

CAPÍTULO 14

Micropropagação de Bananeira Visando à Produção Massal de Mudanças de Elevado Padrão Genético e Fitossanitário

*Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Frederico Henrique da Silva Costa
Janiffe Peres de Oliveira*

1. Introdução

O cultivo da bananeira é uma importante atividade econômica e social no mundo, sendo uma das culturas de maior produção entre as fruteiras tropicais e uma fonte contínua de alimento e renda aos produtores. No Brasil, seu cultivo estende-se da região Norte ao Sul do País (SILVA et al., 2003; DONATO et al., 2006).

De modo semelhante a muitas espécies cultivadas, a bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários, sendo um dos mais graves a sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, (SILVA et al., 2003). Nas regiões de ocorrência, essa doença tem reduzido significativamente a produção das cultivares Prata, Prata-Anã, Nanicao e Grande Naine, atualmente as mais difundidas e plantadas. Como consequência, programas de melhoramento genético têm sido intensificados, a exemplo do existente no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, CNPMF/Embrapa, localizado em Cruz das Almas, BA, cujos objetivos são obter e introduzir genótipos de bananeira mais produtivos, com frutos de boa qualidade e resistentes às principais pragas da cultura.

Contudo, a maioria das cultivares de bananeira utilizada comercialmente é triploide e, em menor proporção tetraploide, caracterizada por ser parcial ou totalmente estéril (CROUCH et al., 1998). Por esse motivo, a forma de propagação é assexuada, utilizando-se tradicionalmente as brotações laterais (perfilhos) desenvolvidas no rizoma da planta-mãe. Todavia, a utilização de mudas provenientes da propagação convencional constitui um dos aspectos que limitam a expansão desta cultura, especialmente pela disseminação de pragas às novas áreas de cultivo (ROES et al., 2005), dificultando o desenvolvimento e posterior produção das plantas. Além disso, a obtenção de mudas a partir

da separação dos brotos existentes na planta-mãe possibilita baixo número de plantas, com taxa de multiplicação entre 3 e 10 perfilhos por matriz/ciclo (VUYLSTEKE; DE LANGHE, 1985; SOUZA et al., 1997), dependendo da cultivar e das condições de manejo da cultura.

Estas limitações conduziram ao desenvolvimento de técnicas mais eficientes de multiplicação como a micropropagação de ápices caulinares e meristemas que, atualmente, constitui-se no principal método de produção de mudas certificadas, validação e distribuição de novos genótipos lançados pelos programas de melhoramento genético. Isso porque o uso da técnica de propagação *in vitro* permite a produção massal de propágulos com elevado padrão genético e fitossanitário, em espaço físico e tempo reduzido, de forma contínua, além de facilitar o transporte das mudas a longas distâncias e os tratamentos culturais no campo.

Diante disso e devido à pouca disponibilidade de literatura atualizada sobre a micropropagação de bananeiras, este capítulo objetiva abordar aspectos e procedimentos básicos aplicados à produção de material propagativo com elevado padrão genético e sanitário.

2. Micropropagação de Bananeira

As primeiras aplicações da micropropagação em espécies do gênero *Musa* datam da década de 1960. Por conseguinte, desde 1985 mudas de bananeira têm sido produzidas e comercializadas utilizando esta tecnologia, constituindo nos dias de hoje o principal método de obtenção de propágulos com alta pureza genética e fitossanitária, com aplicação comercial em vários países (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004; ROCHA, 2005).

No Brasil, o uso deste tipo de material propagativo para implantação de novas áreas de cultivo tem apresentado crescimento significativo nos últimos 10 anos, principalmente por produtores mais tecnificados. Tal fato deve-se principalmente ao aumento da ocorrência de pragas importantes na cultura da bananeira e pela possibilidade de disseminação destas por métodos convencionais de propagação. Aliadas a estes aspectos, têm-se as exigências de órgãos de fiscalização quanto ao sistema de produção de mudas certificadas (lei de sementes e mudas).

Em geral, a propagação *in vitro* ou micropropagação de bananeiras consiste basicamente em isolar, estabelecer e multiplicar ápices caulinares¹, oriundos de brotações laterais de plantas matrizes vigorosas e produtivas, sob condições de total assepsia, em meio de cultura artificial e sob condições controladas de luminosidade e temperatura. Para isso, o processo é constituído essencialmente por cinco fases distintas, porém dependentes: a) seleção de plantas matrizes e coleta de material vegetal; b) estabelecimento *in vitro* de culturas assépticas; c) multiplicação/proliferação de brotos; d) alongamento/enraizamento; e) aclimatização (Fig. 1).

O princípio de regenerar novas plantas a partir de um único propágulo se baseia na ativação do crescimento das gemas axilares presentes na inserção

¹Em bananeira, ápice caulinar refere-se a **meristema envolto por alguns** primórdios foliares e contendo pequeno segmento de rizoma.

das folhas na base do rizoma, a partir de um balanço hormonal (citocinina/auxina) equilibrado e previamente definido para cada cultivar, uma vez que cada cultivar difere geneticamente entre si e pode apresentar resultados diferenciados, mesmo sob a mesma condição de cultivo.

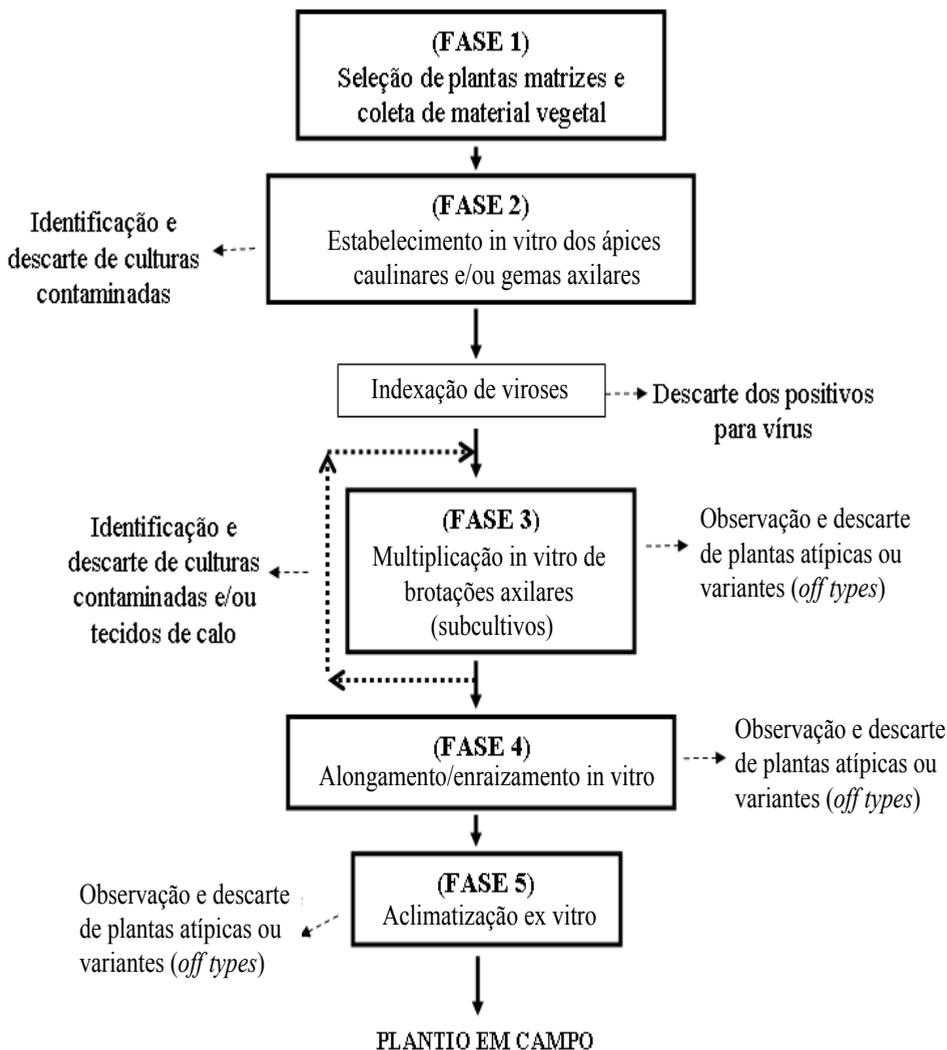


Fig. 1. Diagrama esquemático do processo de micropropagação para produção massal de mudas de bananeiras de qualidade genética e sanitária.

O êxito no processo de micropropagação depende basicamente de alguns fatores, dentre os quais podem ser citados: a condição genética e sanitária do material vegetal fonte de explantes (matrizes), a constituição dos meios de cultura e as condições do ambiente de cultivo in vitro e ex vitro (Fig. 2).

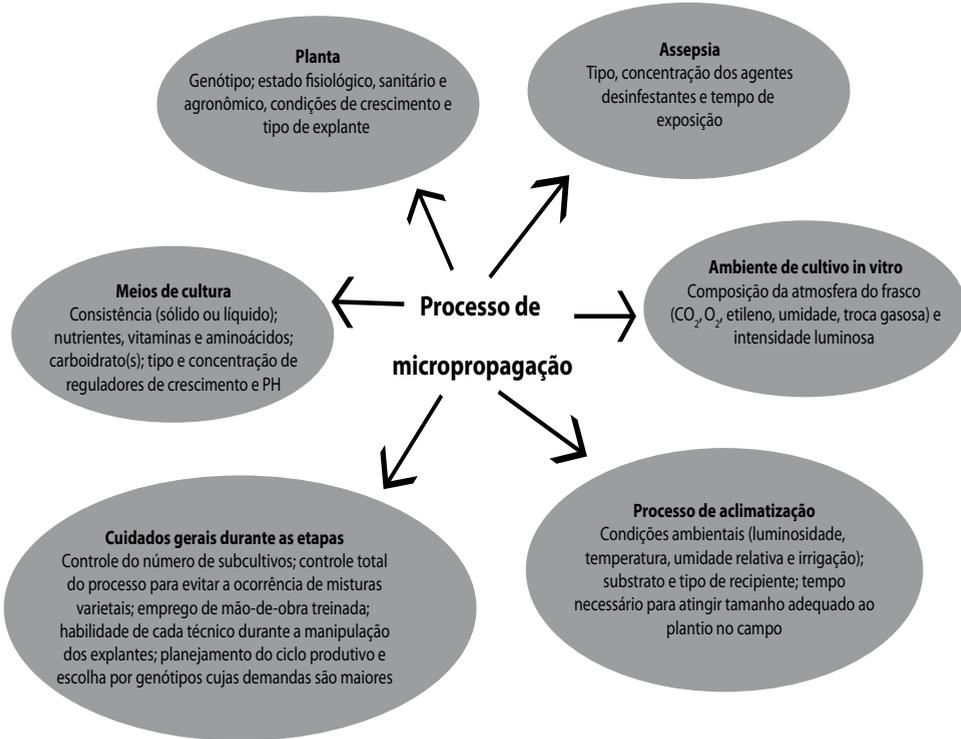


Fig. 2. Fatores envolvidos no controle da morfogênese in vitro no processo de micropropagação.

2.1. Seleção de Plantas Matrizes e Coleta de Material Vegetal

2.1.1. Seleção de Plantas Matrizes

Constitui-se na primeira e uma das mais importantes etapas da produção massal de mudas micropropagadas, uma vez que esta tecnologia preserva as características das plantas matrizes. Além da escolha correta do genótipo a ser multiplicado, é nessa etapa que se deve considerar o fato das plantas matrizes estarem expostas a condições ambientais naturais e, portanto, sujeitas aos mais diversos tipos de estresse, bióticos e/ou abióticos. Assim, preferencialmente o matrizeiro deve apresentar plantas em excelente estado fisiológico, nutricional e sanitário.

