenesis, Dicamba, micropropagation.

## 1. INTRODUÇÃO

As bananeiras são afetadas por patógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematóides. Diversas características agrônômicas e da qualidade dos frutos são importantes e devem ser consideradas como objetivos para o melhoramento.

Os métodos tradicionais de melhoramento de plantas apresentam certas dificuldades para essa cultura, de propagação vegetativa. Os cultivares são normalmente constituídos de híbridos interespecíficos, sendo comum a heterozigocidade, a poliploidia e a esterilidade, sendo que esta última cria, frequentemente, uma barreira insuperável para os cruzamentos.

A indução de mutação para o melhoramento, seja pelo uso da radiação (Novak et al., 1986, 1990; Tulmann Neto et al., 1989), seja por mutagênicos químicos (Omar et al., 1989), tem sido utilizada, bem como a ampliação da variabilidade através da variação somaclonal pelo cultivo *in vitro* de ápices caulinares (Hwang & Ko, 1987).

A embriogênese somática, a partir de calos de cultivares de importância econômica, poderá não somente ampliar a variabilidade genética como levar à obtenção de novos cultivares. O sistema unicelular também facilita a indução e seleção de mutantes com resistência a doenças ou tolerância ao estresse ambiental (Novak, 1992).

Os resultados alcançados até o momento, com relação à obtenção de embriões somáticos de *Musa* spp., ainda são insatisfatórios, devido à baixa frequência de regeneração. O presente trabalho teve por objetivo otimizar o método para obtenção de embriões somáticos, a partir de tecidos de rizoma e pseudocaule, de cultivares de bananeira que possuem elevado grau de esterilidade para posterior utilização em programas de melhoramento.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Indução de estruturas embriogênicas

Para indução de estruturas embriogênicas em tecidos do rizoma e pseudocaule dos cultivares Maçã, Nanicão e GN-60 (mutante induzido, obtido do cultivar Grand Naine), utilizaram-se plântulas micropropagadas em **meio 1**, líquido, contendo macro e micronutrientes, segundo Murashige & Skoog (1962), vitaminas de Morel & Wetmore (1951), suplementado com 5 mg/L de BAP (6 benzil-aminopurina), 30 g/L sacarose, pH 5,7-5,8.

A partir de brotos de origem *in vitro*, não enraizados, com aproximadamente 5 cm de altura e 0,8 cm de diâmetro, foram obtidos explantes, mediante corte transversal iniciando da base para o ápice em segmentos de aproximadamente 2 mm de espessura. Os explantes foram numerados da base do rizoma para o pseudocaule de 1 a 9 (Figura 1), correspondendo os números 3, 4 e 5 à região que envolve o meristema apical, estando a posição 3 logo abaixo e a posição 5, logo acima do tecido meristemático apical.

Os explantes foram inoculados em placas de Petri com 10 cm de diâmetro, contendo o **meio 2**, semi-sólido, previamente preparado e composto de macro- e micronutrientes segundo Schenk & Hildebrandt (1972), vitaminas de Staba (1969) em concentrações modificadas por Novak et al. (1989), contendo tiamina (2 mg/L), ácido nicotínico (2 mg/L), piridoxina (2 mg/L), pantotenato de Ca (1 mg/L), p-amino benzóico (0,5 mg/L), cianocobalamina (1,5 mg/L), riboflavina (0,5 mg/L), cloreto de colina (1 mg/L), ácido fólico (0,5 mg/L) e biotina (1 mg/L); inositol 100 mg/L, cisteína 40 mg/L, sacarose 20 g/L, pH 5,7-5,8, ágar 7 g/L. A esse meio,

foi adicionado o ácido 3,6 dicloro-2-metoxibenzóico (Dicamba) nas concentrações de 0; 2,0; 3,5 e 6,63 mg/L. Os explantes foram então cultivados em câmara escura (B.O.D.) a 26,5°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema tipo fatorial, constando de três cultivares de bananeira, quatro concentrações de Dicamba e 16 repetições (placas de Petri) por tratamento, contendo cada placa os explantes obtidos de uma plântula.

