

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**SEMENTES DE BANANA: RESGATE DE EMBRIÕES, DESSECAÇÃO E
CRIOPRESERVAÇÃO**

MARIANA CONCEIÇÃO MENEZES

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA - BRASIL

JULHO, 2014

SEMENTES DE BANANA: RESGATE DE EMBRIÕES, DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO

MARIANA CONCEIÇÃO MENEZES

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011

Dissertação submetida ao Colegiado do Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a JANAY ALMEIDA DOS SANTOS-SEREJO

CO-ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. FERNANDA VIDIGAL DUARTE SOUZA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2014

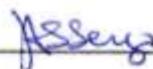
FICHA CATALOGRÁFICA

M 543s	<p>Menezes, Mariana Conceição</p> <p>Sementes de banana: resgate de embriões, dessecação e criopreservação / Mariana C. Menezes. - Cruz das Almas, BA, 2014.</p> <p>74f.; il.</p> <p>Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Janay Almeida dos Santos-Serejo Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª Fernanda Vidigal D. Souza</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB.</p> <p>1. Musa spp – Propagação in vitro. 2.Musa spp - Embrião. 3.Germinação. 4. Banana I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB. II. Título.</p> <p>CDD: 634.772</p>
--------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

COMISSÃO EXAMINADORA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECONCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MARIANA CONCEIÇÃO MENEZES



Profª. Drª. Janay Almeida dos Santos-Serejo
Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF
(Orientadora)



Profª. Drª. Claudineia Regina Pelacani Cruz
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

Prof. Dr. Edson Ferreira Duarte
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em

Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em.....

Aos meus pais, Denise e Osvaldo,
pelo incentivo e apoio em todas as
minhas decisões e escolhas.

*"A neve e as tempestades matam as
flores, mas nada podem contra as
sementes."*

Khalil Gilbran

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Denise e Osvaldo pelo apoio, incentivo, amor incondicional durante mais uma etapa da minha formação.

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas pelo incentivo, torcida, carinho e compreensão.

À minha orientadora, Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo, por compartilhar o seu conhecimento, pela dedicação, amizade, tempo e apoio que foram fundamentais na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza, pela colaboração, sugestões, amizade e apoio durante o desenvolvimento dos trabalhos.

Aos pesquisadores, estagiários e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial a Tânia Maria, Fabiana, Hélder, Lucymeire, Renata Silveira, Maria Inês, Mariane, Deyse Maria, Karen, Honorato, Juraci, Karine, Mara Kallyne, Eva e Cleilton por todo auxílio, motivação, carinho e amizade durante todos estes anos de convívio.

Aos funcionários do laboratório de Práticas Culturais, em especial ao Sr Raimundo (Bizunga) e ao Sinésio pela colaboração e auxílio fundamentais para a realização dos trabalhos.

Aos professores e colegas do Mestrado de Recursos Genéticos Vegetais da UFRB.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e à Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo apoio institucional me proporcionando a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo 1	
ADEQUAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA O RESGATE IN VITRO DE EMBRIÕES DE BANANA	27
Capítulo 2	
DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE BANANA	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
ANEXOS	66

SEMENTES DE BANANA: RESGATE DE EMBRIÕES, DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO

Autora: Mariana Conceição Menezes

Orientadora: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

RESUMO: O programa de melhoramento genético da bananeira da Embrapa utiliza duas estratégias para o desenvolvimento de híbridos de banana: a hibridização entre diploides e triploides originando tetraploides, e o cruzamento entre híbridos tetraploides com diploides visando à obtenção de triploides secundários. A obtenção de sementes por estes cruzamentos é difícil e em muitos casos a quantidade produzida é bastante reduzida. Este trabalho teve como objetivos adequar o meio de germinação in vitro de embriões zigóticos e estudar a resposta de sementes de banana à dessecação visando a criopreservação. Para a germinação in vitro dos embriões foi utilizado o meio MS sem reguladores de crescimento, MS acrescido de GA_3 ($0,035 \text{ mg.L}^{-1}$) combinado com cinco diferentes concentrações de BAP ($0,0$; $0,5$; $1,0$; $2,0$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Entre os meios utilizados, o MS + $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP promoveu maior percentagem e precocidade de germinação. Quando este novo meio foi aplicado em substituição ao utilizado rotineiramente (MS sem reguladores de crescimento), verificou-se uma média de 40,50% de embriões germinados enquanto com o meio anterior a média era de 5,66%, representando um aumento de mais de 6 vezes na taxa de germinação. Realizou-se também ensaios para dessecação das sementes de diploides em câmara de fluxo laminar (por 2 a 16 horas) e com a utilização de câmaras contendo soluções salinas saturadas, partes destas sementes após secarem foram submetidas a criopreservação. Percebeu-se um acréscimo no percentual de germinação dos embriões após criopreservados.

Palavras-chave: *Musa* spp.; germinação in vitro; embrião zigótico.

SEEDS OF BANANA: RESCUE EMBRYO, DESICCATION AND CRYOPRESERVATION

Author: Mariana Conceição Menezes

Adviser: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-adviser: Fernanda Vidigal Duarte Souza

ABSTRACT: The breeding program of Embrapa banana uses two strategies for developing banana hybrids: hybridization between diploid and triploid yielding tetraploid, and hybrid cross between tetraploid with diploid order to obtain secondary triploids. Seeds of these crosses are difficult and in many cases the amount produced is quite small. This study aimed to adapt the means of in vitro germination of zygotic embryos, in addition to studying the response of seeds to desiccation banana aiming cryopreservation. About in vitro germination of embryos to MS medium without growth regulators was used, MS plus GA₃ (0.035 mg.l⁻¹) combined with five different concentrations of BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 to 4.0 mg.l⁻¹). Among the means used, the MS + 0.035 mg l⁻¹ GA₃ + 2.0 mg.l⁻¹ BAP caused a higher percentage of germination and precocious. When this new medium was applied replacing the other routinely used (MS without growth regulators), there was an average of 40.50% germinated embryos as with the previous one, the ratio was 5.66%, representing an increase of more than six times the rate of germination. Also conducted to test the drying diploid seeds in a laminar flow hood (for 2 to 16 hours) and using chambers containing saturated salt solutions, some seeds were subjected to dry and subsequent cryopreservation. An increase was noticed in the percentage of germination of embryos after cryopreservation.

Key-words: *Musa* spp.; germination in vitro; zygotic embryo.

INTRODUÇÃO

A bananeira: taxonomia e evolução

O gênero *Musa* Lineu engloba as plantas herbáceas gigantes e perenes, pertencentes à classe Monocotyledonae, família Musaceae e ordem Scitaminae. A diversidade de *Musa* era proposta por caracteres agro-morfológicos que separavam o gênero em 5 seções: *Callimusa*, *Rhodochlamys*, *Australimusa*, *Ingentimusa* e *Eumusa*. Recentemente, com a aplicação de ferramentas moleculares, se tornou cada vez mais difícil de justificar a taxonomia convencional (CHRISTELOVÁ et al, 2011).

Li et al. (2010) ao estudarem 56 acessos de banana pertencentes às 5 seções de *Musa* agrupadas morfológicamente em um grupo monofilético, identificou dois cladogramas infragenéricos: um primeiro clado com $x=11$ seria correspondente às espécies das seções (Eu)*Musa* e *Rhodochlamys*, e um segundo ($x=10$ e $x=9$) incluiria as seções de *Callimusa*, *Australimusa* e *Ingentimusa*.

Já Christelová et al. (2011), observaram uma estreita relação entre espécies de *Rhodochlamys* e *Eumusa*, sugerindo que as duas seções fossem reunidas numa só. Hippolyte et al (2012) ao analisarem as distribuições alélicas em *Musa* apoiaram a origem monoclonal dos principais subgrupos triploides: 'Cavendish', 'Mutika-Lujugira' e 'Plátano', mesmo estes tendo grande diversidade fenotípica e ampla distribuição geográfica.

Por fim, com base em análises de DNA, o gênero *Musa* foi reestruturado em duas seções: *Musa* com 33 espécies que apresentam número básico de cromossomos igual a 11, englobando as antigas seções *Eumusa* e *Rhodochlamys*, e *Callimusa* com 37 espécies com $n = 10$ e $n = 9$, incorporando a antiga seção *Australimusa* (HÄKKINEN, 2013).

Considera-se como centro de origem da banana o sul e sudeste da Ásia, e existem centros secundários de sua origem na África Oriental nas Ilhas do Pacífico e na África Ocidental (SIMMONDS, 1962). O processo evolutivo da maioria das cultivares de banana ocorreu no continente Asiático, com base nas espécies de *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla.

Acredita-se que o processo de domesticação do gênero *Musa* começou a cerca de sete mil anos atrás (D'HONT et al., 2012), podendo ter uma relação com o início da agricultura. Este processo envolveu o cruzamento entre diversas espécies e subespécies do gênero, favorecido pela migração humana e a posterior seleção de híbridos diploides e triploides sem sementes.

Estas interferências fizeram com que as bananas se tornassem frutos comestíveis, apreciados em todo o mundo, embora o cultivo de bananeiras tenha se concentrado em países de clima tropical e subtropical.

As variedades de bananas alimentares surgiram basicamente de cruzamentos naturais entre *M. acuminata* e *M. balbisiana*. As características dessas duas espécies, por vezes, estavam tão intrínsecas que se tornou quase impossível diagnosticar qual seria a espécie de algumas cultivares. Tal problema fez surgir um sistema chamado grupamento genômico representado pelas letras A (genoma de *M. acuminata*) e B (genoma de *M. balbisiana*). Os grupos genômicos de *M. acuminata* podem ser AA, AAA e AAAA, enquanto os de *M. balbisiana* podem ser BB, BBB, BBBB. Quando estes genótipos são cruzados, tanto na natureza quanto em condições controladas, podem produzir híbridos: diploides AB; triploides AAB, ABB; e tetraploides AAAB, AABB e ABBB.

Assim, as variedades decorrentes dos grupos genômicos citados apresentam diferentes níveis de ploidia: diploides com 22 cromossomos, triploides com 33 e tetraploides com 44 cromossomos.

Características morfológicas do gênero *Musa*

As bananeiras são plantas herbáceas, com tronco curto e subterrâneo, representado pelo rizoma e conjunto de bainhas das folhas formando um pseudocaule. O rizoma desempenha uma função vital na bananeira, uma vez que nele ocorre a formação das raízes, folhas, inflorescências e rebentos. A partir dos nós existentes no rizoma surgem as raízes e de sua parte apical surgem as folhas (KLUGE, 1988).