Uma planta sob estresse pode apresentar quantidades elevadas de inibidores de crescimento, como o ácido abscísico (ABA), influenciando sobremaneira as etapas posteriores de multiplicação in vitro. Por isso, o material que servirá como fonte de explantes é geralmente mantido bem nutrido em bancos ativos de germoplasma (BAG), no caso de centros de pesquisa (Fig. 3a e Fig. 3b), jardins clonais ou até mesmo em estufas (biofábricas, por exemplo) (Fig. 3c e Fig. 3d).

Fotos: a, b (autores); c, d (Empresa de Biotecnologia Vegetal)



Fig. 3. Banco ativo de germoplasma (BAG) (a, b) e estufa (c, d) com plantas matrizes de bananeira.

2.1.2. Coleta de Material Vegetal/Mudas para Obtenção dos Explantes

Entende-se por explante qualquer fragmento de tecido ou órgão oriundo de partes vegetativas ou reprodutivas de uma planta (chamada matriz), o qual é utilizado como material vegetal para iniciar o cultivo *in vitro*.

A princípio, qualquer tipo de explante pode ser empregado para iniciar a propagação *in vitro* de determinada espécie. Porém, na prática utilizam-se explantes contendo maior proporção de tecido meristemático, o que ocorre principalmente em tecidos e plantas mais novas. Assim, o estabelecimento *in vitro* destes explantes possibilitará a formação de uma planta completa, requerendo para isso apenas alongamento e diferenciação radicular (JUNGHANS; SANTOS-SEREJO, 2006).

Várias fontes de explantes têm sido empregadas para a micropropagação de bananeira, tais como: ápices caulinares obtidos de brotações laterais (axilares) da planta matriz adulta (mudas tipo chifre, chifrinho, etc.), gemas laterais e ápices florais oriundos do “coração” da bananeira (inflorescência masculina) retirado do cacho (Fig. 4). No entanto, os primeiros tipos são os

mais utilizados e sua coleta deve ser realizada de preferência no mesmo dia do estabelecimento *in vitro* para evitar a excessiva exposição aos fatores do ambiente, como contaminação e desidratação (SOUZA et al., 1997). Nesta fase, deve-se considerar também a estação do ano, a qual pode interferir não apenas nas taxas de contaminação do material, mas também nos níveis hormonais e concentração de polifenóis das plantas. Para isso, um correto estudo sobre a época do ano mais favorável pode possibilitar o planejamento da coleta do material em campo, facilitando sobremaneira a organização das etapas do cultivo e da mão-de-obra no laboratório.



Fotos: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Fig. 4. Matriz de bananeira evidenciando as brotações laterais (mudas) em diferentes estágios de desenvolvimento (a); inflorescência masculina (coração) da bananeira aderida ao cacho (b) (seta); aspectos de mudas retiradas do campo e reduzidas, podendo ser utilizadas como fontes iniciais de explantes para a micropropagação (c, d) (seta).

2.2. Estabelecimento in Vitro: Assepsia do Material Vegetal, Extração dos Ápices Caulinares e Transferência para Meio de Cultura

Diversas metodologias de desinfestação têm sido empregadas visando obter material vegetal descontaminado in vitro para servir como fonte inicial de explantes sem, todavia, prejudicar o posterior desenvolvimento in vitro ou mesmo conduzir o explante à morte. Para isso, várias substâncias com ação germicida são utilizadas, variando quanto à concentração e tempo de exposição do material vegetal, destacando-se o álcool comercial (92,8°GL), hipoclorito de sódio (NaOCl) (água sanitária comercial) ou de cálcio (P.A. ou utilizado para limpeza de piscinas). Normalmente, gotas de algum espalhante adesivo (detergente neutro ou Tween-20) são adicionadas ao hipoclorito para quebrar a tensão superficial da solução e facilitar o contato desta com o explante. Por fim, visando retirar o excesso de produto, são feitas geralmente de três a cinco lavagens dos explantes em água destilada e autoclavada. Em casos extremos como, por exemplo, material vegetal que apresente grande quantidade de terra aderida e raízes, podem-se retirar as raízes com auxílio de facas e realizar uma pré-limpeza com lavagem em água corrente e detergente comercial.

Vale ressaltar que para cada condição (época de coleta, estado sanitário das plantas matrizes, tamanho dos explantes, etc.) adaptações no processo de desinfestação podem ser necessárias, seja pela exclusão ou inclusão de alguma(s) outra(s) substância(s) ou adequações quanto à sua concentração e tempo de exposição (imersão). Nesse sentido, o protocolo descrito a seguir tem sido utilizado comercialmente com sucesso.

Em escala comercial, a assepsia do material vegetal de bananeira tem início a partir de uma limpeza mecânica das mudas (escalpelamento), removendo-se parte do rizoma e das bainhas foliares (pseudocaulé), ainda em ambiente externo. Para isso, devem-se realizar cortes longitudinais e transversais até que se obtenham explantes com dimensões de aproximadamente 10 cm³. Estes são então lavados com detergente e enxaguados em água, sendo submetidos a uma primeira desinfestação em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) (água sanitária comercial) durante 30 minutos e reduzidos novamente até dimensões aproximadas de 5 cm³. Posteriormente, ainda em ambiente externo, uma segunda desinfestação é realizada utilizando-se hipoclorito de cálcio 10% (p/v) ou hipoclorito de sódio 1,25%, durante 20 minutos. Em seguida, os explantes são novamente reduzidos até 2,5 cm³, quando então são levados para câmara de fluxo laminar e desinfestados com hipoclorito de cálcio 5% (p/v) ou hipoclorito de sódio 1,25% (v/v), durante 15 minutos (Fig. 5a e Fig. 5b), e lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. Uma vez desinfestados, os explantes são dispostos individualmente sobre papel de filtro (em placas de Petri) ou sob placas de alumínio (estéreis) e com auxílio de pinças e bisturis (Fig. 5c e Fig. 5d) sofrem nova redução (1 cm³), resultando em um ápice caulinar constituído de alguns primórdios foliares envolvendo o meristema e um pequeno segmento de rizoma (Fig. 5e). Os ápices caulinares

extraídos são transferidos preferencialmente para tubos de ensaio contendo meio de cultura semi-sólido (previamente preparado e autoclavado) (Fig. 5e) e fechados com tampas de polietileno, selados com filme de PVC e mantidos em sala de crescimento.

Caso se observe acentuado escurecimento (oxidação) causado pela liberação e acúmulo de fenóis, os explantes devem permanecer no escuro durante as duas primeiras semanas ou ser submetidos a um subcultivo para novo meio de cultura. Esta transferência inicial para meio de cultivo, visando à obtenção de culturas assépticas, é conhecida como estabelecimento *in vitro* ou subcultivo zero.



Fotos: a, b, c (autores); d (Herminio Souza Rocha); e (Empresa de Biotecnologia Vegetal)

Fig. 5. Última etapa da desinfestação do material vegetal de banana e obtenção de ápices caulinares em câmara de fluxo laminar: (a, b) desinfestação dos explantes (segmentos de pseudocaule e rizoma); (c, d) explantes sendo reduzidos (retirada das bainhas foliares e parte do rizoma); (e) ápice caulinar estabelecido em meio MS contendo carvão ativado.

2.3. Indexação de Vírus

Geralmente, durante o estabelecimento e multiplicação de banana *in vitro*, a presença de microrganismos nos explantes pode ser detectada facilmente pelo crescimento destes em meio de cultura, fato normalmente conhecido na cultura de tecidos de plantas como contaminação. No entanto, embora a técnica permita garantir a sanidade do material quanto a fungos e bactérias, isso não acontece com os vírus, uma vez que estes organismos só se expressam no interior de células do hospedeiro sob determinadas condições

climáticas. Assim, plantas positivas para um determinado vírus podem ser assintomáticas em um época específica do ano.

Assim como para as outras culturas, doenças causadas por vírus em bananeira podem ser transmitidas por insetos vetores e através da propagação assexuada, ameaçando a produção em áreas endêmicas e também naquelas livres de vírus, mas que recebem novas mudas (SHARMA et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 2007). No Brasil, apenas o *Banana streak virus* (BSV) e o *Cucumber mosaic virus* (CMV) foram identificados em bananeiras até o presente momento (MEISSNER FILHO et al., 2000), os quais podem ser verificados em infecções mistas ou simples, dificultando a detecção visual dos sintomas (FIGUEIREDO et al., 2007).

No caso do BSV, existe uma faixa restrita de espécies hospedeiras e as plantas infectadas podem apresentar sintomas de estrias foliares, lesões foliares cloróticas, mosaico, má formação dos frutos e diminuição no tamanho do cacho. Já o CMV possui distribuição cosmopolita, com diferentes graus de virulência, podendo as plantas de bananeiras enfermas apresentarem necrose vascular, espessamento intermitente da nervura, separação da bainha foliar externa do pseudocaulo, clorose, mosaico, nanismo, má formação dos frutos e, às vezes, morte do vegetal (FIGUEIREDO et al., 2007).

Em razão destes problemas, o comércio de plantas de bananeira micropropagadas tem se estabelecido visando à limpeza clonal das cultivares de maior interesse econômico (SILVA NETO, 2003). Entretanto, para comercializar este tipo de muda é necessário que os laboratórios realizem o processo de indexação de vírus, que consiste na realização de testes sorológicos, biológicos ou moleculares com o objetivo de certificar o material vegetal em uso quanto à infecção por vírus.

Em bananeira, esta indexação tem sido imprescindível, sendo feita em todos os ápices caulinares estabelecidos in vitro, em laboratório de indexação credenciado pelo Ministério da Agricultura. A indexação quando realizada durante etapas tardias do cultivo, como na fase de multiplicação ou mesmo de aclimatização, por amostragem dos lotes produzidos, apresenta risco em potencial. Isso significa que se os explantes forem positivos para o vírus, todo o material deve ser eliminado, por não se saber a origem dos explantes dos quais surgiram aquelas novas plantas.

De modo geral, a detecção de vírus em bananeiras vem sendo realizada por meio da sintomatologia (inspeção visual), indexação biológica (uso de plantas indicadoras), por meio de testes sorológicos (DAS-ELISA – Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e moleculares (PCR – Polymerase Chain Reaction) ou ainda por microscopia eletrônica de transmissão, para observação das partículas virais em extratos. Destes, o mais utilizado em escala comercial em bananeira é o DAS-ELISA, para testes de indexação do vírus CMV. Entretanto, de acordo com Lockhart e Olszewski (1993) e Figueiredo et al. (2007), determinadas estirpes do CMV não são detectadas por testes sorológicos. Ademais, o alto grau de heterogeneidade genômica e sorológica apresentado pelo BSV impõe uma séria restrição quanto ao uso de

técnicas sorológicas e moleculares para a sua detecção em germoplasma de *Musa*.

Nesse sentido, Figueiredo et al. (2007) desenvolveram um protocolo de PCR *multiplex* para detectar simultaneamente o BSV e CMV em bananeiras micropropagadas e cultivadas no Brasil. Para isso, os autores utilizaram as cultivares Pacovan (AAB) e Prata Graúda (AAAB), e como controle positivo a 'Prata Anã' (AAB). Com a metodologia empregada foi possível diagnosticar a presença de ambos os vírus, de modo que em todas as amostras de 'Pacovan' (AAB) e do controle positivo houve infecção mista do BSV com o CMV.

Assim, as biofábricas que utilizarem a tecnologia *in vitro* para produzir e comercializar mudas de bananeira devem possuir registro em órgão de fiscalização agropecuária para um acompanhamento sistemático da produção e o controle oficial (indexação) para o vírus. Como exemplos, citam-se a Multiplanta – Tecnologia Vegetal (EMPRESA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2007) e o Instituto Biofábrica de Cacau em Ilhéus – BA, os quais realizam a indexação das mudas de bananeira no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais², situado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG.