Foram avaliados o percentual médio de explantes com formação de estruturas embriogênicas, bem como o percentual médio dos que apresentaram escurecimento (oxidação).

## 2.2 Obtenção de suspensões celulares

As estruturas embriogênicas obtidas foram transferidas para erlenmeyers (250 ml) contendo 50 ml do meio semelhante ao **meio 2**, exceto pelo regulador de crescimento Dicamba que passou para 4,42 mg/L, sacarose 30 g/L e ausência de agente solidificante. Esses recipientes ficaram sob agitação (80-120 rotações por minuto), na ausência de luz, realizando-se subcultivos semanais.

Após um período de dois meses aproximadamente, foram obtidas suspensões celulares, que, transferidas para **meio 2**, líquido, sem regulador de crescimento, permaneceram 24-48 horas sob agitação constante de 70 rpm.

## 2.3 Desenvolvimento e germinação dos embriões

As suspensões obtidas foram transferidas para **meio 2**, sem Dicamba, suplementado com 1,5 mg/L de zeatina, para desenvolvimento dos possíveis embriões somáticos, os quais, após dois meses aproximadamente, apresentaram dimensões que variaram de 2 a 5 mm de diâmetro.

Para germinação dos embriões, utilizou-se o **meio 2** contendo duas fases: uma, sólida, com 10 g/L de ágar e, outra, líquida, em volume de 50 ml cada uma. A fase sólida foi autoclavada e suplementada com carvão ativado (1,5 g/L) e, a líquida, filtrada, porém acrescida de zeatina (2,2 mg/L).

Após o resfriamento do meio sólido, adicionou-se o meio líquido na parte superior, onde então se inocularam os possíveis embriões somáticos, os quais ficaram sob agitação constante de 65 rpm, sob luz 38 W/m<sup>2</sup> para indução de germinação.

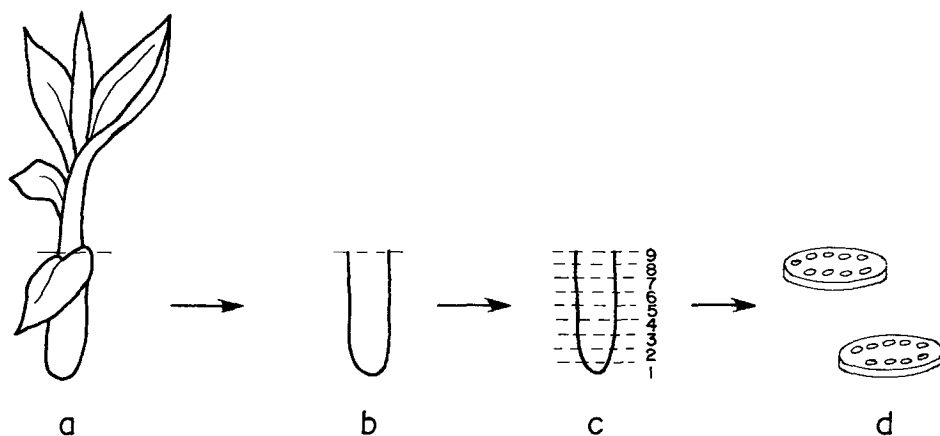


Figura 1. Esquema ilustrativo do processo de obtenção de explantes em *Musa* spp. A partir de uma plântula *in vitro* (a), são obtidos segmentos contendo rizoma e pseudocaule (b), os quais são seccionados transversalmente em segmentos de aproximadamente 2 mm de diâmetro e numerados de 1 a 9 (c) e plaqueados em meio de cultura suplementado com Dicamba.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro 1 mostra o percentual de estruturas embriogênicas induzidas nos cultivares de bananeira Maçã, Nanicão e GN-60, tratados com as diversas concentrações do regulador de crescimento Dicamba. O meio com Dicamba mostrou-se favorável para a indução das estruturas embriogênicas, confirmando, assim, o resultado de Novak et al. (1989). As formações de estruturas globulares e calos ocorreram a partir do 15.<sup>o</sup> dia após inoculação dos explantes, atingindo o ponto máximo em torno de 45 dias. Após esse período, ocorreu tendência de oxidação das estruturas embriogênicas para todos os tratamentos.