As folhas das bananeiras são compridas, largas, espiraladas e em indivíduos diploides são eretas, enquanto em triploides e tetraploides tendem a

ser pendentes a bem curvadas (SHEPHERD, 1984). O pseudocaule é formado por bainhas foliares, terminando com uma copa de folhas de nervura central desenvolvida. A inflorescência sai do centro da copa e apresenta brácteas ovaladas, roxo-avermelhadas, de cujas axilas nascem as flores (BORGES e SOUZA, 2004).

As flores da bananeira estão dispostas em inflorescência, são estruturalmente bissexuais, porém funcionam como unissexuais. Uma vez que nas flores femininas as anteras são atrofiadas, possuem o filamento mais curto e o pólen é degenerado (MEDINA, 1985), o gineceu é longo, tricarpelar, trilocular possuindo vários óvulos por lóculos, estilete único e estigma trilobado (KLUGE, 1988). Contrariamente, nas flores masculinas o ovário é atrofiado, o estilete é esguio, as anteras são normais e os sacos polínicos dispostos ao longo do filamento em duas linhas paralelas (MEDINA, 1985). As flores masculinas se encontram dispostas em inflorescências chamadas “coração”, à medida que ocorre a antese as brácteas se abrem expondo as flores, logo depois elas secam e caem, formando um eixo denominado de ráquis masculina onde se notam as almofadas, como são denominadas as cicatrizes florais (DANTAS et al., 1999). O fruto da bananeira é uma baga carnosa, geralmente em cultivares alimentares é resultante do desenvolvimento partenocárpico dos ovários das flores femininas. É comum encontrarmos estruturas pequenas de coloração escura no interior do fruto, elas se tratam de óvulos não fertilizados que foram abortados, e não de sementes como muitos acreditam.

Em algumas espécies selvagens, a polinização é essencial para o desenvolvimento do fruto, uma vez que há formação de sementes (SIMMONDS, 1973). Nas bananas cultivadas esse evento é raro, uma vez que a maioria das cultivares são triploides e apresentam diferentes níveis de esterilidade.

Segundo Chin (1996) as sementes de banana variam em tamanho, forma e cor a depender da espécie e variedade. De modo geral apresentam forma irregular, geralmente achatada, coloração amarronzada e possuem uma membrana escariosa envolvendo a casca, que é extremamente dura, permanecendo fixa no cotilédone.

Geralmente, as bananeiras se multiplicam por via vegetativa, através de mudas provenientes de brotos laterais de plantas adultas. Por isso, em uma touceira, é possível encontrar bananeiras em diferentes estágios de desenvolvimento.

Importância econômica e nutricional da bananeira

A bananicultura tem elevada importância social e econômica em todo o mundo. Segundo Dias (2011), as bananas são cultivadas em mais de 100 países situados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, a banana é produzida em toda a sua extensão territorial, fazendo com que o país ocupe o quinto lugar entre os maiores produtores do mundo, com 6,97 milhões de toneladas produzidas em 2010, de aproximadamente 487 mil hectares. Índia, o maior produtor, colheu 31,89 milhões de toneladas a partir de 844 mil hectares no mesmo período (FAO, 2012).

Além de ser alimento básico para milhares de pessoas, em razão de suas particularidades, a banana tem um valor nutricional elevado, constituindo uma boa fonte energética, devido à presença de carboidratos, e também por conter minerais, como o potássio, cobre, magnésio, manganês, e vitaminas (MATSUURA et al., 2004; WALL, 2006). Em relação ao seu potencial como alimento funcional ou nutracêutico, além de apresentar baixo custo, a banana se destaca entre as frutas por ser considerada como um alimento completo. É conhecida como calmante intestinal, age no estímulo do apetite e nas funções digestivas, é utilizada no combate a anemia e repõe as perdas de potássio responsável pela capacidade mental. Além de conter triptofano, aminoácido que eleva os níveis de serotonina no organismo, pode provocar efeitos positivos em distúrbios do humor, incluindo redução na depressão (SAINIO et al., 1996).

As cultivares atualmente comercializadas, em especial as do grupo Cavendish (Grande naine, Nanica, Nanicão, etc), não apresentam quantidades tão elevadas de algumas substâncias com potencial nutritivo e ou terapêutico, entre elas polifenóis, vitamina C e carotenoides totais (AMORIM et al., 2009). Wills et al. (1986) comparou a composição nutricional de bananas doces (grupo

Prata, AAB) com frutos de Cavendish (AAA) e percebeu que as bananas doces apresentam maior índice de vitamina C, amido, glucose, frutose e fibras alimentares do que as Cavendish.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, por meio do seu programa de melhoramento genético de bananeira, vêm realizando o pré-melhoramento visando à identificação de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Bananeira (BAG banana) com compostos funcionais. Um total de 61 acessos já foram caracterizados quanto à presença de compostos funcionais, permitindo a identificação de genótipos com altos teores de vitamina C, polifenóis, carotenoides e flavonoides (AMORIM et al., 2009).

Pesquisas recentes denotam que embora tenha uma importância econômica e nutricional relevante e um alto número de variedades, a bananicultura ainda apresenta algumas lacunas para atender às exigências ligadas à preferência dos consumidores dentre elas tolerância a pragas e doenças, frutos com melhor aptidão nutricional (SILVA et al., 2013; NOMURA et al., 2013).

Melhoramento genético da bananeira

O melhoramento genético de vegetais, de um modo geral, atua em caracteres economicamente importantes, visando à identificação e seleção de genótipos com características como: melhor vigor, precocidade na produção, maior tolerância a estresses abióticos, menor exigência de nutrientes e qualidade do solo aliados a maior qualidade de produção, além de resistência a patógenos e doenças.

A bananicultura tem enfrentado problemas relacionados à infestação de patógenos e pragas em várias regiões do mundo, o que tem gerado grandes perdas na produção. Como o uso de pesticidas é muito dispendioso, além de representar um custo ambiental considerável (SHARROCK et al., 1998), surgiu uma necessidade de se obter variedades geneticamente melhoradas, o que pode em parte garantir uma produção segura em termos ambientais.

Mas, a exigência do mercado por frutos com melhor palatabilidade, qualidade e alto rendimento, por exemplo, demanda que novas variedades sejam desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético.

Programas de melhoramento genético da banana usam diploides como base para o desenvolvimento de novos híbridos comerciais, uma vez que triploides, por apresentar esterilidade, são utilizados com maior restrição (AMORIM et al., 2011). A utilização de diploides se dá também por serem portadores de características de importância agrônômica como resistência a doenças e maior produtividade dos frutos (LESSA et al., 2010).

O mais antigo programa de melhoramento em operação é o da Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA, Honduras), que iniciou com o foco em bananas e depois incorporando plátanos (bananas para cozimento)(ORTIZ, 2013).

Ainda segundo Ortiz (2013) outros programas de melhoramento internacionais ou regionais, iniciaram suas atividades entre as décadas de 1980-90 como o Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD, Guadeloupe) com foco em bananas, o Centre Africain de Recherchessurles Bananiers et Plantains (CARBAP, Camarões), com ênfase em plátanos, e do International Institute of Tropical Agriculture (IITA), dando prioridade à bananas (da Nigéria) e do Leste Africano (EAHB, de Uganda).

Em 1976 a Embrapa iniciou o Programa de Melhoramento Genético de banana (PGMB) com base em cruzamentos de diploides (AA) para geração de diploides elites que reunissem as características de interesse, os quais eram então cruzados com triploides (tipo 'Prata' e 'Maçã', AAB) gerando híbridos tetraploides AAAB, tendo como objetivo desenvolver genótipos produtivos, com menor estatura de planta, ciclo mais curto e resistência às principais pragas e doenças, e com sabor de fruto semelhante ao de 'Prata' ou 'Maçã' (AMORIM et al., 2013). Nos cruzamentos envolvendo triploides, a geração de híbridos tetraploides ocorre pela não redução do gameta feminino, que permanece triploide (DANTAS et al., 1999).

Atualmente o programa de melhoramento da Embrapa usa duas estratégias de melhoramento clássico para o desenvolvimento de híbridos de banana: a primeira envolve a hibridização entre diploides e triploides, gerando tetraploides; e a segunda utiliza os híbridos tetraploides como parentais femininos e diploides como parentais masculinos, visando à obtenção de triploides (AMORIM et al., 2013). Esses cruzamentos dão origem a sementes que são destinadas à germinação em casa de vegetação ou à germinação in vitro mediante resgate de embrião.

Usando a hibridização o PMGB da Embrapa desenvolveu cultivares como: BRS Caprichosa, BRS Garantida, BRS Japira, BRS Pacovan Ken, BRS Preciosa, BRS Princesa, BRS Tropical, BRS Vitória, BRS Pioneira e BRS Platina (SILVA et al., 2013; AMORIM et al., 2013).

Em apoio ao melhoramento convencional tem sido utilizadas técnicas de cultura de tecidos, a exemplo da indução de duplicação de cromossomos visando a geração de triploides secundários, e do cultivo in vitro de embriões zigóticos que tem possibilitado o resgate de híbridos raros (COSTA e ALOUFA, 2007; AMORIM et al., 2013), além de ferramentas modernas de biologia molecular, como os estudos de genômica, proteômica e bioinformática que permitirão futuramente a seleção assistida por marcadores (AMORIM et al., 2013).

Germinação e conservação de sementes de banana

A bananeira selvagem diploide produz sementes férteis e viáveis. Na natureza, as sementes de banana selvagens enterradas no solo podem permanecer viáveis por muitos anos e germinarem apenas quando o solo for exposto à luz, especialmente após a derrubada de árvores ao redor delas na floresta (CHIN, 1996).

Por outro lado, as bananeiras triploides cultivadas são partenocárpicas, o que as torna estéreis e incapazes de produzir sementes viáveis em condições naturais. Porém, algumas cultivares triploides têm fertilidade residual e quando realizada a polinização manual com pais diploides há formação de sementes,

embora estas sejam poucas, uma média de uma a vinte sementes por fruto (ORTIZ e VUYLSTEKE, 1995).

No entanto, em cruzamentos direcionados realizados por programas de melhoramento nem sempre é possível por as sementes obtidas rapidamente para germinar no solo. Além disto, barreiras morfológicas como a ausência do endosperma e má formação dos embriões podem afetar negativamente a germinação destas. Sendo assim é necessário estabelecer formas de conservação destas sementes.