2.4. Multiplicação/Proliferação de Brotos

Nesta fase, o objetivo principal é obter o máximo de novas brotações de bananeiras a partir dos explantes estabelecidos inicialmente. Portanto, decorrido o período de estabelecimento *in vitro* (30 a 45 dias), os ápices caulinares, que não possuem contaminação visível e cujo resultado do teste para vírus tenha sido negativo, são utilizados para a indução de novas brotações axilares. Para isso, primeiramente realiza-se uma limpeza das partes oxidadas e, posteriormente, um seccionamento transversal da parte superior, para eliminar o excesso de tecido foliar, seguido de um corte longitudinal dos ápices, com o objetivo de quebrar a dominância da gema apical e forçar o desenvolvimento de novas brotações laterais. As partes resultantes são então transferidas para novo meio de cultura, suplementado com regulador de crescimento, geralmente citocininas, e mantidas em sala de crescimento até se desenvolverem (Fig. 6a), fato que acontece normalmente em quatro semanas.

Após algumas semanas, os explantes desenvolvidos (Fig. 6b e Fig.6c) são submetidos a uma limpeza dos tecidos oxidados e cortes da parte aérea, sendo transferidos para novo meio de cultura até a emissão de novas brotações. Subseqüentemente, as múltiplas brotações axilares formadas sofrem novamente a retirada do excesso de tecidos oxidados, corte da parte aérea, individualização e subdivisão longitudinal dos brotos maiores e transferência para novo meio, até que os mesmos procedimentos sejam novamente demandados (Fig. 7).

Essas sucessivas transferências, conhecidas como subcultivos ou repicagens, são espessadas entre si, em média de quatro a cinco semanas, e devem ser realizadas até no máximo seis vezes para evitar o aparecimento de variantes somaclonais. Os subcultivos são também necessários devido ao

²Credenciado pelo Registro Nacional de Sementes e Mudas (Renasem), com inscrição e credenciamento de número 01311/2006.

esgotamento dos constituintes do meio de cultura (carboidrato, sais minerais e vitaminas), além do acúmulo de compostos como o etileno e alguns polifenóis que podem ser deletérios à cultura.

Fotos: a (Empresa de Biotecnologia Vegetal); b (Hermínio S. Rocha); c (Lionny E. Scherwinski-Perera)

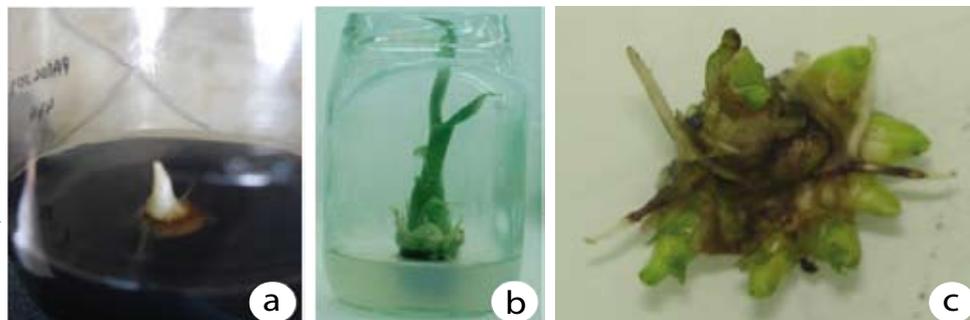


Fig. 6. Aspecto geral de ápice caulinar estabelecido in vitro (a), após 30 a 40 dias de desenvolvimento (b) e após corte longitudinal (ver detalhes das multibrotações formadas) (c).

Fotos: Empresa de Biotecnologia Vegetal

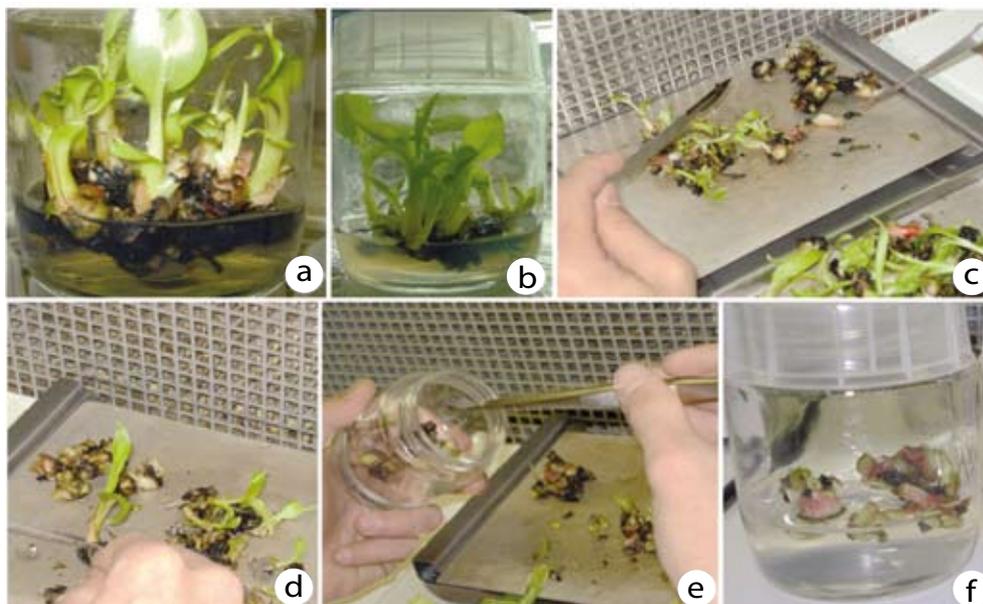


Fig. 7. Aspecto geral da fase de multiplicação (repicagens): (a, b) explantes em multiplicação; (c, d) limpeza dos tecidos oxidados, corte da parte aérea, incisões e subdivisão dos explantes; (e, f) transferência dos explantes para restabelecer novos ciclos de multiplicação.

De modo geral, a indução de brotações ocorre após a primeira repicagem. No entanto, efetivamente, as maiores taxas de multiplicação são observadas entre o terceiro e o sexto subcultivo obtendo-se, normalmente, uma multiplicação em crescimento por progressão geométrica, de modo que a partir de um único ápice caulinar estabelecido in vitro é possível obter centenas de novas brotações, ao final de alguns meses, o que dependerá do protocolo,

habilidade dos operadores e do genótipo empregado. Em contraste, na fase de estabelecimento e subcultivo 1, verifica-se baixa ou nula indução de brotações, o que pode estar relacionado à adaptação do explante às condições de cultivo ou ainda aos maiores índices iniciais de oxidação do material estabelecido in vitro.

Um fator imprescindível nessa fase diz respeito à habilidade de cada técnico para extrair as bainhas foliares dos explantes e expor as gemas laterais (axilares), bem como realizar as incisões. Associada a estes procedimentos está a suplementação exógena do meio de cultura com citocininas, geralmente o N⁶-benzilaminopurina (BAP). O BAP é um regulador de crescimento do grupo das citocininas que promove a indução de múltiplas brotações pela quebra da dominância da gema apical. Atualmente é a citocinina mais utilizada para a multiplicação da bananeira in vitro, porém a concentração "ideal" é genótipo-dependente, sendo as maiores taxas de multiplicação obtidas com concentrações entre 2,5 e 5 mg · L⁻¹. Todavia, outras citocininas têm sido empregadas com certo êxito para micropropagar diversos genótipos de *Musa* spp., incluindo o isopenteniladenina (2ip), zeatina (ZN), cinetina (KIN) e mais recentemente o tidiazuron (TDZ), este último em concentrações bem inferiores àsquelas do BAP (ARINAITWE et al., 2000; GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

Vários têm sido os trabalhos reportados na literatura (HIRIMBUREGAMA; GAMAGE, 1997; OLIVEIRA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2001), demonstrando que diferenças entre genótipos em relação à capacidade proliferativa (taxa de multiplicação) podem ocorrer até mesmo entre clones (OLIVEIRA et al., 2006). Da mesma forma, estudo conduzido por Debiasi et al. (2002), com o objetivo de correlacionar diferentes graus de dominância apical in vivo com a capacidade proliferativa in vitro da bananeira, nas cultivares Nanicão (AAA) e Grande Naine (AAA), evidenciou uma influência significativa deste fator com o comportamento in vitro dos explantes. De acordo com estes autores, a utilização de mudas oriundas de plantas matrizes com baixo grau de dominância apical in vivo proporcionou a maior taxa média proliferativa (7,51) para a cv. Grande Naine, enquanto aquelas provenientes de bananeira com grau médio de dominância apical in vivo resultaram na maior taxa média proliferativa (10,96) para a cv. Nanicão.

2.5. Alongamento/Enraizamento dos Brotos

Esta fase é importante, pois de modo semelhante ao que se verifica em condições de campo as raízes podem estimular o crescimento das culturas in vitro e ex vitro (processo de aclimatização). Dessa forma, a obtenção de um sistema radicular bem formado e funcional irá promover a sobrevivência e o crescimento ex vitro das plantas. Entretanto, na literatura, encontram-se ainda muitas discordâncias sobre a existência ou não de conexão vascular entre as raízes formadas in vitro e a parte aérea (funcionalidade das raízes) (APTER et al., 1993a, b; DÍAZ-PEREZ et al., 1995; ROMANO; MARTINS-LOUÇÃO, 2003). Apesar do pouco entendimento no que diz respeito à qualidade das raízes

oriundas do cultivo *in vitro*, elas farão a fixação das plantas no substrato e serão responsáveis pela nutrição inicial das plantas sob condições *ex vitro*, até que novas raízes mais funcionais sejam formadas posteriormente.

Durante a fase de multiplicação, o uso freqüente de citocininas no meio de cultura, com o objetivo de incrementar as taxas de multiplicação, resulta muitas vezes em brotações de tamanho reduzido, com poucas raízes ou mesmo desprovidas dessas, devido ao efeito cumulativo do regulador de crescimento – habituação. Como consequência, uma fase intermediária de alongamento e/ou enraizamento é necessária e tem sido amplamente reportada na literatura. Neste caso, o meio geralmente é de consistência semi-sólida, podendo ser suplementado com auxinas exógenas como ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) (MOLLA et al., 2004), embora pouco recomendados em razão de poderem causar variação somaclonal do material. Adicionalmente, outras substâncias que favoreçam a formação de raízes como o carvão ativado (GÜBBUK; PEKMEZCI, 2004; COSTA et al., 2006) e sulfato de adenina (MIYATA et al., 2006) podem ser utilizadas para o enraizamento/alongamento *in vitro* de bananeiras. Outros fatores como a redução das concentrações de sais do meio, o genótipo e a concentração de sacarose também devem ser considerados para melhorar o enraizamento.

Tem sido relatada a importância da adição de sacarose no meio de cultura, principalmente visando ao acúmulo de reservas nas plantas para suportar as condições de estresse na fase de aclimatização. Isso porque, quando transplantadas para condições de casa de vegetação ou viveiro, as plantas possuem apenas água e sais minerais para sustentarem seu crescimento imediato, necessitando assim de reservas, como o amido, na emissão de novas folhas e raízes (ARAGON et al., 2006), especialmente nas primeiras semanas após o transplante para o substrato. Contudo, deve-se considerar que diferentes genótipos, sob várias condições de cultivo, poderão desenvolver-se de maneira distinta.