Quadro 1. Percentual de explantes dos cultivares Maçã, GN-60 e Nanicão, que apresentaram estruturas embriogênicas após 45 dias de cultivo, em meio suplementado com Dicamba (<sup>1</sup>)

Cultivares	Dicamba (mg/L)			
	0	2,0	3,5	6,63
Maçã	0c	14,31b	25,96b	84,31a
GN-60	0c	36,28b	83,55a	7,91c
Nanicão	0c	77,59a	41,94b	25,43b

(<sup>1</sup>) Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si (sentido horizontal) pelo teste de Tukey - 5%.

A ausência de regulador de crescimento induziu a proliferação de raízes e o desenvolvimento das gemas apicais nos explantes, para os três cultivares testados. Essa tendência não foi observada para as concentrações 2,0, 3,5 e 6,63 mg/L de Dicamba.

A intensidade de formação das estruturas embriogênicas variou de acordo com as concentrações de Dicamba utilizadas. A concentração de 2 mg/L induziu melhor resposta para o cultivar Nanicão, onde ocorreu a formação de estruturas embriogênicas em 77,59% dos explantes. A concentração

de 3,5 mg/L foi melhor para o GN-60, onde ocorreu a formação das estruturas em 83,55% dos explantes, enquanto a de 6,63 mg/L foi melhor para o cultivar Maçã, onde 84,31% dos explantes apresentaram a formação dessas estruturas.

As estruturas embriogênicas obtidas no presente trabalho (Figura 2A), constituíram-se de estruturas globulares e calos, cujo grau de ocorrência variou entre os cultivares testados. Para o 'Maçã' (grupo AAB) e Nanicão (grupo AAA), ocorreu maior formação de calos opacos de coloração creme. Para o 'GN-60' (AAA), além da formação desses dois tipos de estrutura, ocorreu, com maior frequência, a formação de calos translúcidos. Essa diferença de resposta entre os cultivares de bananeira também foi observada por Novak et al. (1989).

O quadro 2 mostra o percentual de oxidação dos explantes dos diferentes cultivares de bananeira com a utilização do Dicamba. A ausência do regulador de crescimento provocou elevados percentuais de oxidação, os quais não foram, portanto, determinados pela presença do regulador de crescimento, exceto para o cultivar GN-60 a 6,63 mg/L de Dicamba.

A pesquisa de Novak et al. (1989), da qual foi adaptado o método para este trabalho, utilizou diversas concentrações de Dicamba para quatro genótipos de *Musa*, observando-se que concentrações

Quadro 2. Percentual de explantes oxidados dos cultivares Maçã, GN-60 e Nanicão, após 45 dias de cultivo em meio suplementado com Dicamba (<sup>1</sup>)

Cultivares	Dicamba (mg/L)			
	0	2,0	3,5	6,63
Maçã	49,86a	23,75b	39,95ab	20,84a
GN-60	67,74a	41,52b	18,35c	76,56a
Nanicão	56,52a	14,33c	28,73bc	41,81ab

(<sup>1</sup>) Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si (sentido horizontal) pelo teste de Tukey - 5%.

acima de 6,63 mg/L provocaram o escurecimento dos explantes e a exsudação de compostos fenólicos. Resposta semelhante foi verificada no presente trabalho, pois, para alguns cultivares, mesmo a concentração de 6,63 mg/L foi capaz de induzir escurecimento e exsudação de fenóis.

Comparando-se os quadros 1 e 2, as concentrações que provocaram maior produção de estruturas embriogênicas para cada cultivar foram também aquelas onde os explantes apresentaram menor oxidação. Para o 'Maçã', a concentração de 6,63 mg/L de Dicamba provocou um percentual de