Vários estudos têm sido realizados para a manutenção da viabilidade de sementes ao longo do tempo. Basicamente estes estudos se baseiam em condições controladas de umidade e de temperatura para investigar os fatores que interferem na germinação (DARJO e BAKRY, 1990; ABDELNOUR-ESQUIVEL et al., 1992; CHIN, 1996; AHMED, 2006).

Chin (1996) ao manter sementes de *Musa gracilis* com 46% de umidade conseguiu 70% de germinação após 7 dias do tratamento de umidificação, enquanto ao secar as sementes até o percentual de 12% de umidade não conseguiu que nenhuma semente germinasse mesmo após 3 meses de cultivo nas mesmas condições de semeadura.

Sementes secas ao ar e armazenadas a temperatura ambiente perdem a viabilidade em 12 meses (SIMMONDS, 1952). Se armazenadas em um dissecador à temperatura ambiente, se mantêm viáveis por cerca de 24 meses (STOTZKY e COX, 1962). Já Bhat et al.(1994) reportaram que sementes de *M. balbisiana* secas ao ar e mantidas com conteúdo de umidade de 13-18% sobreviveram à exposição ao nitrogênio líquido. Após descongelamento rápido mais de 90% dos embriões germinaram.

As condições de temperatura e umidade não são os únicos fatores que interferem na germinação das sementes. Segundo Baskin e Baskin (2004) a dormência apresentada por algumas sementes pode ser atribuída a fatores físicos, morfológicos e fisiológicos. Chin (1996) sugere também que a morfologia da semente interfere na germinação. Baskin et al. (2000) atribuíram a dormência física à uma camada de revestimento celular que pode funcionar como uma

barreira de absorção de água em algumas sementes, o que conseqüentemente leva a uma germinação reduzida ou falha completa de germinação. Uma vez que o primeiro passo para o início da germinação de sementes é a absorção de água.

A semente da banana consiste de um endosperma cercado por tegumento externo (testa) espesso e um tegumento interno (tegmen) fino (PUTEH et al., 2011). Finch-Savage e Leubner-Metzger (2006) relataram que o endosperma e a testa atuam como responsáveis pelo bloqueio da absorção de água durante a germinação de algumas sementes de banana, provavelmente ocorre devido à natureza dura e rígida do revestimento das sementes (BHAT et al., 1994).

De modo geral, no gênero *Musa* a germinação é bastante variável e relativamente difícil, por causa das barreiras físicas, fisiológicas e fatores genéticos. Isso se torna ainda mais difícil quando se trata de sementes híbridas (SILVA et al., 1999; AHMED et al., 2006)

Por fim, uma forma eficiente de promover a germinação de sementes de banana é a utilização do resgate de embriões in vitro (COX et al., 1960; AFELE e DE LANGUE, 1991; ASIF et al., 2001). Esta técnica tem aumentado a taxa de germinação, podendo superar 90%, sob condições ótimas (BAKRY et al., 2009, BURGOS-HERNANDEZ et al., 2014). Ahmed et al.(2006) verificaram 66% de germinação de embriões de *Musa balbisiana*.

Resgate de embriões zigóticos de banana para o melhoramento genético

O resgate e cultivo de embriões in vitro é uma técnica da cultura de tecidos que possibilita a quebra da dormência e regeneração de plântulas, viabiliza a recuperação de híbridos interespecíficos e permite testar a viabilidade das sementes (CARVALHO e ARAÚJO, 2007; UMA et al., 2010). Esta técnica também tem sido utilizada em estudos sobre o desenvolvimento embrionário de determinadas espécies (HU e FERREIRA, 1990; HASLAM e YEUNG, 2011).

Nos programas de melhoramento genético de diversas espécies como mamão, pessegueiro, banana, uvas entre outras fruteiras esta técnica tem sido usada rotineiramente para resgatar embriões, imaturos ou não, obtidos através de hibridação, sendo considerada uma ferramenta valiosa em apoio ao

melhoramento genético (ASIF et al., 2001; CARVALHO e ARAÚJO, 2007; SOUZA et al., 2011).

A produção de sementes oriundas de cruzamentos em bananeira é dependente da ploidia dos parentais, sendo que esta é maior entre diploides, sendo seguido de tetraploides e triploides (SILVA et al., 2013). Isto se deve ao fato das cultivares triploides apresentarem esterilidade total ou parcial. Embora as cultivares do subgrupo Cavendish apresentem elevado nível de esterilidade, Morán (2013) relata a obtenção de 200 sementes em cruzamentos entre estas cultivares triploides (AAA) e diploides melhoradas, sendo que 40 sementes apresentaram embriões normais, que deram origem a 20 híbridos tetraploides.

Apesar do melhoramento por hibridação ter obtido sucesso para algumas cultivares, como as dos tipos Prata e Maçã, a quantidade de sementes produzidas é bastante reduzida. Desse modo, o resgate de embriões em banana tem sido utilizado para aumentar a quantidade das progênes e permitir a avaliação de plantas originadas de novas combinações parentais cujas sementes não germinam pela via tradicional (BAKRY e HORRY, 1992; PANCHOLI et al., 1995; NEVES et al., 2001).

Outro fator relevante no uso do resgate in vitro de embriões é a redução do tempo de germinação, já que esta pode ser observada 15 dias após a inoculação no meio (BAKRY, 2008). Enquanto Chin (1996) notou a germinação de sementes de diferentes genótipos após dois meses de cultivo em areia esterilizada.

Alguns cruzamentos de interesse para o Programa de Melhoramento de Banana da Embrapa geram um número muito pequeno de sementes. Além disso, anomalias como ausência de endosperma e má formação do embrião são muito frequentes, podendo inviabilizar a germinação das sementes por método de semeadura convencional. Para garantir uma maior possibilidade de recuperação de híbridos raros as sementes são encaminhadas para o laboratório e submetidas à técnica de resgate de embrião. Em cruzamentos com um número elevado de sementes produzidas, destina-se uma parte desta progênie para a semeadura em substrato enquanto outra parte (50 a 100 unidades) é submetida ao resgate e cultivo in vitro dos embriões em laboratório, criando uma demanda de trabalho de

grande porte, que consome tempo e pessoal habilitado, causando um grande volume de sementes restantes que precisam ser conservadas para utilização futura.

Em se tratando da conservação das sementes a médio e longo prazo é necessário um planejamento e escalonamento da germinação para um momento oportuno, constituindo-se em um procedimento de grande impacto na rotina do laboratório. Além disso, garante a manutenção da viabilidade das sementes por um período longo, de forma a permitir que a avaliação de híbridos seja realizada à medida que se tenha disponibilidade de área para plantio, recursos financeiros, mão de obra e demais condições necessárias.

O meio de cultura e o desenvolvimento in vitro de embriões de banana

O sucesso da cultura de embriões in vitro depende, entre outros fatores, dos nutrientes fornecidos pelo meio de cultura. Segundo Bridgen (1994) os meios basais comumente utilizados para o cultivo de embriões são o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), seguido do Gamborg's B5 (GAMBORG et al, 1968), mesmo com pequenas modificações e acréscimos de reguladores de crescimento.

As necessidades nutricionais dos embriões dependem do estágio de desenvolvimento de embriões. Basicamente há duas fases de desenvolvimento do embrião: uma fase inicial e heterotrófica e uma fase secundária autotrófica (RAGHAVAN, 1966). Para embriões na fase heterotrófica é necessário suplementar o meio de cultura seja com vitaminas, aminoácidos, extratos naturais e/ou reguladores de crescimento. Quando na fase autotrófica para o embrião desenvolver é necessário apenas os sais no meio de cultura e açúcares, uma vez que o embrião já se encontra metabolicamente capaz de sintetizar substâncias requeridas a partir das fornecidas pelo meio.

A sacarose no meio de cultura é uma importante fonte de carbono, age primeiramente como fonte de energia para o embrião enquanto regula o potencial osmótico dos nutrientes do meio (BRIDGEN, 1994). Ainda segundo Bridgen (1994) embriões imaturos apresentam um bom desenvolvimento com meios de

cultura contendo de 8 a 12% de sacarose, enquanto os maduros requerem somente de 2 a 3% de sacarose.

Os reguladores de crescimento, entre suas várias funções, controlam o metabolismo e as respostas das sementes ao meio ambiente, mediando os acontecimentos fisiológicos da germinação e transformando sinais ambientais específicos em respostas bioquímicas. Normalmente, os reguladores de crescimento não são muito utilizados no cultivo de embriões maduros, devido à capacidade destes de fazer síntese dessas substâncias a partir do que é disponível no meio de cultura. Porém, são utilizados na cultura de embriões imaturos de algumas espécies visando a inibir a germinação precoce ou estimular o crescimento do embrião (CARVALHO et al., 1997).

Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados no cultivo de embriões in vitro destacam-se as giberelinas, como o ácido giberélico (GA_3), e as citocininas, como a 6-benzilaminopurina (BAP)(CUSTERS, 1982; PASQUAL et al., 1990; BAKRY, 2008, SRIVASTAV et al., 2004; DANTAS et al., 2001).

As giberelinas estão presentes em toda a planta, podendo ser encontradas em caules, folhas, sementes, embriões e pólenes. De modo geral, associa-se as giberelinas com o crescimento do caule e no cultivo de embriões in vitro com o estímulo de iniciação ou desenvolvimento de uma zona meristemática radicular (KOCHBA et al., 1974). Na semente o ácido giberélico promove a germinação por estimular o crescimento do embrião e induzir a produção de hidrolases que fragilizam as estruturas ao redor do embrião (HOOLEY, 1994).

As citocininas são responsáveis pelo controle de vários processos no desenvolvimento das plantas, atuando na divisão celular, retardamento da senescência de folhas, dominância apical, quebra de dormência em gemas, desenvolvimento de flores e entre outros (TAIZ e ZEIGER, 1998). Em sementes as citocininas podem funcionar como agentes quebradores de dormência, podendo, em alguns casos, substituir a necessidade de luz em espécies fotoblásticas positivas (ALVARENGA, 1990).

A 6-benzilaminopurina (BAP) é uma das citocininas amplamente utilizadas no cultivo in vitro de embriões. O seu efeito é percebido em algumas espécies

quanto a emergência de folhas no desenvolvimento do embrião, porém em cafeeiro não observa-se a influencia no BAP nesta fase (CARVALHO et al., 1998).