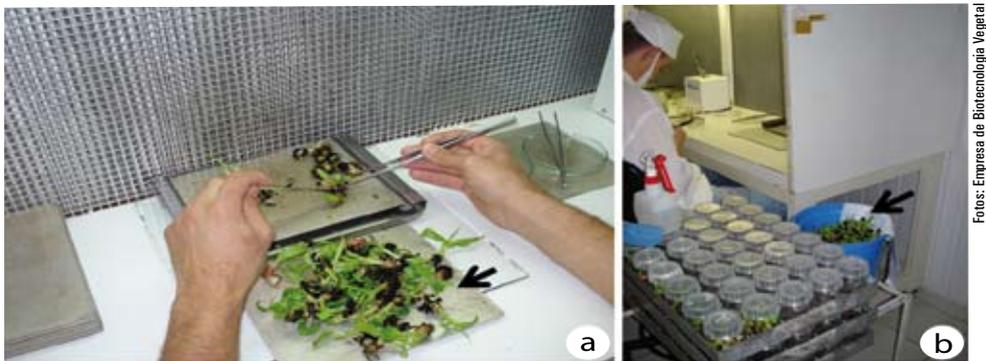
Nesse contexto, Costa et al. (2008), avaliando como a permanência de brotações de bananeira em meio de enraizamento influencia o crescimento *in vitro* e *ex vitro* das plantas, observaram que a fase de indução de raízes *in vitro* ocorreu até os 14 dias e, após esse período, houve apenas o crescimento em tamanho das raízes. Além disso, foi constatado que a sobrevivência das plantas em casa de vegetação atingiu 100% após 21 dias de enraizamento, havendo perdas apenas para as cultivares Preciosa (AAAB) aos 7 dias (20%) e Japira (AAAB) aos 7 (13%) e 14 dias (7%) de cultivo em meio de enraizamento, possivelmente por causa do reduzido desenvolvimento da parte aérea (muitas vezes apresentando apenas uma folha expandida) e rizoma pouco definido com fraca iniciação de primórdios radiculares, sugerindo baixa quantidade de reservas.

Dessa forma, pode-se afirmar que a fase de enraizamento *in vitro* em bananeira é necessária, principalmente se as brotações oriundas da etapa de multiplicação tiverem tamanho reduzido. Entretanto, pode-se otimizar o tempo de enraizamento *in vitro* sem, contudo, causar perdas significativas de plantas.

Como conseqüência, há a possibilidade de reduzir os gastos com energia e mão-de-obra, pois as culturas permaneceriam em laboratório por menor período de tempo.

Quanto ao uso de carvão ativado, estudos têm mostrado efeitos positivos desta substância sobre o enraizamento e vigor de brotações de bananeira (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004; COSTA et al., 2006). No caso do enraizamento, esse efeito é atribuído ao fato de que o carvão simula a condição de escuro na qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor, além de possuir efeito diluidor, retendo parte dos elementos que compõem o meio e adsorvendo compostos fenólicos inibidores do enraizamento.

Em contraste à realização de uma fase de enraizamento *in vitro*, existe a possibilidade ainda de que brotações bem desenvolvidas, já diferenciadas em plantas, possam ser diretamente removidas dos frascos durante os subcultivos, separadas das demais e submetidas à aclimatização. Tal fato vem sendo realizado comercialmente com sucesso e tem a vantagem de eliminar a fase de alongamento/enraizamento (Fig. 8). Fato semelhante é reportado por Oliveira e Silva (1997) com as cultivares Nanicão (AAA) e Grande Naine (AAA), em que o aumento para 45 dias no sexto subcultivo possibilitou a retirada direta de cerca de 35% do material para a casa de vegetação, sem passar pela fase de enraizamento. Ainda segundo esses autores, plantas que *in vitro* possuíam parte aérea alongada e rizoma definido tiveram 98% de pegamento na aclimatização, mesmo desprovidas de raízes, o que sugere a possibilidade de se induzir o enraizamento de bananeiras micropropagadas em substrato, desde que observadas as condições e os cuidados na aclimatização.



Fotos: Empresa de Biotecnologia Vegetal

Fig. 8. Plantas sendo retiradas diretamente da fase de multiplicação para aclimatização: a) separação das plantas maiores das demais brotações; b) plantas sendo colocadas em recipientes (seta) para posterior aclimatização.

Em relação à funcionalidade das raízes *in vitro*, observações anatômicas conduzidas por Costa (2007) mostraram existir conexão vascular em plantas de bananeira cultivadas em meio contendo ANA ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), sendo esta conexão mais acentuada em plantas aclimatizadas. Este resultado está de acordo com outros trabalhos citados na literatura, para os quais nenhuma limitação

do sistema radicular formado em meio de cultura foi verificada em relação à sobrevivência e performance *ex vitro* das mudas obtidas. De fato, se as raízes presentes nas plantas de bananeira micropropagadas não tivessem função alguma, haveria certamente elevadas perdas durante a fase de aclimatização.

2.6. Meio de Cultura e Condições de Cultivo

A escolha de um meio de cultura apropriado para cada espécie vegetal a ser micropropagada e sua adequação às diferentes fases de cultivo é condição básica para o desenvolvimento de protocolos bem sucedidos. Em geral, o meio de cultura é constituído basicamente por substâncias essenciais ao crescimento e desenvolvimento dos explantes, a saber: água, macro e micronutrientes, aminoácidos, vitaminas, carboidrato(s), reguladores de crescimento³, agentes geleficantes (ágar ou Phytigel), entre outras. Contudo, para uma melhor resposta morfogênica dos explantes (ápices caulinares, meristemas, brotações, etc.), o mais adequado é desenvolver um meio de cultura baseado nas exigências de cada espécie ou cultivar, tomando por base análises nutricionais do genótipo em questão.

Para a bananeira, vários são os meios de cultura, suas concentrações e as variações de seus componentes (SOUZA; GONÇALVES, 1996). Porém, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais utilizado, independente da fase de cultivo *in vitro*. Em geral, o que se observa freqüentemente é a adequação a cada fase do cultivo *in vitro* (estabelecimento, multiplicação ou enraizamento) da concentração de sais (principalmente macronutrientes), sacarose e utilização ou não de reguladores de crescimento (citocininas e/ou auxinas). No caso dos reguladores de crescimento, estes podem estar associados, variando na relação citocinina:auxina, dependendo da resposta morfogenética demandada. Quanto à consistência, a maioria dos protocolos tem utilizado meios semi-sólidos, sendo o uso de meio líquido condicionado à utilização de agitadores ou biorreatores. O pH do meio é normalmente ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da adição do agente geleificante, sendo a autoclavagem realizada por 15-20 minutos a 121°C e 1,3 atm de pressão.

Quanto às condições de cultivo ou incubação, o padrão adotado tem sido o de salas de crescimento climatizadas, dotadas de iluminação artificial (fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares), com fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Fig. 9a e Fig. 9b). Entretanto, podem ocorrer modificações no ambiente de cultivo, principalmente na fase de estabelecimento, na qual comumente se mantém os ápices caulinares no escuro por alguns dias, visando sobretudo reduzir os níveis de oxidação. Adicionalmente, alguns

³São análogos sintéticos dos hormônios vegetais. Têm a mesma função dos hormônios, porém são sintetizados em laboratório e não pela planta, além de ser requeridos em maiores quantidades para obter resposta semelhante (Termignoni, 2005). São exemplos, o N⁶-benzilaminopurina (BAP) e Tidiazuron (TDZ) (grupo das citocininas); ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) (grupo das auxinas).

trabalhos têm reportado à utilização da luz solar em salas de crescimento (Fig. 9c–e), seja na fase de multiplicação (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999, 2001; SENDIN, 2001) ou enraizamento *in vitro* (ROCHA, 2005; COSTA, 2007), além do cultivo fotoautotrófico (NGUYEN; KOZAI, 2001).



Fotos: a, b (Empresa de Biotecnologia Vegetal); c, d, e (Hermínio Souza Rocha)

Fig. 9. Vista geral da sala de crescimento utilizada para a micropropagação de bananeiras: (a, b) sala de crescimento de luz artificial – Empresa de Biotecnologia Vegetal; (c, d, e) sala de crescimento de luz solar/natural – Companhia de Promoção Agrícola, biofábrica localizada junto à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA.

2.7. Contaminantes e Oxidação Fenólica *in Vitro*: Ocorrência e Estratégias de Controle

2.7.1. Contaminação

É principalmente na fase de estabelecimento que se devem detectar e descartar as culturas contaminadas. Todavia, dependendo do tipo de contaminante (exógenos ou endógenos) este procedimento também pode ser necessário em fases posteriores como a multiplicação decorrente de erros de manipulação. As contaminações por bactérias têm sido mais drásticas que por fungos por causar perdas danosas, como tempo e recursos financeiros ou genéticos pela eliminação de frascos contaminados e o risco de disseminação durante os subcultivos subseqüentes, inviabilizando assim o processo de micropropagação. Nesse contexto, o uso de agentes geleificantes de boa qualidade como o Phytigel pode promover a rápida identificação e eliminação do material contaminado e com isso evitar a sua disseminação (OLIVEIRA; SILVA, 1997; PEREIRA et al., 2003).

De modo geral, as taxas e o tipo de contaminação na fase de estabelecimento são bastante variáveis e estão sob a influência de diversos fatores, tais como, a época de coleta dos explantes no campo, o estado sanitário das plantas matrizes, a correta execução do processo de assepsia e os agentes desinfestantes utilizados. No entanto, diversos trabalhos científicos têm reportado taxas de contaminação entre 0% e 60% durante a fase de estabelecimento, as quais tendem a se reduzir durante as fases subsequentes. Geralmente, a predominância tem sido de bactérias que podem ser de diferentes espécies (OLIVEIRA et al., 2006).

Para a micropropagação de bananeiras, a ocorrência de contaminações tem sido considerada um problema em potencial, principalmente as bacterianas. Isso porque embora sejam feitas desinfestações superficiais antes do estabelecimento in vitro, bactérias podem ser observadas de 7 a 15 dias após as manipulações, havendo até mesmo relatos de morte dos explantes (HABIBA et al., 2002; PEREIRA et al., 2003).

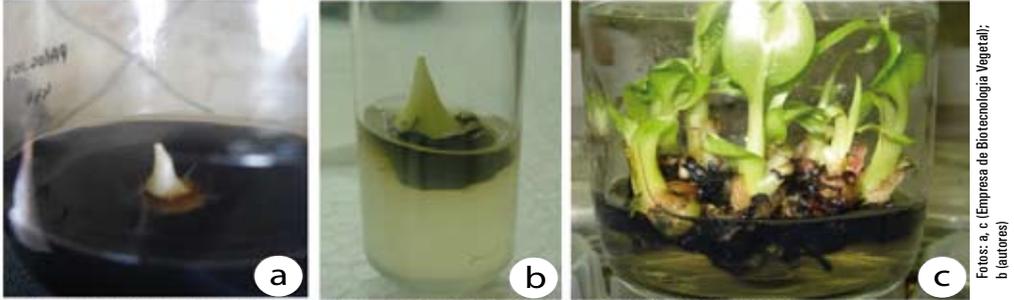
Avaliando protocolos de desinfestação em diferentes cultivares de bananeira, Nietsche et al. (2006) verificaram ao final da fase de estabelecimento, um total de 37,5% dos tubos contaminados para as cultivares avaliadas. As maiores porcentagens de contaminação ocorreram na 'Prata Anã' e 'SH3640', com 62,5% e 57,1%, respectivamente por bactérias do tipo Gram negativa, enquanto para a 'FHIA-18' grande parte das bactérias detectadas foi do tipo Gram positiva. De acordo com os autores, as bactérias Gram positivas são do tipo não-fitopatogênicas freqüentemente encontradas no sistema digestivo do próprio manipulador. Quanto aos protocolos utilizados, o tratamento dos explantes com solução de fungicida (Carbendazin 3,3%), álcool 92,8° GL e hipoclorito de sódio (2%) foi o mais eficaz para a desinfestação de todas as cultivares.

2.7.2. Oxidação por Compostos Fenólicos

Embora o processo de micropropagação seja bem estabelecido e proporcione êxito para a maioria dos genótipos comerciais de bananeira, ainda há fatores que limitam em parte esta técnica para alguns deles, sobretudo nas fases iniciais do cultivo in vitro. O principal deles é a ocorrência excessiva de oxidação por compostos fenólicos nas partes excisadas dos explantes, a qual interfere no desenvolvimento inicial destes, na taxa de multiplicação e, em casos extremos, pode levá-los à morte.