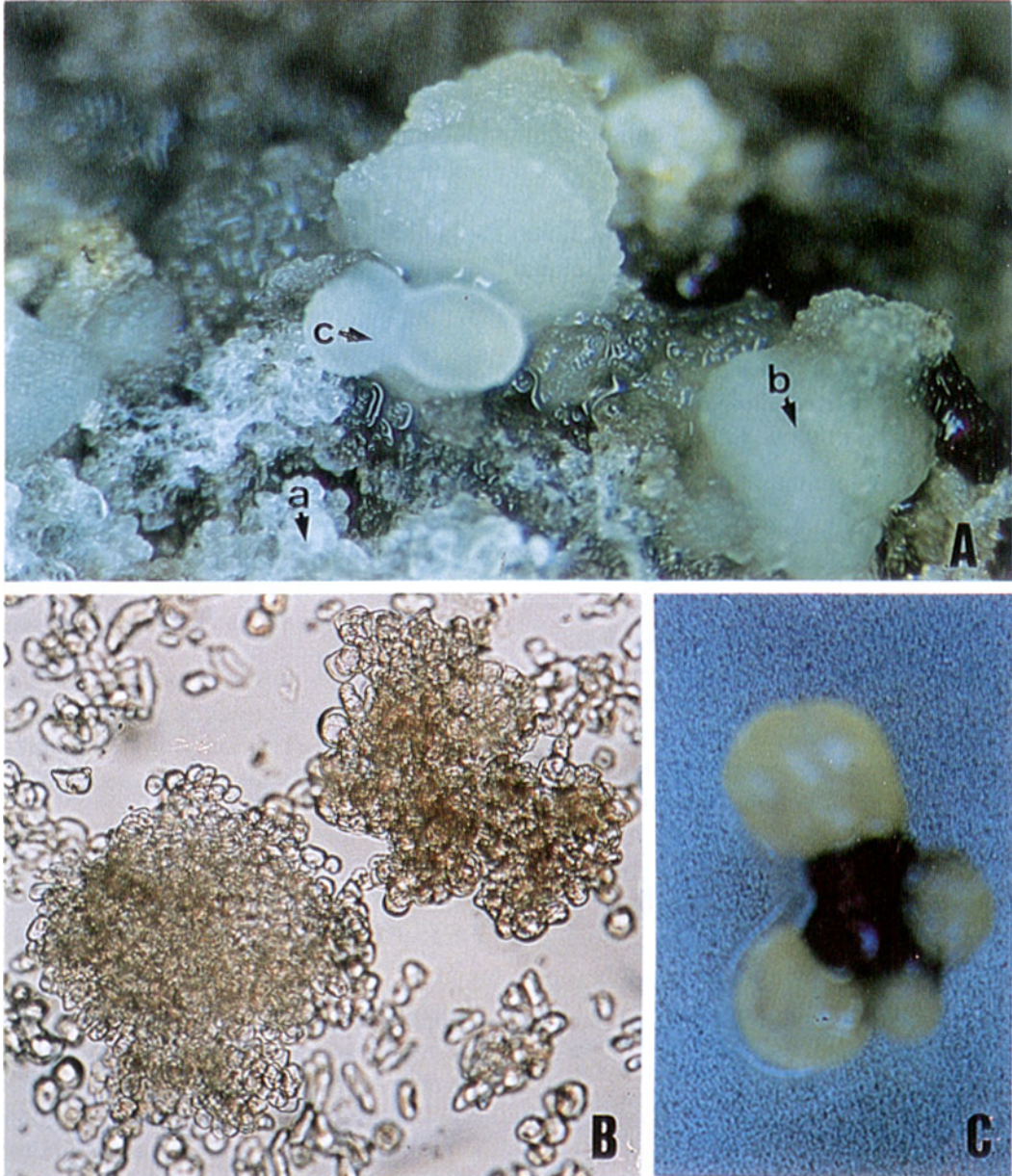


Figura 2. **A:** Aspecto de calos translúcidos e friáveis (a), de calos compactos (b) e de estruturas globulares (c), induzidos em tecidos do rizoma e pseudocaule de bananeira através do uso de Dicamba (10 x). **B:** Células de bananeira obtidas através do cultivo *in vitro* de calos compactos e estruturas globulares em meio líquido (200 x). **C:** Estruturas semelhantes a embriões somáticos em fase de desenvolvimento (10 x).

oxidação de 20,84, ou seja, o menor índice apresentado por esse cultivar, enquanto, para o GN-60, o menor percentual de oxidação foi observado na concentração de 3,5 mg/L, com 18,35 de oxidação; já o 'Nanicão' apresentou menor oxidação com 2,0 mg/L de Dicamba (14,33%).