Bakry (2008) recomenda a adição de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 0,4 mg.L⁻¹ de ácido indol acético no meio de cultura MS visando o desenvolvimento in vitro de embriões de bananeiras. Asif et al. (2001) indicam que a concentração de BAP no meio basal MS afetam significativamente a taxa germinativa de embriões de *Musa acuminata* spp *malaccensis*. A concentração de 2,2 µM (0,5 mg.L⁻¹) promoveu a maior taxa de germinação, enquanto concentrações maiores que 4,4 µM (1,0 mg.L⁻¹) a reduziu significativamente.

Processos para dessecação de sementes

A dessecação das sementes é um dos fatores que interagem no prolongamento da viabilidade da semente. É uma etapa crucial para o armazenamento, uma vez que elas necessitam alcançar um nível de umidade ideal para manterem a viabilidade (WETZEL et al., 2003). O tempo, a temperatura, umidade relativa do ar e características inerentes às sementes são fatores que definem a velocidade da perda de água pelas sementes, por esse motivo as técnicas de dessecação de sementes podem ser do modo natural ou artificial.

Os métodos naturais podem ser feito à sombra ou sobre o sol e em temperatura ambiente, durante alguns dias. Esses métodos têm pouco controle dos variados fatores que afetam a secagem, apesar de ser amplamente utilizados devido a sua fácil execução (PAMMENTER et al., 2002). A secagem natural pode ser realizada também em ambiente de laboratório, tendo como vantagem um maior controle das variações ambientais e proteção destas sementes. (PAMMENTER et al., 2002).

Os métodos artificiais de dessecação são baseados na utilização de um fator externo para induzir a perda de água pela semente seja através de calor, do emprego de fluxo de ar constante ou utilizando agentes desidratantes como a sílica e alguns sais.

O método de estufa, baseada na extração da água em forma de vapor pela aplicação de calor sob condições controladas (BRASIL, 2009). Porém a alta

temperatura no ambiente da estufa pode ser fatal para as sementes de algumas espécies. Por isso recomenda-se que a dessecação de sementes aconteça em uma temperatura que não ultrapasse 40 °C, evitando, assim, a redução da sua qualidade fisiológica. Entretanto, a temperatura máxima a qual as sementes são tolerantes depende do seu teor de água e o tempo de exposição ao processo (ZONTA et al.,2011).

A secagem em fluxo laminar, geralmente utilizada para sementes pequenas ou embriões excisados, tem como vantagem a não contaminação do material por este estar sujeito a ventilação constante promovida pelo fluxo de ar. Segundo Pammenter et al. (2002), a temperatura e a umidade relativa do ambiente não são controladas neste tipo de dessecação, podendo variar de acordo com a localidade e condições climáticas, mas os percentuais de umidade ainda assim decrescem ao longo do tempo para algumas sementes.

O uso de câmaras de dessecação contendo sílica gel ou soluções salinas saturadas se destacam por serem métodos relativamente rápidos quando comparados à secagem natural. Ao utilizar a sílica-gel a perda de água do material a ser seco ocorre de forma contínua, e geralmente esta é feita à temperatura ambiente em dessecador ou em recipientes com fechamento hermético. O uso de câmaras contendo soluções salinas saturadas tem a vantagem do controle da umidade relativa do ambiente promovida por cada sal em uma determinada temperatura, promovendo assim a umidade relativa de equilíbrio entre o material a ser dessecado e a do ambiente promovida pela solução salina (MEDEIROS, 2006). Sais como o cloreto de sódio (75% de umidade relativa a 25°C), nitrato de cálcio (52% de umidade relativa a 25°C), hidróxido de potássio (8% de umidade relativa a 25°C), nitrato de magnésio (53% de umidade relativa a 25°C), nitrito de sódio (64% de umidade relativa a 25°C) e outros são utilizados no preparo de soluções salinas saturadas para a dessecação (SUN, 2002; MEDEIROS, 2006).

Criopreservação de sementes

Conservar sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, uma vez que elas são a unidade de propagação da maioria das espécies de plantas. Entre as técnicas de conservação a criopreservação se destaca por manter a viabilidade das sementes por um longo prazo (PANIS e LAMBARDI, 2005). Além da longevidade de conservação, são vantagens da criopreservação o baixo custo de armazenamento, espaço físico reduzido e baixa probabilidade de contaminação (REIS e CUNHA, 1997; CAMILLO et al., 2009).

Esta técnica consiste no armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C e vem sendo pesquisada desde a década de 1960, sendo testada com êxito para várias espécies de plantas (VEIGA et al, 2006). Stanwood (1985) que de sementes de 155 espécies agrícolas já estavam sendo constatadas a tolerância após o congelamento nitrogênio líquido. Com o avanço das pesquisas em criopreservação de sementes vários protocolos de conservação de sementes ortodoxas e recalcitrantes tem sido desenvolvidos (WETZEL et al., 2003; PRITCHARD e NADARAJAN, 2008; WALTERS et al., 2008).

A qualidade das sementes aliada às características de armazenamento em baixas temperaturas permitem viabilizar a criopreservação, porém um dos fatores mais importantes quanto esta viabilidade é a quantidade de água no interior destas, uma vez que se o teor de água for alto pode ocorrer a formação de cristais de gelo no interior das células resultando na ruptura da parede celular. Por outro lado, caso esta desidratação seja excessiva também provoca a morte celular. Quando o teor de água no interior das sementes é ideal, dá plasticidade e evita a fissura de sua estrutura física e o rompimento das estruturas celulares, principalmente das quais os embriões estão envolvidos (MATA, 2008).

Segundo Roberts (1973), as sementes podem ser classificadas em três grupos segundo o seu comportamento diante o armazenamento: ortodoxas, tolerantes à dessecação e a baixas temperaturas; recalcitrantes, que são intolerantes à dessecação e requerem imediato plantio por degradarem rapidamente suas reservas e as sementes intermediárias, que não podem ser nem consideradas recalcitrantes, nem ortodoxas, pois permitem a desidratação

parcial, porém se tornam inviáveis ao longo do tempo mesmo quando criopreservadas.

O processo de desidratação tem que ser reversível, ou seja, manter a integridade e viabilidade da semente após o congelamento, sendo assim várias técnicas de congelamento para sementes são estudadas. De acordo com Engelmann (1997), o método clássico de criopreservação é baseado em uma fase onde o congelamento é lento, ou seja, a temperatura é reduzida a uma velocidade definida para valores próximos a -40°C e a fase seguinte consiste em imergir o material diretamente no nitrogênio líquido. Esse método foi baseado no princípio em que ao aproximar-se de 0°C , a célula e seu meio externo fica super-resfriada, permanecendo descongelado e impedindo a formação de cristais de gelo, além disso a água se difunde do interior da célula para o meio externo, desidratando e impedindo a formação de cristais de gelo quando imersa no nitrogênio líquido (MAZUR, 1969).

Já a criopreservação pelo método de vitrificação, em que a desidratação é feita anteriormente ao congelamento em nitrogênio líquido colocando o material em contato com soluções concentradas de sacarose e outras substâncias químicas e em seguida é feito um rápido congelamento. As vantagens do estado de vitrificação para as células desidratadas é que a perda de água e a cristalização de sais e de proteínas no citoplasma são limitadas, mesmo que esta desidratação seja excessiva. O congelamento rápido pode ser através do encapsulamento-desidratação ou por congelamento direto, onde os tecidos são previamente desidratados através de soluções salinas, estufa ou secagem a fluxo de ar.

O descongelamento pode ser feito de modo lento à temperatura ambiente ou utilizando-se um banho-maria com temperatura entre 37 a 40°C durante um curto intervalo de tempo, sem causar prejuízos às sementes (TOWILL, 2002).

Embora a propagação da bananeira seja preferencialmente por propagação vegetativa, alguns genótipos produzem sementes naturalmente ou mediante cruzamentos controlados. O programa de melhoramento da bananeira desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura vêm adotando estratégias que

tem proporcionado a obtenção de um elevado número de sementes. Dada a impossibilidade de testar toda a progênie em um mesmo momento, devido à limitação de espaço nos campos experimentais e de mão de obra, uma alternativa é criopreservar as sementes para uso posterior. A criopreservação apresenta vantagens por ser um método pouco dispendioso, que mantém as características genéticas, físicas e fisiológicas das sementes durante tempo indeterminado, poupando o controle periódico da viabilidade destas sementes, exige pouca mão de obra, além de permitir a utilização desse germoplasma de forma planejada e a longo prazo.

REFERÊNCIAS

ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MORA, A.; VILLALOBOS, V. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *Musa balbisiana* (BB). **Cryo-letters**, v. 13, p. 159-164, 1992.

AHMED, K. Z.; REMI, S.; SÁGI, R.; SWENNEN. Germination of *Musa balbisiana* seeds and embryos. In: International Meeting ACORBAT, 17, 2006, Joinville, SC. **Anais...** (online). Joinville: ACORBAT, 2006.

AFELE, J. C.; DE LANGHE, E. Increasing in vitro germination of *Musa balbisiana* seed. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, p.33-36, 1991.

ALVARENGA, A.A. **Substâncias de crescimento e regulação do desenvolvimento vegetal**. Lavras: ESAL, 1990.56p.

AMORIM, E. P. VILARINHOS, A. D; COHEN, K. O.; AMORIM, V.B.O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O.; PESTANA, K.N.; SANTOS, V. J.; PAES, N.S. MONTE, D.C.; REIS, R. V. The genetic diversity of carotenoid-rich bananas measured by Diversity Arrays Technology (DArT). **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.96-103, 2009.

AMORIM, E.P., AMORIM, V.B.O., SILVA, S.O. AND PILLAY, M. Quality improvement of cultivated *Musa*. In: M. Pillay e A. Tenkouano (Eds.), **Banana Breeding: Progress and Challenges**. CRC Press, New York. p.252-280, 2011.

AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. Banana Breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**, v. 986, p. 171-176, 2013.

ASIF, M. J.; MAK, C.; OTHMAN, R. Y. In vitro zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* spp. *malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 267-170, 2001.

BAKRY, F. Zygotic embryo rescue in bananas. **Fruits**, v. 63, p. 111–115, 2008.

BAKRY, F.; HERRY, J.P. Tetraploid hybrids from interploid 3x × 2x crosses in cooking bananas. **Fruits**, v. 47, p. 641–647, 1992.

BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HERRY, J.P. Genetic Improvement of Banana. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P.M. **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species (Org.)**, Springer Science, p. 3-50, 2009.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C. C.; LI, X. (Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. **Plant Species Biology**, v. 34, p. 139-152. 2000.

BASKIN J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, p. 1-16, 2004.