Tal oxidação é caracterizada pelo escurecimento dos tecidos excisados e do meio de cultivo (Fig. 10), ambos resultantes da liberação, acúmulo de polifenóis e produtos da oxidação, precursores da síntese de lignina, como melanina e suberina (ANDRADE et al., 2000; VAN WINKLE et al., 2003) e que obstruem o tecido oxidado. Além disso, a oxidação dos compostos fenólicos por polifenases pode produzir substâncias tóxicas que normalmente inibem o crescimento dos explantes (SATO et al., 2001). Sua ocorrência e intensidade estão associadas principalmente ao genótipo, especialmente constituídos por genomas 'B' (*Musa balbisiana*) (HIRIMBUREGAMA; GAMAGE, 1997), bem como às condições de cultivo (constituição do meio de cultura, presença de

luz na fase de estabelecimento, etc.). Em geral, os níveis mais acentuados de oxidação ocorrem na fase de estabelecimento, nos primeiros subcultivos e durante os dias iniciais de cada subcultivo, de modo que quanto maior a proporção de rizoma nos explantes mais acentuado pode ser o escurecimento causado por fenóis.



Fotos: a, c (Empresa de Biotecnologia Vegetal);
b (autores)

Fig. 10. Aspecto geral dos ápices caulinares estabelecidos e culturas em fase de multiplicação, evidenciando a oxidação por fenóis: a) ápice caulinar em meio contendo carvão ativado; b) ápice caulinar em meio desprovido de carvão ativado; c) material em multiplicação.

Nesse sentido, estudo realizado por Hirimburegama e Gamage (1997), visando avaliar diferentes constituições genômicas sobre os níveis de oxidação fenólica *in vitro* de ápices caulinares de bananeira, reporta que embora todas as cultivares tenham apresentado escurecimento dos tecidos excisados, grandes variações foram observadas quanto à sua intensidade. De acordo com os autores, as cultivares contendo o genoma 'B' mostraram maior oxidação, superior a 75% da superfície dos explantes do grupo genômico BB e entre 50% e 65% para o grupo ABB, a qual ocorreu 2 dias após o estabelecimento *in vitro* e necessitou de limpeza dos tecidos escurecidos e rápida transferência dos explantes para novo meio. Por outro lado, genótipos apresentando pouco ou nenhum genoma 'B' (AAB, AAA, AAAA) tiveram menor índice de oxidação, inferior a 25% (AAA e AAAA) e entre 25% e 50% (AAB), a qual foi superada após duas limpezas sucessivas. Os autores observaram também que a ocorrência de elevada oxidação afetou diretamente o início das brotações axilares e também a taxa de multiplicação durante os subcultivos.

Algumas estratégias podem ser utilizadas com o propósito de reduzir os níveis de oxidação, entre elas: a suplementação do meio com substâncias antioxidantes (carvão ativado – Fig. 10, ácido ascórbico, entre outras), ou o pré-tratamento dos explantes com alguns destes antioxidantes antes do estabelecimento *in vitro*, manutenção das culturas no escuro por alguns dias após o estabelecimento dos ápices caulinares, transferências periódicas dos explantes para meio de cultura novo e/ou limpeza das partes (tecidos) fenolizadas (Fig. 11). Todavia, a adição ao meio de substâncias antioxidantes nem sempre tem mostrado melhor resultado (CAMOLESI et al., 2007). Para estes autores, o pré-tratamento dos ápices caulinares da cultivar de bananeira Maçã (AAB) em

solução de $0,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido cítrico e $0,75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de citrato de potássio por 90 minutos teve efeito antioxidante em pré-tratamento, ao passo que a adição dos antioxidantes ao meio de cultivo aumentou a oxidação e diminuiu o número de brotos emitidos nos primeiros subcultivos.

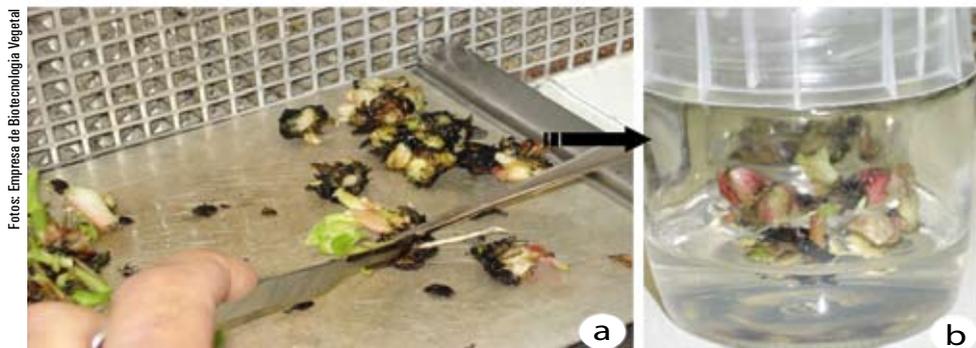


Fig. 11. Limpeza dos tecidos oxidados durante o processo de repicagem: a) retirada de partes oxidadas; b) restabelecimento dos explantes em novo meio.

2.8. Aclimatização

O sucesso final da micropropagação nas diversas espécies vegetais depende não apenas da correta condução das fases *in vitro*, mas sobretudo da capacidade das plantas produzidas em superar, sem grandes estresses, a sua transferência para condições *in vivo* (PEREIRA; FORTES, 2000; HAZARIKA, 2006). Isso porque o ambiente *in vitro*, no qual os explantes são cultivados, tem como principais características os baixos níveis de radiação, presença de carboidrato e nutrientes prontamente assimiláveis, condições assépticas e atmosfera no interior dos recipientes com alta umidade relativa e pouca ou nenhuma troca gasosa (ZACCHANI et al., 1997). Como consequência deste microambiente *in vitro*, as plantas desenvolvem características estruturais e fisiológicas pouco aptas às condições *ex vitro* (YOKOTA et al., 2007), a saber: baixa regulação da perda de água, ocasionada principalmente por pouca funcionalidade dos estômatos e camada de cera epicuticular pouco espessa e irregularmente distribuída (LAMHAMEDI et al., 2003), reduzido desenvolvimento e organização do mesófilo foliar, fraca conexão entre as raízes e a parte aérea (ROSS-KARSTEN et al., 1998; POSPÍLOVÁ et al., 1999), entre outras.

Dessa forma, uma fase de aclimatização⁴ (adaptação artificial) é geralmente requerida e considerada imprescindível com o objetivo de se evitar

⁴Alguns pesquisadores apresentam conceitos distintos com relação aos termos aclimatização e aclimatização. Segundo Preece e Sutter (1991), o termo aclimatização refere-se ao processo pelo qual as plantas ou outros organismos vivos ajustam-se ou acostumam-se a uma nova condição de clima ou situação, como resultado de um processo natural. Por outro lado, para George (1993) aclimatização é um processo regulado pela natureza, enquanto aclimatização é aquele controlado pelo homem. Portanto, para fins de micropropagação será adotado o termo aclimatização, como sendo o processo pelo qual as plantas cultivadas *in vitro* são adaptadas ao novo ambiente *ex vitro* (estufa, telado, etc.) de modo artificial, ou seja, com a interferência humana.

morte de plantas e favorecer o melhor desempenho das mudas ex vitro. É durante este período de adaptação que as modificações formadas em cultivo in vitro são corrigidas (MARIN, 2003), de modo que a planta passa do metabolismo heterotrófico para o autotrófico (ROCHA, 2005). Isto é possível porque o novo ambiente ex vitro possibilita a formação de folhas mais adaptadas e eficientes nos processos concernentes ao desenvolvimento vegetal (SANDOVAL et al., 1994), além de promover um sistema radicular mais funcional e eficiente e formação de uma densa camada de cera epicuticular. Para isso, as plantas devem ser submetidas às novas condições ambientais (estufa, casa de vegetação ou telado) de forma gradual e cercadas de cuidados, mantendo-se alta umidade e baixa luminosidade nos dias iniciais após o transplântio (Fig. 12), pois estes fatores irão favorecer o metabolismo autotrófico nas plantas produzidas. Portanto, caso não sejam tomados os devidos cuidados durante esta etapa, os resultados serão a baixa sobrevivência e inviabilidade do processo de micropropagação.

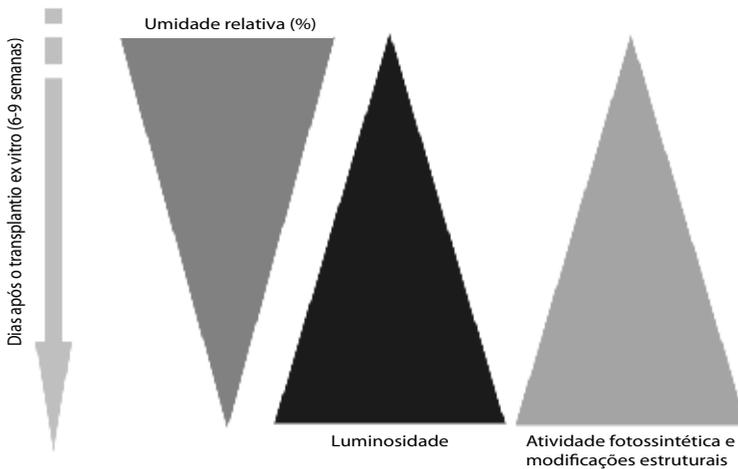


Fig. 12. Esquema geral de algumas condições fundamentais à aclimatização das plantas, evidenciando a redução gradual da umidade e aumento da irradiância em função do tempo de transplântio.

Outro aspecto a ser considerado na fase de aclimatização refere-se ao padrão de crescimento das plantas. Isso porque ao sofrer mudança abrupta de ambiente (da condição in vitro para o ex vitro), normalmente as plantas cessam ou reduzem o crescimento até que se adaptem às novas condições, o que pode levar dias ou semanas (PEREIRA; FORTES, 2000). Desse modo, a redução de perdas por morte, associada ao rápido crescimento na aclimatização, pode contribuir significativamente para que mudas micropropagadas sejam disponibilizadas aos interessados de forma mais rápida e barata. Para tanto, otimizações nas condições ambientais in vitro e ex vitro, cuidados no momento do transplântio, o correto manejo das irrigações e a escolha adequada de substratos e recipientes são fundamentais (SCHMITZ et al., 2002). No caso

dos substratos, suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem facilitar ou limitar a sobrevivência, formação de novas raízes e crescimento das plantas. Com relação à escolha dos materiais que irão compor a mistura do substrato deve-se observar também o custo e sua disponibilidade.

Em bananeira, o processo de aclimatização consiste basicamente na remoção das plantas dos frascos de cultivo, lavagem das raízes em água corrente para remover o resíduo de meio de cultivo aderido, individualização das plantas, poda das raízes, transplantio para recipientes (tubetes ou bandejas coletivas) contendo substrato adequado e transferência para casa de vegetação ou telado (Fig. 13 e 14). Em alguns casos, pode ser feita uma pré-aclimatização antes do transplantio, pela abertura dos frascos ainda na sala de crescimento por algumas horas ou mesmo dias. Outra alternativa que vem sendo reportada diz respeito à utilização da luz solar ou natural na fase de alongamento/enraizamento *in vitro*, a qual tem proporcionado bons resultados na adaptação das plantas ainda *in vitro* (*in vitro hardening*) (ROCHA, 2005; COSTA, 2007).