Foram observadas diferenças na resposta dos explantes às diversas concentrações de Dicamba, de acordo com sua posição de origem nas plântulas. Os explantes constituídos apenas de tecidos do rizoma não se mostraram adequados. A partir de explantes obtidos logo abaixo da posição do ápice meristemático, envolvendo tecido do rizoma e do pseudocaule, bem como os explantes englobando o ápice meristemático e logo acima deste, é que apresentaram boa formação de estruturas globulares e calos. Como ponto comum entre os cultivares, notou-se que os explantes localizados próximo ao meristema apical (abaixo e acima) mostraram maiores percentuais de estruturas embriogênicas.

Segundo Ammirato (1984), nas gramíneas (monocotiledôneas), a embriogênese somática se verifica em poucos tecidos, especificamente nos ápices de crescimento ativo. Isso talvez explique o verificado para a embriogênese de *Musa* spp., a qual tem sido observada ou em tecidos florais ou tecidos próximos ao ápice meristemático, entre o rizoma e o pseudocaule. Também como Novak et al. (1989), neste trabalho observou-se que o explante contendo o meristema apical não foi o mais adequado para a indução da embriogênese somática, devido à dominância apical, que induz a recuperação da parte aérea da planta inicial, em detrimento da formação de estruturas embriogênicas.

Do cultivo das estruturas embriogênicas (calos de coloração creme), em meio líquido, foram obtidas suspensões celulares (Figura 2B), as quais, a princípio apresentaram-se pouco uniformes, como observado por Krikorian & Scott (1990). Esses autores obtiveram suspensões celulares a partir de calo e também notaram grande número de células já diferenciadas, apresentando pouca capacidade de divisão. Neste trabalho, observou-se também que a realização de subcultivos semanais resultaram em culturas mais uniformes. Ainda segundo esses autores, suspensões celulares têm sido estabelecidas para um número limitado de cultivares de bananeira, como os pertencentes aos grupos AA e AAA (cultivares GN-60 e Nanicão) ou ABB, enquanto resultados positivos em AAB ('Maçã') ainda são raros.

A partir do cultivo das suspensões celulares em meio para desenvolvimento, estas deram origem a estruturas semelhantes a embriões somáticos (Figura 2C), as quais atingiram de 2 a 5 mm de comprimento e de 1 a 3 mm de largura. Durante o processo germinativo, essas estruturas não apresentaram germinação satisfatória, emitiram apenas radículas e, quando houve indução de parte aérea, não ocorreu o enraizamento simultâneo.

O quadro 3 mostra o percentual de estruturas semelhantes a embriões somáticos, que permaneceram verdes, oxidaram, formaram raiz ou parte aérea, após 15 dias da inoculação, em meio de germinação.

As respostas obtidas variaram para os cultivares testados. O 'Maçã' revelou raízes em 26,56% dessas estruturas, o 'Nanicão' em 17,11% e o 'GN-60'

Quadro 3. Percentual de estruturas semelhantes a embriões somáticos, que permaneceram verdes, oxidaram, formaram órgãos (raiz e parte aérea), após 15 dias da inoculação em meio de germinação

Cultivares	Verdes	Oxidação	Formação de raiz	Formação de parte aérea
Maçã	74,21	25,79	26,56	13,33
GN-60	31,03	68,97	1,34	0
Nanicão	50,12	49,88	17,11	6,66

apresentou menor emissão de radículas (1,34%), enquanto houve indução da parte aérea em apenas 13,33% para o 'Maçã' e 6,66% para o 'Nanicão'.

Perea-Dallos & Novak (1988) e Novak et al. (1989) induziram a formação de calos embriogênicos em bananeira mediante o regulador de crescimento Dicamba e citam que o passo mais difícil foi o desenvolvimento dos embriões somáticos em plantas, ou seja, sua maturação. Segundo os autores, o meio dupla fase, numa das quais se utiliza carvão ativado, foi fundamental nesse processo, pela diminuição da oxidação das estruturas. No presente trabalho, notou-se a mesma tendência, mas ainda com controle insuficiente.