BHAT, S. R.; BHAT, K. H.; CHANDEL, K. P. S. Studied on germination and cryopreservation of *Musa balbisiana* seed. **Seed Science and Technology**, v. 22, p. 637-640, 1994.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. Exigências edafoclimáticas. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Ed.) **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, p. 15-19, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, p. 307, 2009.

BURGOS-HERNÁNDEZ, M.; CASTILLO-CAMPOS, G.; MATA-ROSAS, M.; GONZÁLEZ, D.; VOVIDES, A. P.; MURGUÍA-GONZÁLEZ, J. Seed germination of the wild banana *Musa ornata* (Musaceae). **Seed Science and Technology**, v. 42, p. 16-27, 2014.

CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.211-215, 2009.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAUJO, S. de S. **Aplicação do cultivo de embrião zigótico ou imaturo no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa-CNPA, 2007. (Documento, 170).

CHIN, H. F. Germination and storage of banana seeds. In: NEW FRONTIERS IN RESISTANCE BREEDING FOR NEMATODE, FUSARIUM AND SIGATOKA WORKSHOP, 1995. Kuala Lumpur. **Proceedings...** Montpellier: International Network for the Improvement of Banana and Plantain, p.218-227, 1996.

CHRISTELOVÁ, P.; MIROSLAV, V.; HRIBOVÁ, E.; DE ANGHE, E.; DOLEZEL, J. A multi gene sequence-based phylogeny of the Musaceae (banana) family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 1- 13.2011.

COSTA, N. M. de S.; ALOUFA, M. A. I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista de Ciências Agronômicas**, v. 38, p. 276-279, 2007.

COX, E. A. *In vitro* culture of *Musa balbisiana* Colla embryos. **Nature**, v.185, p.403–404, 1960.

CUSTERS, J.B.M. *In vitro* culture of embryos of *Cucumis zeyheri* Sond. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v.5, p.54-56, 1982.

DANTAS, A. C. V. L.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Estrutura da planta. In: ALVES, E. J. **A cultura da banana**. Brasília: Embrapa-SPI/ Cruz das Almas: Embrapa- CNPMF, pp. 47-60, 1999.

DARJO, P.; BAKRY, F. Conservation and germination of banana seeds. **Fruits**, v.45, p. 103-113, 1990.

D'HONT, A.; DENOEUDE, F.; MARCAURY, J.; BAURENS, F-C; CARREL, F.; GARSMEUR, O. et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v. 488, p. 213-219, 2012.

DIAS, J. S. A. A cultura da Bananeira. In: DIAS, J. S. A. ; BARRETO, M. C. (Ed.). **Aspectos agronômicos, fitopatológicos e socioeconômicos da sigatoka-negra na cultura da bananeira no Estado do Amapá**. Macapá: Embrapa Amapá, 2011. 95 p. 1 CD-ROM. ISBN 978-85-61366-14-8.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resource News**, v.112, p. 9–18, 1997.

FAO. 2012. Disponível em: <www.fao.org>. Acessado em 28 jun. 2014

FINCH-SAVAGE, W.E; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v.17, p. 501-523, 2006.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**. v. 50, p. 151–158, 1968.

HÄKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **Taxon**, v. 62, n. 4, p.809-813, 2013.

HASLAM, T. M; YEUNG, E. C. Zygotic embryo culture: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v.710, p.3-15, 2011.

HIPPOLYTE, I.; JENNY, C.; GARDES, L.; BAKRY, F.; RIVALLAN, R.; POMIES, V.; CUBRY, P.; TOMEKPE, K.; RISTERUCCI, A. M.; ROUX, N.; ROUARD, M.; ARNAUD, E.; KOLESNILKOVA-ALLEN, M.; PERRIER, X. Foundation characteristics of edible *Musa* triploids revealed from allelic distribution of SSR markers. **Annals of Botany**, v.109, p. 1-15, 2012.

HOOLEY, R. Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 1529-1555, 1994.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v. 1, p. 371-393, 1998.

KLUGE, R. A. Bananeira. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R.A. (Ed.) **Ecofisiologia de Fruteiras Tropicais: abacaxizeiro, maracujazeiro, mangueira, bananeira e cacaueiro**. São Paulo: Nobel 1998.

KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, New York, v.38, p.795-802, 1974.

LESSA, L. S.; LEDO, C. A. S.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; OLIVEIRA, T. K. Características agrônômicas de híbridos diploides de bananeira em três ciclos de produção em Cruz das Almas, Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.32, p. 213-221, 2010.

LI, L. F. HAKKINEN, M; YUAN, Y. M.;HAO, G; GE, X. J. Molecular phylogeny and systematics of the banana family (Musaceae) inferred from multiple nuclear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to the genus *Musa*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p.1-10, 2010.

MATA, M. E. R. M. C. Tecnologia de crioconservação de sementes de urucum. **Tecnologia e Ciências Agropecuária**, v. 2, p. 1-9, 2008.

MATSUURA, F. C. A. U.; COSTA; J. I. P.; FOLEGATTI, M. I. S. Marketing de banana: preferências do consumidor quanto aos atributos de qualidade dos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 48-52, 2004.

MAZUR, P. Freezing injury in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v. 20, p. 419-425, 1969.

MEDEIROS, A. C. de S. **Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. (Circular técnica, 125)

MEDINA, J. C. **Banana cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas: ITAL, p.1-13,1985.

MORÁN, J. F. A. Improvement of Cavendish banana cultivars through conventional breeding. **Acta Horticulturae**, v. 986, p. 205-208, 2013.

NEVES, T. S.; SILVA, S. O.; OLIVEIRA, R. P. Resgate in vitro de embriões em

genótipos diploides de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 285-290, 2001.

NOMURA, E. S.; DAMATO JUNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; AMORIM, E. P.; SILVA, S. de O. e. Avaliação agronômica de genótipos de bananeiras em condições subtropicais, Vale do Ribeira, São Paulo – Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 112-122, 2013.

ORTIZ, R. Conventional banana and plantain breeding. **Acta Horticulturae**, v.986, p. 177-194, 2013.

ORTIZ, R.; VUYLSTEKE D. Factors influencing seed set in triploid *Musa* spp. L. and production of euploid hybrids. **Annals of Botany**, v. 75, p. 151–155, 1995.

PASCUAL, M.; RIBEIRO, V. G.; RAMOS, J. D, Influência do GA₃ e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja 'natal'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, p. 1477 – 1482, 1990.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WESLEY-SMITH, J.; WILLIGEN, C. V. Experimental aspects of drying and recovery. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: CAB International, p. 93-110, 2002.

PANCHOLI, N.; WETTEN, A.; CALIGARI, P. D. S. Germination of *Musa velutina* seeds: comparison of in vivo and *in vitro* systems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.31, p.127-130, 1995.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J; SONNINO, A. (Ed.) **The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources**. Rome, FAO, 2005

PRITCHARD, H.W.; NADARAJAN, J. Cryopreservation of orthodox (i.e. desiccation tolerant) seeds. In: REED, B.M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, p.485-501, 2008.

PUTEH, A. B.; ARIS, E. M.; SINNIHAH, U. R.; RAHMAN, Md. M.; MOHAMAD, R. B.; ABDULLAH, N. A. P. Seed anatomy, moisture content and scarification

influence on imbibitions in wild banana (*Musa acuminata* Colla) ecotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p.14373-14379, 2011.

RAGHAVAN, V. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. **Biologic Reviews**, v. 41, p. 1–58, 1966.

REIS, A. M. M.;CUNHA, R.Efeito do congelamento sobre a viabilidade de sementes de *Anadenanthera peregrine* (L.) Speg com diferentes conteúdos de umidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p. 1071-1079, 1997.

ROBERTS, E. H. Lost of viability: ultrastructural and physiological aspects.**Seed Science and Technology**, v. 1, p. 539-545, 1973.

SAINIO, E.L., PULKKI, K.; YOUNG, S.N. L-Tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects. **Amino Acids**, v.10, p. 21-47, 1996.

SHARROCK, S.L.; ORJEDA, G.; FRISON, E. A. Promusa - A Global Programme for *Musa* Improvement. **Acta Horticulturae**, v. 490, p.337-344, 1998.

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

SILVA, S. O.; SILVA, K. M.; BORGES, M. F.; OLIVEIRA, R. P. Pollination and culture of banana embryos. **Infomusa**, v.8, p. 24-26, 1999.

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

SIMMONDS, N. W. **The Evolution of the Bananas**. London: Longmans, 170p. 1962.

SIMMONDS, N.W. **Los plátanos**. Barcelona: Blume, 539p.,1973.

SOUZA, A. S.; VIDAL, A. M.; MENDES, M. I. S.; SILVA NETO, H. P.. **Resgate e cultivo in vitro de embriões zigóticos de mamão: um guia ilustrado**. Cruz das Almas: EMBRAPA - CNMF, 2011. (Circular Técnica, 105).

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cell and organs**. Boca Raton: CRC Press Inc., p. 200-266, 1985.

STOTZKY, G.; COX, E.A. Seed germination in *Musa* II. Alternating temperature requirement for the germination of *Musa balbisiana*. **American Journal of Botany**, v. 49, p. 763-770, 1962.

SUN, W. Q. Appendix: solutions for controlled dehydration and rehydration. In: BLACK, M.; PITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: CAB International, p. 84-91, 2002.

TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm: Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Berlin: Springer, p. 4-21, 2002.

UMA, S.; LAKSHMI, S.; SARASWATHI, M. S.; AKBAR, A.; MUSTAFFA, M. M. Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 105-111, 2011.

VEIGA, R.F. A.; MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C. A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agrônômico (IAC). **O Agrônômico**, v. 58, p. 19-21, 2006.

WALL, M. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food composition and Analysis**, v.19, p.434-445, 2006.

WALTERS, C.; WESLEY-SMITH, J.; CRANE, J.; HILL, L.M.; CHMIELARZ, P.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B.M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, p.465-484. 2008.

WETZEL, M. M. V. S.; REIS, R. B.; RAMIS, K. M. **Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen, 2003. (Circular Técnica, 26)

WILLS, R.; LIM, J.; GREENFIELD, H. Composition of Australian foods -Tropical and sub-tropical fruit. **Food Technology in Australia**, v.38, p.118–123, 1986.

ZONTA, J.B.; ARAUJO, E. F.; DIAS, L. A. S. Diferentes tipos de secagem feitos na qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, p. 721-731, 2011.