Fotos: Empresa de Biotecnologia Vegetal

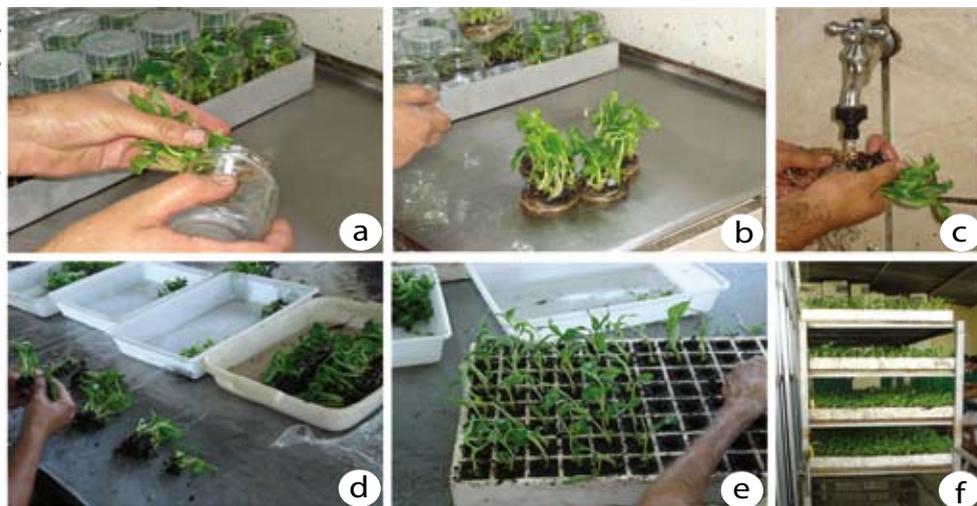


Fig. 13. Procedimentos gerais realizados antes da transferência das plantas para a casa de vegetação, estufas ou telados: (a, b) abertura dos frascos e retirada das plantas; (c) lavagem das raízes; (d) individualização; (e, f) transplantio para bandejas de isopor (128 células) contendo substrato.

Quanto aos tipos de mudas de bananeira micropropagadas, existem comercialmente diversas variações de acordo com o padrão de desenvolvimento das plantas na aclimatização (Fig. 15) (EMPRESA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2007), a saber:

- Em bandeja de polietileno preto com 24 mudas, com altura da parte aérea de 20 a 30 cm e um torrão de 6 cm³, prontas para o plantio direto a campo.
- Em bandeja de isopor com 128 mudas, com 10 a 15 cm de altura, as quais necessitam ser transplantadas para um recipiente maior por um período de 30-40 dias antes do plantio a campo.

- c) Mudanças com raiz nua, pré-aclimatizadas, possuindo entre 5 e 10 cm de altura, as quais necessitam que a aclimatização seja finalizada antes do plantio no campo. São facilmente transportadas e especialmente indicadas para transporte a longas distâncias, desde que o veículo utilizado seja rápido e eficiente.



Fig. 14. Aspecto geral das estufas de aclimatização e equipamentos usados: (a) carrinho utilizado na transferência das plantas para as estufas e (b, c, d) detalhes das estufas e das plantas.

Além desses tipos, a muda aclimatizada em tubetes (115 e 180 cm³ de capacidade) é bastante utilizada, tendo como vantagens a formação de um sistema radicular sem enovelamento das raízes e crescimento mais acelerado após o plantio em campo (Fig. 15).

O transporte das mudas é feito pelo produtor ou providenciado pela empresa produtora, independente da quantidade, por sedex, transportadora ou via aérea (EMPRESA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2007). Nesse contexto, Silva et al. (2003) reportam que o transporte a longas distâncias de mudas do tipo raiz nua, acondicionadas em caixas de isopor, pode resultar em grandes perdas de material caso os meios de transporte sejam inadequados e acarretem a demora na entrega. Para contornar essa limitação, existe o sistema de acondicionamento denominado "rocambolé", que consiste em acondicionar aproximadamente 100 mudas em tecido poroso, enroladas na forma de um rocambolé e dispostas lado a lado, de forma que, após fechado, o pacote mantém as mudas em posição vertical (Fig. 16).

3. Características Anatômicas das Plantas Micropropagadas

Até o presente momento, poucos são os trabalhos científicos publicados sobre a anatomia foliar de bananeiras micropropagadas (SANDOVAL et al., 1994; ROCHA 2005; COSTA, 2007). Em geral, as folhas de bananeira in vitro,

em casa de vegetação e a campo, apresentam estruturas básicas semelhantes, diferindo apenas quantitativamente e em relação ao grau de diferenciação dos tecidos (Tabela 1). Tais diferenças indicam a plasticidade fenotípica da espécie às condições as quais as plantas estão submetidas.



Fotos: a, b, c (Empresa de Biotecnologia Vegetal); d (Hermínio Souza Rocha)

Fig. 15. Tipos de mudas de bananeira micropropagadas: a) aclimatizadas em bandejas de isopor (128 células); b) mudas com raiz nua; c) mudas em bandejas de polietileno (24 células); d) mudas aclimatizadas em tubetes.



Fotos: Hermínio Souza Rocha

Fig. 16. Sistema de acondicionamento de mudas micropropagadas de bananeira utilizado pela Companhia de Promoção Agrícola, localizada junto à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA.

Tabela 1. Principais características da anatomia foliar de plantas de bananeira (*Musa* cv. Grande Naine, AAA) em diferentes ambientes de cultivo.

Características	In vitro¹	Aclimatização²	Campo³
Cutícula	Extremamente fina	Fina nas primeiras folhas formadas e espessa com cada nova folha	Camada espessa
Cera epicuticular	Extrusões espalhadas de pequenas partículas sobre a face abaxial da epiderme	Extensas extrusões, mais evidentes e densas na face abaxial da epiderme e menos densas na face adaxial. Espessamento mais evidente com a formação de novas folhas	Excessivas extrusões, bastante densas, algumas vezes cobrindo os estômatos (face abaxial) e com uma espessa camada na face adaxial
Epidermes	Células relativamente grandes, sinuosas e algumas vezes irregulares em tamanho; parede externa fina	Lisa, parede externa espessa	Fina, parede externa muito espessa, células relativamente pequenas
Estômatos	Presentes em ambas as faces da epiderme, porém mais abundantes na face abaxial (espécie anti-hipoestomática), com quatro células subsidiárias (estômato tetracítico)		
	Arranjo irregular, não totalmente funcional	Arranjo mais regular em fileiras	Número de células subsidiárias algumas vezes irregular; estritamente arranjadas em fileiras
	Muitos com os ostíolos parcialmente ou completamente fechados (indicando reduzida ou ausente funcionalidade)	Não reportado	Não reportado
	Tamanho médio de 38 μm em comprimento (diâmetro equatorial) e 15 μm em largura (diâmetro polar)	Não reportado	Em média, diâmetro equatorial de 27 μm e diâmetro polar de 17 μm
Cavidade subestomática	Não desenvolvida	Desenvolvimento gradual	Bem desenvolvida, alcançando através das hipodermes
Hipodermes	Células grandes, paredes finas, uma contínua camada lisa	No início da aclimatização uma camada, muito depois duas, relativamente lisas, células grandes na face adaxial da epiderme	Duas ou mais camadas de células, especialmente sobre os feixes vasculares
Mesofilo	Não diferenciado	Em início de diferenciação	Bem diferenciado
Parênquima paliçádico	Uma camada, células isodiamétricas, próximas ao parênquima esponjoso	Formação de duas camadas com tempo de aclimatização, células alongadas, ainda em contato com o parênquima esponjoso	Três a quatro camadas de células, sendo as primeiras camadas de células alongadas, separadas do parênquima esponjoso

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Parênquima esponjoso	Até duas camadas irregulares	Duas camadas, mais tarde três, dispostas irregularmente	Várias camadas de células cobrindo as paredes dos alvéolos, separadas do parênquima paliçádico
Alvéolos (cavidade)	Nenhum, apenas pequenos espaços intercelulares	Pequenos no início da aclimatização, principalmente próximo à nervura, e então grandes	Grandes, bem definidos, separando o parênquima esponjoso do paliçádico
Feixes vasculares	Bastante rudimentares, com apenas uns poucos elementos de floema e de xilema, indicando reduzida necessidade para transporte sob condições <i>in vitro</i>	Gradualmente mais desenvolvidos com a aclimatização; presença de mais elementos de floema e de xilema	Bem desenvolvidos
Esclerênquima	Nenhum ou com fibras muito ocasionais associadas aos feixes, principalmente presentes em folhas maiores e bem formadas	Número de fibras gradualmente incrementadas associadas com feixes vasculares, e presentes também na região da nervura	Fios grandes de fibras compactas, especialmente sobre a parte superior dos feixes; ou não associadas com os feixes
Espessura média	200 – 250 μm (folhas grandes)	250 – 300 μm	400 – 500 μm

¹Plantas enraizadas em meio de cultivo MS geleificado, desprovido de reguladores de crescimento, e mantidas a 16 horas de intensidade luminosa de $80 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

²Plantas aclimatizadas em ambiente com sombreamento de 15%, temperatura diurna de 32°C a 35°C e noturna de 22°C a 25°C , e 80% de umidade relativa média (variações foram observadas com cada nova folha formada durante esta fase).

³Plantas a campo.

Fonte: Adaptada de Sandoval et al., 1994.

Experimento realizado pelos autores durante o processo de adaptação das plantas micropropagadas às condições *ex vitro* demonstrou que as maiores alterações na anatomia foliar ocorrem apenas em folhas oriundas de primórdios diferenciados *ex vitro*. Além disso, foi observado que a passagem das plantas para uma condição de maior radiação, após duas ou três semanas de aclimatização, é essencial para melhorar a adaptação *ex vitro* das plantas de bananeira.

Em outro estudo, foi avaliada a contribuição dos estômatos e da cera epicuticular no controle da perda de água em bananeiras micropropagadas. Os resultados mostraram que folhas oriundas do final do enraizamento *in vitro* sob metabolismo heterotrófico apresentaram excessiva transpiração, fato atribuído à elevada densidade estomática associada à reduzida capacidade dos estômatos em restringir a perda de água e ausência de cera epicuticular. Por outro lado, a fase de aclimatização *ex vitro* foi primordial para a melhoria da funcionalidade dos estômatos e formação de uma camada de cera mais densa e melhor distribuída.

Apesar dos poucos estudos, a realização de pesquisas acerca das modificações que ocorrem nas diferentes fases da micropropagação é fundamental para otimizar os protocolos e as condições do ambiente *in vitro*, além de fornecer informações importantes sobre quais cuidados proceder visando reduzir as perdas e melhorar o crescimento das plantas após a sua exposição ao ambiente *ex vitro*.

4. Desempenho em Campo das Mudanças Micropropagadas

Para alguns pesquisadores, as mudas micropropagadas apresentam as seguintes características quando comparadas àquelas propagadas por métodos convencionais: sobrevivem mais no campo e apresentam maior crescimento nos primeiros estádios de desenvolvimento; possuem uniformidade e facilitam os tratos culturais; são mais produtivas, mostram maior precocidade e uniformidade de produção. No entanto, embora existam inúmeros estudos sobre a propagação *in vitro* da bananeira, poucos são os dados sobre o comportamento das mudas micropropagadas no campo (ÁLVARES; CALDAS, 2002).

Nesse sentido, Álvares e Caldas (2002), trabalhando com as cultivares Nanicão (AAA) e Prata-Anã (AAB), verificaram que mudas micropropagadas (10 a 15 cm) tiveram maior crescimento nos estádios iniciais de desenvolvimento em detrimento das mudas do tipo chifre (50 a 60 cm), o que foi atribuído ao fato das plantas micropropagadas já possuírem um sistema radicular ativo e área foliar fisiologicamente ativa no momento do plantio em campo. Em relação às cultivares, na 'Prata-Anã', as mudas micropropagadas apresentaram resultados significativamente superiores em todas as variáveis estudadas durante o período de desenvolvimento vegetativo, enquanto na cultivar Nanicão esta superioridade foi observada somente até o oitavo mês. Quanto à produção, não houve diferenças significativas na 'Nanicão', ao passo que a 'Prata-Anã' micropropagada foi significativamente superior à convencional.

Além disso, os autores afirmam que caso as mudas convencionais possuam qualidade fisiológica e fitossanitária adequada, é possível que a produtividade destas seja semelhante a das mudas micropropagadas. Caso contrário, as mudas oriundas do cultivo *in vitro* podem ser mais produtivas.

5. Estabilidade Genética das Mudanças Micropropagadas

Apesar da técnica de micropropagação apresentar diversas vantagens para a produção massal de mudas, podem ocorrer variações somaclonais nas plantas produzidas, impedindo o uso desta tecnologia, principalmente se forem verificadas em grau elevado. Portanto, quando se trata de propagação comercial, um dos pré-requisitos mais importantes durante a clonagem *in vitro* de qualquer espécie vegetal diz respeito à fidelidade/estabilidade genética das plantas produzidas. Entretanto, embora indesejável do ponto de vista comercial, a obtenção de variabilidade genética pode ser importante para o melhoramento de plantas, pois permite que características de interesse sejam incorporadas

em novos genótipos. Além disso, as variações têm papel importante no caso de plantas propagadas vegetativamente que possuem uma estreita base genética.