Os autores acima confirmaram, por estudos histológicos, a origem das células embriogênicas, independentes do tecido materno, das quais se desenvolveram os embriões somáticos em estruturas bipolares, obtendo-se aproximadamente 200-300 embriões somáticos para cada 100 ml de suspensão celular inicial. Embora haja semelhança com os resultados de outros autores, faz-se necessário o aperfeiçoamento do método para obtenção de embriões somáticos viáveis, bem como a obtenção de plantas completas.

#### 4. CONCLUSÕES

1. O uso do Dicamba como regulador de crescimento mostrou-se satisfatório para indução de estruturas embriogênicas. A concentração de 6,63 mg/L foi a melhor para o cultivar Maçã; 3,35 mg/L para o 'GN-60' e 2,0 mg/L para o 'Nanicão'.

2. As regiões situadas próximo ao meristema apical (constituídas de tecidos do rizoma e pseudocaule) de plântulas de bananeira responderam melhor à indução de estruturas embriogênicas para os três cultivares observados.

3. Os possíveis embriões somáticos obtidos não apresentaram germinação satisfatória, emitiram radículas ou parte aérea, mas não simultaneamente, não havendo, portanto, a regeneração de plantas completas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y., eds. *Handbook of plant cell culture*. New York, MacMillan, 1984. v.1, p.82-123.
- HWANG, S.C. & KO, W.A. Somaclonal variation of bananas and screening for resistance to *Fusarium* wilt. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BANANA AND PLANTAIN BREEDING STRATEGIES, 21., Cairns, 1986. *Proceedings*. Brisbane, ACIAR, 1987. p.151-156.
- KRIKORIAN, A.D. & SCOTT, M.E. *Musa* callus and cell culture: strategies, achievements and directions. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *In vitro* mutation breeding of bananas and plantains. I. Vienna, IAEA, 1990. p.9-23.
- MOREL, G. & WETMORE, R.H. Fern callus tissue culture. *American Journal of Botany*, Columbus, **38** (2):141-143, 1951.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **15**:473-497, 1962.
- NOVAK, F.J. *Musa* (Bananas and Plantains). In: HAMMERSCHLAG, F.A. & LITZ, R., eds. *Biotechnology of perennial fruit crops*. Walingford C.A.B. International, 1992. p.449-488.
- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; MONPURGO, R.; VAN DUREN, M.; SACCHI, M. & KHATRI, A. Improvement of *Musa* through biotechnology and mutation breeding. Plant Breeding Unit, Joint FAO/IAEA, Seibersdorf, 1992. 12p.
- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; PHADVIBULYA, V.; HERMELIN, T.; BRUNNER, H. & DONINI, B. Micropropagation and radiation sensitivity in shoot tip cultures of banana and plantain. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement*. Vienna, IAEA, 1986. p.167-174.
- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M. & OMAR, M.S. Mutation induction by gamma irradiation of in vitro cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa* cvs.). *Tropical Agriculture*, Trinidad, **67**(1):21-28, 1990.

- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M.; CONGER, B.V. & XIAOLANG, T. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology*, New York, 7:154-159, 1989.
- OMAR, M.S.; NOVAK, F.J. & BRUNNER, H. In vitro action of ethylmethanesulphonate on banana shoot tips. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 40(3): 283-295, 1989.
- PEREA-DALLOS, M. & NOVAK, F.J. Resultados promisorios en el mejoramiento genético al través de mutagénesis y regeneración de plantas de *Musa* spp. via embriogénesis somática. *Boletín Científico Acevív*, Bogotá, 3:29-32, 1988.
- SCHENK, R.U. & HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 50 (1):199-204, 1972.
- STABA, J.E. Plant tissue culture as a technique for the phytochemist. In: SEIKEL, M.K. & V.C. RONECKLES, eds. *Recent advances in phytochemistry*. New York, ACC, 1969. v.2, p.75-106.
- TULMANN NETO, A.; DOMINGUES, E.T.; MENDES, B.M.J. & ANDO, A. Metodologia *in vivo* visando indução de mutações no melhoramento da bananeira 'Maçã'. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 12(4):871-879, 1989.