CAPÍTULO 1

ADEQUAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA O RESGATE IN VITRO DE EMBRIÕES DE BANANA

ADEQUAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA O RESGATE IN VITRO DE EMBRIÕES DE BANANA

Autora: Mariana Conceição Menezes

Orientadora: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

RESUMO: A técnica de cultivo de embriões de bananeira para resgate de híbridos vem sendo usada de forma rotineira como ferramenta do programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Entretanto, a percentagem média de germinação dos embriões tem sido inferior a 5% havendo a perda de muitos híbridos potencialmente úteis para o melhoramento. Deste modo, se fazem necessários ajustes no meio de cultura a fim de aumentar a eficiência na germinação de embriões resgatados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi ajustar o meio de cultura a partir da adição de reguladores de crescimento visando elevar a taxa de germinação in vitro de embriões zigóticos de bananeira oriundos do programa de melhoramento genético. Para isso foram utilizados os meios de cultura: MS sem reguladores de crescimento, MS acrescido de GA₃ (0,035 mg.L⁻¹) combinado com cinco diferentes concentrações de BAP (0,0 ; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹). O experimento foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos contendo 6 repetições de 10 sementes cada. Os embriões foram mantidos no escuro, a 26 ±1 °C. Entre os meios utilizados, o MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃+ 2,0 mg.L⁻¹ de BAP promoveu maior percentagem e precocidade da germinação. Esse meio foi utilizado para resgate de embriões das sementes oriundas dos cruzamentos em substituição ao utilizado rotineiramente (MS sem reguladores de crescimento), obtendo-se uma média de 40,50% de embriões germinados, que significou um aumento de mais de 6 vezes na taxa de germinação.

Palavras-chave: BAP, GA₃, *Musa* spp.

ADJUSTMENT OF CULTURE MEDIUM FOR IN VITRO EMBRYO RESCUE OF BANANA

Author: Mariana Conceição Menezes

Adviser: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-adviser: Fernanda Vidigal Duarte Souza

ABSTRACT: The technique of embryo culture banana for rescue of hybrids has been routinely used as a tool of the breeding program of Embrapa Cassava and Tropical Fruits. However, the average percentage of embryo germination has been there less than 5% loss of many potentially useful for hybrid breeding. Thus, if adjustments are necessary in the culture medium in order to increase the efficiency of germination of embryos recovered. Therefore, the aim of this work was to adjust the culture medium from the addition of growth regulators aimed at raising the rate of in vitro germination of zygotic embryos derived from the banana breeding program. To this end the culture media were used: MS without growth regulators, MS supplemented with GA₃ combined (0.035 mg L⁻¹) with five different concentrations of BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg.L⁻¹). The experiment was completely randomized with 6 treatments with 6 replicates, with 10 seeds each. Embryos were kept in the dark at 26 ± 1°C. Among the means used, the MS + 0.035 mg l⁻¹ GA₃ + 2.0 mg l⁻¹ BAP promoted higher germination rates and shorter cultivation. This medium was used for embryo rescue of seeds replacing the previously used routinely (MS without growth regulators), yielding an average of 40.50% germinated embryos.

Key-words: BAP, AG₃, *Musa* spp

INTRODUÇÃO

No melhoramento genético convencional da bananeira, o resgate dos embriões oriundos dos cruzamentos realizados pode se tornar uma etapa limitante para a obtenção do novo híbrido. Fatores, tais como, a pouca produção de sementes em alguns cruzamentos, a má formação de embriões, ausência de endosperma, dentre outros, levam a baixos percentuais de germinação ou mesmo ao não resgate do embrião, quando se usam as condições convencionais de cultivo em substrato (VUYLSTEKE e SWENNEN, 1991; PANCHOLI et al., 1995; NEVES et al., 2001).

O cultivo in vitro de embriões de bananeira surgiu em 1960 (COX et al., 1960) com a finalidade de minimizar essas limitações. A técnica permite um resgate superior ao que se obtém pelo método convencional e continua sendo usada com êxito ao longo do tempo (UMA et al., 2011; RASHID et al., 2013)

A germinação in vitro dos embriões excisados depende prioritariamente de dois fatores, o estágio de maturação do embrião e o meio de cultura utilizado (UMA et al., 2011). Entretanto, dormência, desinfestação, extração inadequada dos embriões e mesmo os parentais envolvidos no cruzamento também podem influenciar no êxito do resgate (NEVES et al., 2001; CARVALHO e ARAÚJO, 2007).

SILVA et al. (1999) notaram que os embriões produzidos por cruzamentos entre diploides geralmente possuem um percentual de germinação mais elevado que de híbridos diploides-triploides. Além disso, estudos realizados para investigar os fatores limitantes da germinação in vitro de embriões zigóticos de bananeira indicaram que o percentual de germinação não é afetado pela quantidade do endosperma na semente, o que indica que é possível utilizar embriões de sementes com pouco endosperma (SILVA et al., 1999; NEVES et al., 2001).

Essa técnica também tem possibilitado estudo das necessidades nutricionais e físicas para que o embrião se desenvolva. Segundo Pascal et al. (1998), o cultivo in vitro de embriões zigóticos supera a dormência em certos tipos de sementes e resgata os embriões híbridos imaturos oriundos de cruzamentos incompatíveis.

Pouco se sabe sobre os fatores limitantes da germinação na semeadura convencional de sementes de banana (ASIF et al., 2001), uma vez que esta é bastante variável e relativamente difícil de obter em condições naturais.

Em condições naturais à medida que o embrião zigótico se desenvolve, suas necessidades nutricionais sofrem mudanças, passando de heterotrófico a autotrófico. A diferença entre essas duas fases é baseada na dependência do embrião pelas substâncias nutritivas armazenadas no endosperma (CARVALHO e ARAÚJO, 2007).

A partir deste princípio, os meios de cultura para o resgate de embriões de banana são formulados com diferentes concentrações dos nutrientes e sais minerais do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). A necessidade da presença ou não de reguladores vegetais depende do grau de maturidade do embrião, uma vez que, segundo Hu e Ferreira (1998), embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este, são praticamente autotróficos. Porém, para melhorar a eficácia da germinação dos embriões tem sido realizada a adição de reguladores no meio de cultura basal (BAKRY et al., 2008; PILLAY et al., 2011).

A adição de reguladores de crescimento na cultura de embriões imaturos, muitas vezes é feita para estimular o crescimento embrionário (CARVALHO e ARAÚJO, 2007). O ácido giberélico (GA_3) e a 6-benzilaminopurina (BAP) são reguladores de crescimento amplamente utilizados nos meios de cultura para o cultivo de embriões zigóticos em diferentes culturas (BAKRY, 2008; COSTA e ALOUFA, 2007; SRIVASTAV et al., 2004; DANTAS et al., 2001).

O GA_3 pertence ao grupo das giberelinas, hormônios envolvidos no crescimento inicial do embrião, aumento do potencial de crescimento embrionário e degradação das reservas da semente, interrompendo o período de latência nas sementes fazendo-as germinar (LOPES et al., 2009). O ácido giberélico induz a

produção de hidrolases que fragilizam as estruturas ao redor do embrião permitindo o seu crescimento (HOOLEY, 1994).

As giberelinas ativam a síntese de enzimas hidrolíticas, como amilase e outras envolvidas no processo de mobilização de reservas do endosperma, liberando energia para o crescimento do embrião (ALVARENGA, 1990; TAIZ e ZEIGER, 1991), outra função é a de aumentar o alongamento celular, fazendo com que a radícula e a parte aérea possam desenvolver-se (SALISBURY e ROSS, 1992).

Quanto ao desenvolvimento embrionário, Schooler (1960) ao estudar embriões jovens de cevada percebeu que baixas concentrações de GA ($0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) podem promover o desenvolvimento destes embriões. Já Cionini et al. (1976) notaram que o GA_3 tem sido efetivo em estimular o crescimento de embriões de feijão.

A presença de ácido giberélico (GA_3) no meio de cultura favorece o início de uma zona meristemática radicular ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente (KOCHBA et al., 1974). Porém em algumas espécies a presença do GA_3 em meio de cultura pode impedir ou reduzir a formação de raízes. Carvalho et al. (1998) ao estudarem o efeito do ácido giberélico no crescimento in vitro de embriões de cafeeiro observaram que a presença deste composto promoveu a redução do enraizamento. Segundo Putz (1971), a inibição no desenvolvimento do sistema radicular ocorre, principalmente se a concentração de GA_3 utilizada promover o crescimento de meristemas isolados ou extremidades de brotações e estiver na presença de auxinas.

Muitas vezes quando o GA_3 é adicionado ao meio de cultura produz efeitos semelhantes aos das auxinas. Altas concentrações de GA_3 ($1 \text{ a } 8 \text{ mg.L}^{-1}$) pode induzir o crescimento de células indiferenciadas, formando calos (SCHROEDER e SPECTOR, 1957; GAUTAM et al., 1983), e também pode promover o desenvolvimento de calos em combinação com auxinas e baixas concentrações de citocininas (ENGELKE et al., 1973).

As citocininas atuam na divisão celular, sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que têm relação direta com a formação de fibras do fuso

mitótico (GEORGE e SHERRINTON, 1984). Em cafeeiro, a adição de BAP é utilizada para aumentar o crescimento da parte aérea de embriões somáticos em fase inicial de germinação (PEREIRA et al., 2007). Por outro lado, a depender da dosagem de BAP no meio de cultura esta citocinina pode favorecer o balanço hormonal causando a formação de calos (NOGUEIRA et al., 2004).

Na Embrapa Mandioca e Fruticultura, a técnica de cultivo de embriões de bananeira para resgate de híbridos vem sendo usada de forma rotineira como ferramenta do programa de melhoramento genético. Entretanto, a percentagem média de germinação dos embriões tem sido inferior a 5% (Santos-Serejo, comunicação pessoal), havendo a perda de muitos híbridos potencialmente úteis para o melhoramento. Diante do exposto, se fazem necessários ajustes no meio de cultura a fim de aumentar a eficiência na germinação de embriões resgatados.

Assim, o objetivo deste trabalho foi ajustar o meio de cultura a partir da adição de reguladores de crescimento visando elevar a taxa de germinação in vitro de embriões zigóticos de bananeira oriundos do programa de melhoramento genético.

MATERIAIS E MÉTODOS

Adequação do meio de cultura

Foram utilizadas sementes de bananeira oriundas de polinização aberta dos híbridos diploides 013018-01 (H1 = Mallaccensis x Sinwobogi) e 073041-03 (H2 = Khai x (Calcutta x Madang)).