Em geral, a ocorrência de variações está comumente relacionada a situações de estresse sofridas pelas plantas, seja pelo uso inadequado de tipos e concentrações de reguladores de crescimento, ocorrência de calogênese em alguma fase de cultivo, excessivo número de subcultivos do material sob multiplicação ou devido ao longo período de cultivo em mesmo meio de cultura (GUPTA; VARSHNEY, 1999; SANTOS; RODRIGUES, 2004; MARTIN et al., 2006; VENKATACHALAM et al., 2007).

Em bananeira, o aparecimento de plantas atípicas/variantes tem sido freqüentemente reportado por alguns autores (VENKATACHALAM et al., 2007), o que pode estar associado aos inúmeros protocolos empregados, uso incorreto e/ou falta de domínio da técnica para algumas cultivares regionais. Apesar das discordâncias, é importante destacar que atualmente existem laboratórios (biofábricas), tanto no Brasil quanto em outros países, que utilizam a micropropagação com taxas de variações somaclonais nas mudas inferiores a 2%. Dessa forma, recomenda-se obter mudas de biofábricas idôneas e de conhecido respaldo.

Quando verificadas, as variações têm afetado principalmente a estatura da planta (porte baixo – nanismo – ou excessivamente alto – gigantismo), cor da folha (variegada semelhante a um mosaico virótico), forma (ondulações laterais), cerosidade (ausência) e arquitetura das folhas (roseta), além de influenciar a forma dos cachos (SMITH, 1988; ISRAELI et al., 1991; SANTOS; RODRIGUES, 2004), podendo diferir entre os genótipos. Em relação à taxa de variação somaclonal, existem trabalhos relatando diferenças entre genótipos de bananeira para um mesmo protocolo de cultivo *in vitro*, de maneira que aqueles com maior nível de ploidia podem apresentar maior instabilidade genética. Assim, num processo de multiplicação *in vitro* os tetraplóides exigem atenção diferenciada (SOUZA et al., 1997).

No que diz respeito aos fatores apontados como responsáveis pelas variações, estudo conduzido por Rodrigues et al. (1998), no Vale do Ribeira (SP), mostrou que a cultivar Nanicão (AAA) apresentou crescimento da taxa de variação somaclonal com aumento do número de subcultivos *in vitro*, ocorrendo as primeiras variações a partir do nono subcultivo. Já Santos e Rodrigues (2004), trabalhando com a 'Pacovan' (AAB), verificaram que até o quinto subcultivo nenhuma variante foi observada, enquanto no sexto foram detectadas variantes (4,8%), atingindo o máximo de 5,8% em nove subcultivos.

Nesse sentido, alguns procedimentos estratégicos podem ser adotados visando controlar e reduzir as variações genéticas nas plantas micropropagadas de bananeira, a saber: descarte de tecidos com calos, eliminação de possíveis plantas atípicas (fora do padrão), adequação dos níveis exógenos de citocinina e do tempo de permanência das culturas em mesmo meio de cultivo, etc.

Quanto à forma de detecção, pode-se realizá-la por meio de observações morfológicas visuais das plantas (fenótipo), testes citológicos e moleculares (genótipo) ou a associação de ambos, tanto durante a fase *in vitro* quanto *ex vitro* (aclimatização ou campo). No caso do monitoramento ainda nas diferentes

fases de cultivo in vitro, pode-se reduzir a quantidade de plantas anormais em campo a níveis aceitáveis (SOUZA et al., 1997). Isso é importante uma vez que alguns tipos de variações podem se manifestar meses após o plantio ou floração (SANTOS; RODRIGUES, 2004) e, com isso, provocar prejuízos aos produtores.

O monitoramento da estabilidade genética por métodos moleculares tem sido realizado por diferentes técnicas, entre as quais, a caracterização por meio de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), microssatélite ou SSR (Simple Sequence Repeats) (VENKATACHALAM et al., 2007), além de isoenzimas (EL-DOUGDOUG et al., 2007). Entretanto, a análise utilizando iniciadores RAPD apresenta como principal limitação a baixa repetibilidade, o que não ocorre com o SSR (JESUS et al., 2006).

6. Progressos na Micropropagação de Bananeira

Em geral, a micropropagação de bananeira é realizada sob condições heterotróficas, nas quais os explantes se desenvolvem em meio contendo sacarose e nutrientes prontamente disponíveis, sob baixas intensidades luminosas, além de uma atmosfera apresentando baixa ou nenhuma troca gasosa, reduzidos níveis de dióxido de carbono (CO_2) e elevada umidade relativa (próxima de 100%).

No entanto, algumas estratégias têm sido pesquisadas e adotadas nos últimos anos com o objetivo de modificar o ambiente de cultivo in vitro e, conseqüentemente, melhorar a qualidade das plantas produzidas e/ou reduzir os custos de produção. Entre as mais importantes, destacam-se a redução, ou mesmo, eliminação da fonte de carbono (sacarose), aumento das trocas gasosas, enriquecimento artificial com CO_2 e aumento da intensidade luminosa (artificialmente ou utilizando a luz solar), empregados em associação ou isoladamente (cultivo fotoautotrófico ou fotomixotrófico) (NAVARRO et al., 1994; KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999; NGUYEN; KOZAI, 2001; SENDIN, 2001; COSTA, 2007).

6.1. Uso da Luz Solar

A substituição das lâmpadas fluorescentes comumente utilizadas nas salas de crescimento pela luz natural, associada ou não à redução nos níveis exógenos de sacarose, é um dos mais importantes avanços e tem mostrado resultados promissores e aplicáveis (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999, 2001; SENDIN, 2001; ROCHA, 2005; COSTA, 2007). Tal relevância é justificada pelo alto custo da iluminação artificial nas salas de crescimento, o qual pode representar 65% do total de energia elétrica utilizada nos laboratórios de cultura de tecidos de plantas (STANDAERT DE METSENAERE, 1991). Em geral, as principais vantagens advindas do emprego da luz solar incluem a eliminação dos custos com iluminação artificial, uso de instalações mais simplificadas e redução dos estresses no momento do transplantio ex vitro (ERIG; SCHUCH, 2005).

Associado a estas vantagens, tem-se o fato da bananeira ser uma espécie tipicamente tropical, podendo suportar temperaturas mais elevadas e maiores níveis de radiação, o que favoreceria e justificaria o uso da luz solar. Adicionalmente, o cultivo da bananeira sob maior intensidade luminosa ainda na fase *in vitro* pode promover melhor adaptação das plantas produzidas e, conseqüentemente, reduzir os estresses ocasionados após a exposição às condições *ex vitro*.

Entretanto, segundo Erig e Schuch (2005) a disponibilidade de luz depende das condições climáticas de cada região e varia com a estação do ano e hora do dia, o que poderia limitar a utilização desta fonte de luz em algumas regiões, como as de clima temperado. Além do mais, o emprego da luz natural em regiões com elevadas temperaturas pode necessitar de refrigeradores, o que vem sendo feito pelo uso de aparelhos de ar-condicionado.

Efeitos benéficos da luz solar durante a micropropagação de bananeira, associados a alterações na composição nutricional e física dos meios de cultura, são reportados para as cultivares Grande Naine (AAA) e Maçã (AAB), com redução de até 90% nos custos de produção das mudas (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999, 2001; SENDIN, 2001).

De modo semelhante, estudos conduzidos por Rocha (2005) com a cultivar Prata-Anã e por Costa (2007) com a 'Caipira' e 'Pacovan' também reportam resultados promissores da luz natural. Segundo Costa (2007) brotações de bananeira 'Caipira'(AAA) enraizadas *in vitro* sob luz natural e meio contendo sacarose ($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) proporcionaram melhor adaptação das plantas produzidas, além de melhorias nas características anatômicas (espessamento significativo dos parênquimas clorofilianos, paliçádico e esponjoso) e fisiológicas (menor perda de água após a remoção dos frascos de cultivo). Resultados similares foram obtidos em experimentos com a cultivar Pacovan, com exceção da perda de água, que não foi avaliada. Quanto ao comportamento *ex vitro* das plantas produzidas em ambiente de luz natural, ambas as cultivares (Caipira e Pacovan) tiveram 100% de sobrevivência e satisfatório crescimento *ex vitro*.

Em conseqüência dos resultados promissores advindos da utilização da luz solar na micropropagação de bananeira, alguns países têm utilizado esta fonte luminosa nas salas de crescimento, destacando-se alguns laboratórios de Cuba e do Brasil.

6.2. Micropropagação Fotoautotrófica

Este sistema de cultivo está relacionado ao fornecimento de condições *in vitro* mais adequadas ao crescimento e desenvolvimento autotrófico⁵ dos explantes. Para atingir esse objetivo, torna-se necessário aumentar a disponibilidade de CO_2 (pelo enriquecimento artificial ou uso de membranas permeáveis nas tampas dos frascos de cultivo), incrementar os níveis de intensidade luminosa (especialmente a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos – DFFFA), reduzir a umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo, aumentar as trocas gasosas com o ambiente *ex*

⁵Um indivíduo autótrofo é aquele capaz de sintetizar as substâncias essenciais por ele requeridas a partir de substâncias inorgânicas obtidas do seu ambiente de cultivo (RAVEN et al., 2001).

vitro, eliminar as substâncias orgânicas (como a sacarose) do meio de cultura, além de utilizar substratos fibrosos ou porosos (vermiculita), ao invés de ágar, para o enraizamento in vitro, entre outros (KOZAI, 1991; NAVARRO et al., 1994; KUBOTA; TADOKORO, 1999; KOZAI; KUBOTA, 2001; NGUYEN; KOZAI, 2001).

Entre as vantagens da micropropagação fotoautotrófica, comparada ao método convencional (heterotrófico), destacam-se: melhoria nas características fisiológicas e estruturais e por consequência na qualidade e performance (in vitro e ex vitro) das plantas produzidas; redução dos riscos de contaminação microbiana pela remoção da sacarose do meio; diminuição do estresse após a remoção das plantas dos frascos de cultivo e aclimatização; eliminação dos custos com iluminação e com reparos e manutenção, no caso de se usar luz solar ou natural; e redução das perdas de material por contaminação (NGUYEN; KOZAI, 2001; ZOBAYED et al., 2001; AFEEN et al., 2002).

Apesar das vantagens, observam-se, relativamente, poucos trabalhos enfocando o sistema fotoautotrófico no cultivo in vitro de bananeiras (NAVARRO et al., 1994; NGUYEN et al., 1999; NGUYEN; KOZAI, 2001) ou algumas condições que permitam reduzir a dependência heterotrófica dos explantes cultivados in vitro (ROCHA, 2005; COSTA, 2007). Nesse sentido, Navarro et al. (1994) demonstraram que condições como o incremento na intensidade luminosa e na ventilação dos recipientes de cultivo facilitaram o transplantio ex vitro, ao passo que o aumento na concentração de CO₂ in vitro e intensidade luminosa possibilitou significativamente maior matéria seca e área foliar. Em contraste, não foi observada diferença significativa entre o cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico quanto ao ganho de matéria seca ou para a razão matéria seca de brotos e raízes, ao final da fase de enraizamento de bananeira.

Já Nguyen e Kozai (2001) verificaram que brotações de bananeira cultivadas em sistema fotoautotrófico apresentaram maiores taxas de multiplicação, incremento na atividade fotossintética e taxa fotossintética líquida, principalmente quando a concentração de CO₂ ($1.340 \pm 100 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), intensidade luminosa ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e trocas gasosas ($3,9 \cdot \text{h}^{-1}$) foram aumentadas.

7. Considerações Gerais e Perspectivas Futuras

Hoje, os estudos de micropropagação da bananeira são bem estabelecidos, com resultados práticos comprovados, o que proporcionou um aumento significativo no uso desta tecnologia para a produção comercial de mudas certificadas, tanto por pequenos produtores quanto por aqueles mais tecnificados.

Estima-se que a demanda por mudas ainda deve continuar crescente, especialmente em virtude das mudanças no sistema de produção de material propagativo e adoção de programas de produção integrada de frutas. Nesse

sentido, embora a micropropagação seja considerada um método bem estudado em bananeira, é imprescindível realizar pesquisas que reduzam os custos de produção sem, no entanto, afetar a qualidade genética e fitossanitária das mudas. Isso é importante, uma vez que pode possibilitar uma maior difusão deste tipo de tecnologia por pequenos produtores, que têm na cultura da banana uma fonte de renda e sustento.

Com esse intuito, estudos envolvendo o emprego de sistemas automatizados, como os biorreatores de imersão temporária (BIT), o cultivo fotoautotrófico, além do uso da luz solar, destacam-se como alternativas promissoras à melhoria da qualidade das mudas obtidas, com redução do custo final de produção. Além disso, percebe-se um crescente interesse em pesquisas que visem entender melhor os processos fisiológicos e estruturais decorrentes do cultivo *in vitro*, o que irá favorecer e otimizar os protocolos.

Outra perspectiva diz respeito à necessidade de adequar protocolos de micropropagação para novos genótipos resistentes a doenças e pragas, os quais têm sido lançados pelos centros de pesquisa e apresentam potencial de adoção, principalmente em regiões que têm sido severamente afetadas pela sigatoka-negra, sigatoka-amarela e mal-do-panamá.

8. Agradecimentos

À Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda., por ter cedido as figuras de sua linha de produção para ilustrar este trabalho, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio ao grupo de pesquisa, e a Hermínio Souza Rocha pela criteriosa revisão técnica e científica do texto.

9. Referências

AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, London, v. 90, p. 11-19, 2002.

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

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodouon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

APTER, R. C.; McWILLIAMS, E. L.; DAVIES JUNIOR., F. T. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian Jasmine (*Trachelospermum asiaticum*) I. Comparative morphology. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 118, p. 902-905, 1993a.

APTER, R. C.; DAVIES JUNIOR, F. T.; MCWILLIAMS, E. L. In vitro and ex vitro adventitious root formation in Asian Jasmine (*Trachelospermum asiaticum*) II. Physiological comparisons. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 118, p. 906-909, 1993b.

ARAGÓN, C.; ESCALONA, M.; CAPOTE, I.; PINA, D.; CEJAS, I.; RODRÍGUEZ, R.; NOCEDA, C.; SANDOVAL, J.; ROELS, S.; DEBERGH, P.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L. Metabolic importance of starch in the acclimation of plantain 'CEMSA ¾' (AAB) plants. **Infomusa**, v. 15, n. 1-2, 2006.

ARINAITWE, G.; RUBAIHAYO, P. R.; MAGAMBO, M. J. S. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 86, p. 13-21, 2000.

BRIOSO, P. S. T.; CORDEIRO, Z. J. M.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W.; PIMENTEL J. P.; FIGUEIREDO, A. R. Infecção mista em bananeiras pelos vírus do mosaico do pepino ("*Cucumber mosaic virus*" – CMV) e da risca da bananeira ("*Banana streak virus*" – BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 257-259, 2000.

CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T. de; NEVES, C. S. V. J. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira maçã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007.

COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grande Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, ago. 2006.

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

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; RODRIGUES, F. A.; MIYATA, L. Y. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 28-35, 2008.

CROUCH, J. H.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 1998.

DEBIASI, C.; ZAFFARI, G. R.; SALERNO, A. R.; GUERRA, M. P. Correlação entre a capacidade proliferativa *in vitro* e a dominância apical *in vivo* da bananeira cvs. Grand Naine e Nanicao. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 597-600, 2002.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, n. 3, p. 435-440, 1995.

DONATO, S. L. R.; SILVA, S. de O.; FILHO, O. A. L.; LIMA, M. B.; DOMINGUES, H.; ALVES, J. da S. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.) em dois ciclos de produção no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 139-144, abr. 2006.

EL-DOUGDOUG, Kh. A.; EL-HARTHI, H. M. S.; KORKAR, H. M.; TAHA, R. M. Detection of somaclonal variations in banana tissue culture using isozyme and DNA fingerprint analysis. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 7, p. 622-627, 2007.

EMPRESA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL. Disponível em: <<http://www.multipianta.com.br>>. Acesso em: 11 out. 2007.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, jul./ago. 2005.

FIGUEIREDO, D.; MEISSNER FILHO, P.; SILVA NETO, S.; BRIOSO, P. Detecção e análise da variabilidade de seqüências do *Banana streak virus* (BSV) em Bananeiras no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 118-123, 2006.

FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. PCR *multiplex* para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa Phytopathológica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 229-232, 2007.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1. the technology**. 2. ed. [New York]: Exegetics Ltd. Hardcover, 1993. 786 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In.: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v. 1, p. 183-260.

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

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. Molecular markers for genetic fidelity during micropropagation and germplasm conservation. **Current Science**, v. 76, p. 1308-1310, 1999.

HABIBA, U.; REZA, S.; SAHA, M. L.; KHAN, M. R.; HADIUZZAMANPLANT, S. Endogenous Bacterial Contamination During *In vitro* Culture of Table Banana : Identification and Prevention. **Plant Tissue Culture**, v. 12, n. 2, p. 117-124, 2002.

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

HIRIMBUREGAMA, K.; GAMAGE, N. Cultivar specificity with respect to *in vitro* micropropagation of *Musa* spp. (banana and plantain). **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 72, n. 2, p. 205-211, Mar. 1997.

ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; LAHAV, E. Qualitative aspects of somaclonal variants in banana propagated by "in vitro" techniques. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 48, n. 1-2, p. 71-88, 1991.

JESUS, O. N. de; CÂMARA, T. R.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. de O. e; PESTANA, K. N.; SOARES, T. L. Diferenciação molecular de cultivares elites de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1739-1748, dez. 2006.

- JUNGHANS, T. G.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. Obtenção e manuseio de explantes. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 100-114.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1999.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 66, p. 67-71, 2001.
- KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation-technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 447-469.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 525-537, 2001.
- KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, New York, v. 35, p. 296-298, 1999.
- LAMEIRA, O. A.; GOMES, A. P. R.; LOPES, S. C. **Efeito da sacarose e luminosidade sobre a germinação *in vitro* de embriões de cedro**. Manaus: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. p. 1-3. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 20).
- LAMHANEDI, M.; CHAMBERLAND, H.; TREMBLAY, F. M. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 554-561, 2003.
- LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N. E. Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak badnavirus*: implications for virus detection in *Musa* germplasm. In: International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests, 1993, Montpellier. **Proceedings**. Montpellier: Dirad-FIhor & Inibap, 1993. p. 105-113.
- MARIN, J. A. High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 616, p. 139-142, 2003.
- MARTIN, K. P.; PACHATHUNDIKANDI, S.; ZHANG, C. L.; SLATER, A.; MADASSERY, J. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v. 42, p. 188-192, 2006.
- MEISSNER FILHO, P. E.; BRIOSSO, P. S. T. Doenças causadas por vírus. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000. p. 78-81.
- MOLLA, M. M. H.; KHANAM, M. D.; KHATUN, M. M.; AL-AMIN, M.; MALEK, M. A. *In vitro* rooting and *ex vitro* plantlet establishment of BARI banana 1 (*Musa* sp.) as influenced by different concentration of IBA (indole 3-butyric acid). **Asian Journal of Plant Sciences**, Bholakpur, v. 3, n. 2, p. 196-199, 2004.

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

MIYATA, L. Y.; COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M. Otimização do cultivo *in vitro* de bananeira cv. Bucaneiro (AAAA). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. 1 CD-ROM.

NAVARRO, C.; TEISSON, C.; CÔTE, F.; GANRY, J. Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plants (*Musa* AAA, cultivar 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 60, p. 41-54, 1994.

NIETSCH, S.; MARQUES, S. V.; PEREIRA, M. C. T.; SALLES, B.; XAVIER, A. A.; FRANÇA, A. C.; LIMA, C. de; SILVA, L. S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 989-991, 2006.

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T.; NGUYEN, K. L.; NGUYEN, U. V. Photoautotrophic micropropagation of tropical plants. In: ALTMAN, A.; ZIV, M.; IZHAR, S. (Ed). **Current plant science and biotechnology in agriculture: plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 36. p. 659-662.

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

OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, S. M. L.; GUEDES, R. S.; SCHMITZ, G. C.; ALVES, L. S.; PEREIRA, J. E. S. Isolamento e identificação de bactérias endofíticas contaminantes da cultura da bananeira cultivada *in vitro* e biotestes de sensibilidade das bactérias a antibióticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio. **Anais...** Rio de Janeiro: SBF. v. 1. p. 340.

OLIVEIRA, J. P.; SCHMITZ, G. C.; SOUZA, G.; MACHADO, B. A.; PEREIRA, J. E. S. Multiplicação *in vitro* de cultivares de bananeira resistentes a doenças na Amazônia Ocidental a partir de gemas florais e caulinares. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15.; MOSTRA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 5., 2006, Rio Branco, AC. **Anais...** Rio Branco, AC: UFAC, 2006. 1 CD-ROM. p. 1-2.

OLIVEIRA, J. P.; SCHMITZ, G. C.; ALVES, B.; PEREIRA, J. E. S. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de bananeira, cv. Pacovan Ken. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio. **Anais...** Rio de Janeiro: SBF. v. 1. p. 168.

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. e. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 415-420, 1997.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. de O. e; SILVA, K. M. da; VILARINHOS, A. D. Avaliação da micropropagação de genótipos diplóides, triplóides e tetraplóides de bananeira empregando protocolo utilizado em laboratórios comerciais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 269-273, 1999.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. de O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 73-78, jan./mar. 2001.

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

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 42, p. 481-497, 1999.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishing, Cap. 5, p. 71-93, 1991.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira "Prata Anã": alterações morfoanatômicas**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

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

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

ROSS-KARSTENS, G. S.; EBERT, G.; LUDDERS, P. Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 4, p. 21-27, 1998.

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

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

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. de. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

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

SENDIN, A. P. P. M. **Micropropagação de bananeira dos cultivares maçã e Grande Naine visando a produção de mudas de baixo custo**. 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SHARMAN, M.; THOMAS, J. E.; DIETZGEN R. G. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. **Journal of Virological Methods**, London, v. 89, n. 1, p. 75-88, 2000.

SILVA, S. de O. e; GASPAROTTO, L.; MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M.; FERREIRA, C. F.; RAMOS, M. M.; JESUS, O. N. de. **Programa de melhoramento de bananeira no Brasil – resultados recentes**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2003. 36 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Documentos, 123).

SILVA-NETO, S. P. Micropropagação e controle de viroses. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 5.; WORKSHOP DO GENOMA MUSA, 1., 2003, Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p. 85-93.

SMITH, M. K. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. **Fruits**, Paris, v. 43, n. 4, p. 219-223, 1988.

SOUZA, G. M.; GONÇALVES, A. N. Otimização de meio de cultura para a bananeira (*Musa cavendishii* L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 51-59, 1996.

SOUZA, A. da S.; DANTAS, J. L. L.; SOUZA, F. V. D.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA NETO, S. P. da. Propagação. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômico e agroindustriais**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP, 1997. p. 151-195.

STANDAERT DE METSENAERE, R. E. A. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht : Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2005. 182 p.

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

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 267-274, 2007.

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

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

ZACCHANI, M.; MORINI, S.; VITAGLIANO, C. Effect of photoperiod on some stomatal characteristics of *in vitro* cultured fruit shoots. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 195-200, 1997.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; Kozai, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, New York, v. 37, p. 807-813, 2001.