As sementes foram retiradas de frutos amadurecidos naturalmente, lavadas em água para a retirada de restos de polpa aderidos à superfície, sendo descartadas as que boiaram em água por serem consideradas inviáveis. Em seguida as sementes foram colocadas para secar por 7 dias à temperatura ambiente, no Laboratório de Práticas Culturais.

Após este período as sementes passaram por outra lavagem em água corrente e desinfestação em álcool 70% por cinco minutos, solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 30 minutos e três lavagens com água destilada

estéril, sendo que todo este processo foi realizado em ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar.

Ainda em ambiente asséptico, os embriões foram excisados e inoculados em placas de Petri contendo 40 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar e as diferentes concentrações de reguladores de crescimento, perfazendo um total de 6 tratamentos, a saber:

Tratamento1– M1 - MS sem regulador de crescimento

Tratamento2– M2 - MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃;

Tratamento3–M3 - MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃+ 0,5 mg.L⁻¹ de BAP;

Tratamento4–M4 - MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃+ 1,0 mg.L⁻¹ de BAP;

Tratamento5–M5 - MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃+ 2,0 mg.L⁻¹ de BAP;

Tratamento6–M6 - MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃+ 4,0 mg.L⁻¹ de BAP;

O pH dos meios foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

O experimento foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos contendo 6 repetições, sendo 10 sementes por repetição. Após a inoculação, os embriões foram mantidos em ambiente escuro a 26 ±1°C durante 60 dias.

As porcentagens médias de germinação em cada tratamento foram submetidas à análise de variância, e a comparação entre as médias foi realizada utilizando-se o teste Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa SISVAR para as análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de reguladores de crescimento na germinação in vitro de embriões zigóticos de bananeira

Observou-se a presença de embriões intumescidos a partir da primeira semana de cultivo (Figura 3a), mas a germinação, só foi observada depois da terceira semana em embriões inoculados no M5 (Figura 3b) no qual a

concentração de BAP foi de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$. O intumescimento é caracterizado pelo aumento de volume do embrião e geralmente é um estágio preliminar à germinação. No entanto, esse crescimento inicial não garante a germinação, como foi observado neste experimento, em que alguns dos embriões apresentaram intumescimento, mas não germinaram posteriormente.



Figura 3. Cultivo in vitro de embriões de híbridos diploides de bananeira. A – Embriões de H2 cultivados por uma semana. B – Embrião de H1 germinado na 3ª semana de cultivo no M5 (MS + $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP). C e D – Embriões germinados com 4 semanas de cultivo no M5 nos genótipos H2 e H1, respectivamente. E – Formação de calos de embriões de H2 observada no M4 (MS + $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP). F- Embriões após 8 semanas de cultivo em M2 (MS + $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , na ausência de BAP).

Foi observada diferença significativa no percentual de germinação entre os meios avaliados em ambos os diploides (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de germinação e início da germinação em semanas de cultivo dos diploides estudados.

Meio de cultura	H1 (013018-01)		H2 (073041-03)	
	% germinação*	Início da germinação (semanas)	% germinação*	Início da germinação
M1	18,33 a	4	11,67 b	5
M2	23,33 a	4	26,00 a	4
M3	31,67 a	4	8,00 b	4
M4	30,00 a	4	16,67 b	4
M5	26,67 a	3	28,33 a	3
M6	5,00 b	3	10,00 b	4

* Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, considerando o valor nominal de 5% de significância.

Para o genótipo H1 não houve diferença significativa entre os cinco primeiros meios, assim como as menores taxas de germinação foram registradas em M6. Já para o H2 os melhores resultados foram obtidos com M2 (MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃) e M5 (MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃ + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP). A germinação mais precoce, obtida na terceira semana após o cultivo, deu-se com M5 e M6 (MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃ + 4,0 mg.L⁻¹ de BAP) para o genótipo H1 e com M5 para o outro genótipo. Considerando esses resultados o M5 parece ser o meio que poderia atender aos dois genótipos avaliados, tanto pela percentagem de germinação, quanto pelo menor tempo para dar início à germinação.

Neves et al. (2001) utilizando o meio MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose para a germinação de embriões de 8 genótipos diploides de bananeira observaram que estes apresentaram germinação do 5º ao 25º dia de cultivo. Já Bakry (2008) aponta que embriões obtidos a partir de vários cruzamentos entre *Musa acuminata* e *M. balbisiana* normalmente começam a germinar no escuro

cerca de 15 dias após a inoculação em meio de cultura MS suplementado com 25 mg.L⁻¹ de sacarose, 0,1 mg.L⁻¹ de BAP e 0,4 mg.L⁻¹ de AIA. As diferenças em relação aos resultados obtidos neste trabalho podem ser devido a fatores variados, como a origem dos cruzamentos e as próprias condições de cultivo.

Asif (2001) ao estudar a cultura de embriões zigóticos em *Musa accuminata* spp. *malaccensis* percebeu que a adição de BAP nas concentrações de 0; 2,2; 4,4; 8,8; 13,2, 17,6 e 22,0 µM no meio de cultura MS afetou significativamente a germinação, obtendo 100% de germinação com a concentração de 2,2 µM (0,5 mg.L⁻¹) de BAP, sendo que na ausência deste regulador obteve 93,8% de germinação. Em doses superiores a 4,4µM (1 mg.L⁻¹) as taxas de germinação decresceram, sendo que com a maior concentração 22,0 µM (5 mg/L) obteve-se apenas 31,3% de germinação. Isso sugere que o uso de reguladores de crescimento como o BAP pode auxiliar no crescimento celular dos embriões a depender de sua concentração no meio de cultura.

Uma (2011) ao estudar a germinação in vitro de diferentes acessos de *Musa* registrou que a composição do meio não teve influência significativa na percentagem de germinação entre os vários estágios de maturidade dos embriões, porém o valor máximo de obtenção de plântulas foi de 30,21% no meio MS acrescido de com 4,4 µM BAP (1 mg.L⁻¹), sem outros reguladores de crescimento, enquanto em meios contendo concentrações superiores a 4,4 µM de BAP a germinação foi reduzida significativamente devido à formação de calos. Neste trabalho a maior concentração de BAP (4 mg.L⁻¹) foi a que apresentou as menores porcentagens de germinação. A aplicação exógena de alguns reguladores de crescimento, especialmente substâncias dos grupos das giberelinas e citocininas, pode acelerar o processo de germinação de muitas sementes (WEAVER, 1987).

O GA₃ tem desempenhado papel importante na quebra da dormência e da taxa de germinação de embriões como os de citrumelo (ONO et al, 1995), mangabeira (SOARES, 2009), videiras (VAL et al, 2010). Pancholi et al (1995) notou que o acréscimo de GA₃ no meio de cultura não alterou o percentual de

germinação em *Musa velutina*, porém contribuiu significativamente no número de raízes e crescimento da parte aérea.

Foi observada a formação de calos quando utilizados os tratamentos M4, M5 e M6 dos embriões de H2 (Figura 3E) e apenas nos embriões de H1 inoculados M6.

Geralmente, a utilização do regulador de crescimento BAP em meios de cultura tem como objetivo induzir a maior divisão celular, promovendo um rápido desenvolvimento do embrião. Porém, como os hormônios vegetais raramente, ou nunca, trabalham isoladamente mesmo diante da aplicação de um único hormônio, o tecido vegetal pode conter alguns hormônios internos que contribuem para a resposta final. Portanto, a formação de calos em M4, M5 e M6 sugerem a existência de uma concentração endógena de auxinas nos embriões, uma vez que uma relação intermediária entre auxinas e citocininas como o BAP, favorece o crescimento de tecido não diferenciado.

A formação de calos foi também observada por Reis et al (2007) ao estudar a germinação in vitro de *Schizolobium parahyba* var *amazonicum*, ao adicionar as concentrações de 1, 2 e 3 mg.L⁻¹ BAP, sendo que na ausência deste regulador não houve a formação de calos.

Impacto da adequação do meio de cultivo de embriões zigóticos para o programa de melhoramento de bananeira

A partir da constatação de que o meio de cultivo MS + 0,035 mg.L⁻¹ de GA₃+ 2,0 mg.L⁻¹ de BAP (M5) promoveu maior percentagem de germinação e um menor tempo de cultivo, o meio foi utilizado na rotina do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) da Embrapa Mandioca e Fruticultura para resgate de embriões das semente oriundas dos cruzamentos realizados no programa de melhoramento.

Em comparação com o período 1 (outubro de 2012 a março de 2013), onde se utilizou o meio MS sem adição de reguladores de crescimento, o cultivo dos embriões em meio M5 (Período 2 - outubro de 2013 a março de 2014) promoveu um acréscimo na porcentagem de germinação (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação do percentual de germinação in vitro de embriões oriundos dos cruzamentos realizados no programa de melhoramento antes (Período 1) e após (Período 2) a adequação do meio de cultivo para resgate de embriões.

	Período 1 (MS)	Período 2 (MS + GA ₃ + 2 mg.L ⁻¹ de BAP)
Número de cruzamentos	43	70
Número de sementes	2069	2874
Nº embriões cultivados	639	1943
% germinação dos embriões	5,66	40,50

No período 1 foram realizados 43 cruzamentos, dos quais 2069 sementes foram enviadas para o LCT, destas sementes apenas 639 embriões foram resgatados. Já no período 2, foram realizados 70 cruzamentos e foram enviadas para o LCT 2874 sementes, das quais foi possível o resgate de 1943 embriões. Segundo Silva et al. (1999) há uma considerável diferença observada na produção de sementes de banana, tanto em quantidade quanto qualidade, de acordo com a variedade dos parentais envolvidos nos cruzamentos., possivelmente devido a ausência de embriões, estágio de maturação, ausência de endosperma nestas sementes. Possivelmente, este fator também tenha influenciado no número de embriões obtidos no período 2.

Ainda que nestes cruzamentos o número de embriões introduzidos no período 1 (639) tenha sido bem menor do que os introduzidos no período 2 (1943), a elevação de 5,66% para 40,50% de embriões resgatados representa um grande impacto para o melhoramento de bananeira realizado na Unidade, principalmente porque alguns dos cruzamentos de interesse originam poucas sementes (Anexos 1 e 2), muitas das quais apresentam anomalias que inviabilizam a germinação na semeadura em substrato.

A suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento promoveu maiores chances de se obter um híbrido raro por meio do resgate de embrião in vitro, como podemos observar no ANEXO 2. A obtenção de plantas

híbridas a partir da cultivar Maçã, serve como exemplo desses cruzamentos raros, pois dificilmente se obtém um híbrido dessa cultivar devido a sua baixa fertilidade e má formação dos poucos embriões que produz. De 28 sementes produzidas pelo cruzamento da “Maçã” com o diploide 117, foi possível resgatar 20 embriões sendo que apenas 1 embrião regenerou planta.

O tempo de permanência dos embriões no meio de cultura MS com reguladores de crescimento (M5) deve ser controlado, uma vez que pode haver a formação de calos se após a germinação a plântula for mantida neste meio, o que não é desejado no resgate de embriões in vitro. Para evitar a formação de calos é necessário que logo após a germinação a plântula seja transferida para o meio MS sem reguladores visando o desenvolvimento adequado da parte aérea e das raízes.

CONCLUSÕES

A adequação do meio de cultura utilizado para o cultivo in vitro de embriões de banana, mediante a adição de reguladores de crescimento, representou um avanço importante para viabilizar a germinação de sementes de bananeira, e recuperação de híbridos raros.

Apesar do meio de cultura ser importante para a germinação de embriões zigóticos de banana, é necessário considerar que outros fatores como incompatibilidade de cruzamentos, contaminação por bactérias e fungos, tempo de conservação e forma de armazenamento das sementes também contribuem para o sucesso na obtenção de plantas híbridas.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, A. **Substâncias de crescimento vegetal e regulação do desenvolvimento vegetal**. Lavras: UFLA, 1990. 59 p.
- ASIF, M. J.; MAK, C.; OTHMAN, R. Y. *In vitro* zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* spp. *malaccencis* and factors affecting germination and seedling growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 267-270, 2001.
- BAKRY, F. Zygotic embryo rescue in bananas. **Fruits**, v. 63, n. 2, p. 111–115, 2008.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; ANTUNES, L. E. C.; SILVA, A. T. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv Acaiá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 847-851, 1998.
- CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. S. **Aplicação do cultivo de embrião zigótico ou imaturo, no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa-CNPA, 2007. (Documento, 170).
- CIONINI, P.G.; BENNICI, A.; ALPI, A.; D'AMATO, F. Suspensor, gibberelin and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. **Planta**, v. 131, p. 115-117, 1976.
- COX, E. A. *In vitro* culture of *Musa balbisiana* Colla embryos. **Nature**, v. 185, pp. 403–404, 1960.
- COSTA, N. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, p.276-279, 2007.
- DANTAS, A, C, M.; NUNES, J. C. O.; MORAES, L. K. A.; PEDROTTI, E. L.; NODARI, R. O. Resgate de embriões imaturos *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Mallus* spp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 246-249, 2001.

ENGELKE, A. L.; HAMZI, H. Q.; SKOOG, F. Cytokinin-gibberelin regulation of shoot development and leaf form in tobacco plantlets. **American Journal of Botany**, v. 60, p. 491-495, 1973.

GAUTAM, V. K.; MITTAL, A.; NANDA, K.; GUPTA, S.C. *In vitro* regeneration of plantlets from somatic explants of *Matthiola incana*. **Plant Science Letters**, v. 29, p. 25-32, 1983.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**; handbook and directory of commercial laboratories. Great Britain: British Library, 514p. 1984.

HOOLEY, R. Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 1529-1555, 1994.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 1, p. 371-393, 1998.

KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, New York, v.38, p.795-802, 1974.

LOPES, A. W. P.; SELEGUINI, A.; BOLIANI, A. C.; CÔRREA, L. S. Estádio de maturação do fruto e uso do ácido giberélico na germinação de sementes de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, p. 278-284, 2009.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 5, p. 473-497, 1962.

NEVES, T. S.; SILVA, S. O.; OLIVEIRA, R. P. Resgate in vitro de embriões em genótipos diploides de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 285-290, 2001.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.). **Ciências e Agrotecnologia**, v. 28, p. 1053-1059, 2004.

ONO, E. O.; LEONEL, S.; RODRIGUES, J. D. Efeitos de fitorreguladores na germinação de sementes de citrumelo "Swingle". **Semina: Ciências Agrárias**, v. 16, p. 47-50, 1995.

PANCHOLI, N.; WETTEN, A.; CALIGARI, P. D. S. Germination of *Musa velutina* seeds: comparison of in vivo and *in vitro* systems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 31, p. 127-130, 1995.

PASCAL, M. M.; HOFFMAN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos, tecnologia e aplicações**. Lavras: Universidade Federal de Lavras - FAEPE, Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. 159p, 1998.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S.P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F.C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. acaia cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, pp. 332-336, 2007.

PILLAY, M.; CULLIS, C. A.; TALENGERA, D.; TRIPATHI, I. Propagation methods in *Musa*. In: PILLAY, M. e TENKOUANO, A. (Ed). **Banana Breeding Progress and Challenges**. Boca Raton: CRC Press, p. 285-303, 2011.

PUTZ, C. Obtention de framboisiers (var. Bios blanc) sans virus par la technique des cultures de méristemes. **Phytopathology Journal**, v. 3, p. 493-501, 1971.

RASHID, K.; MAMAT, M.; DARAN, A. B. M.; NEZHADAHMADI, A.; RUSLAN, F.; KAYAT, F. Sees progeny population of wild banana *Musa acuminata* ssp. *malaccencis* for *Fusarium* screening. **Life Science Journal**, v.10, p. 671-679, 2013.

REIS, I. N. R. de S; LAMEIRA, O. A. CORDEIRO, I. M. C. C.; LACERDA, F. da C. B.; PINHEIRO, D. M.; CARDOSO, J. de N. O. Efeito do BAP e AG₃ na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de Paricá. In: Congresso Brasileiro de

Melhoramento de Plantas, 4, 2007, São Lourenço, MG. **Anais...**Melhoramento de plantas e agronegócio: anais. Lavras: UFLA: SBMP, 2007.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**.4. ed. California: Wadsworth, 682p.,1992.

SCHOOLER, A.B. The effect of gibberel and gibberellic acid (K salt) in embryo culture media for *Hordeum vulgare* L. **Agronomy Journal**, v.52, p.411,1960.

SCHROEDER, C.A.; SPECTOR, C. Effect of gibberellic acid and indoleacetic acid on growth of excised fruit tissue. **Science**, v.126,p. 701-702, 1957.

SILVA, S. O.; BORGES, M. F.; OLIVEIRA, R. P. Pollination and culture of banana embryos. **Infomusa**, v. 8, p. 24-28, 1999.

SRIVASTAV, M.; SINGH, S. K.; ARORA, R. L.; KRISHNA, B. Embryo Culture studies in subtropical peach (*Prunus persica* Batsch).**Acta Horticulturae**, v. 662, p. 297-301, 2004.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V.C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciências e Agrotecnologia**, v.33, edição especial, p. 1847-1852, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Ethylene and abscisic acid. In:TAIZ, L.; ZEIGER, E.**Plant physiology**: redwood city. Washington: Cummings, p. 482-487, 1991.

UMA, S.; LAKSHMI, S.; SARASWATHI, M. S.; AKBAR, A.; MUSTAFFA, M. M. Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp.).**Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 105-111, 2011.

VAL, A. D. B. do; MOTOIKE, S. Y; ALVARENGA, E. M.; CECON, P. R. Quebra de dormência de sementes da videira cv. Niágara rosada sem estratificação. **Ceres**, v.57, p. 234-238, 2010.

VUYLSTEKE, D., SWENNEN, R. Biotechnological approaches to plantain and banana improvement at IITA. In: **Cell and Tissue Culture**, Ibadan, Nigeria, p.143-149, 1991.

WEAVER, R. J. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura**. 5 ed. Barcelona: Editora Trillas, 1987.

CAPÍTULO 2

DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE BANANA ¹

DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE BANANA

Autora: Mariana Conceição Menezes

Orientadora: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

RESUMO: O armazenamento de sementes de banana em condições de baixa umidade e baixa temperatura (6 a 8 °C) não assegura a viabilidade das mesmas por um longo período de tempo. Neste contexto, a criopreservação permite preservar as sementes por longos períodos devido à estagnação do metabolismo celular. Portanto, o presente trabalho busca investigar a resposta de sementes de banana ao dessecamento e à criopreservação. Duas técnicas de dessecação foram utilizadas: a exposição das sementes em fluxo laminar nos intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas; e por câmaras de dessecação contendo solução salina saturada em diferentes teores de umidade (53, 64 e 75%). Cada amostra foi pesada antes e depois da secagem para o cálculo da quantidade de água perdida pelas sementes. Para a criopreservação foram utilizadas as sementes de dois híbridos, não dessecadas, e dessecadas em câmara de fluxo laminar por 4, 8, 12 e 16 horas. Notou-se que não há uma uniformidade na quantidade de água perdida pelas sementes ao longo do tempo na câmara de fluxo. A criopreservação estimulou a germinação dos embriões das sementes desidratadas em câmara de fluxo, obtendo-se até 47,22% de embriões germinados. O percentual de germinação dos embriões das sementes dessecadas, mas não submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido foi igual a 10%. Os embriões das sementes diretamente criopreservadas não apresentaram desenvolvimento. As sementes mantidas nas câmaras de dessecação perderam massa de água proporcionalmente a umidade relativa do ambiente em que estavam. As mantidas em ambiente aberto se mantiveram com o mesmo peso do início do tratamento.

Palavras-chave: nitrogênio líquido, teor de umidade, conservação.

DESICCATION AND CRIOPRESERVATION OF BANANA SEEDS

Author: Mariana Conceição Menezes

Adviser: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-adviser: Fernanda Vidigal Duarte Souza

ABSTRACT: The banana seed storage under low temperature (6 to 8°C) and low humidity does not ensure the viability for a long period of time. In this context, the cryopreservation allows to preserve the seeds for long periods due to stagnation of the cellular metabolism. Therefore, this study aims to investigate the banana seeds response to desiccation and cryopreservation. Two techniques for the dehydration were performed: Exposure of seeds in a laminar flow time intervals of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 hours; and desiccation chambers containing brine at different moisture contents (53, 64 and 75%). Each sample was weighed before and after drying to calculate the amount of water lost by the seeds. Two-hybrid seeds were used for the cryopreservation, not desiccated, and dried by a laminar flow hood for 4, 8, 12 and 16 hours. It was noted that there is no uniformity in the amount of water lost by the seeds over time in the flow chamber. Cryopreservation stimulated embryo germination of seeds in the flow chamber desiccated, so yielding 47.22% germinated embryos. The percentage of embryo germination of dried seeds but not subject to freezing in liquid nitrogen was only equal to 10%. The seeds directly cryopreserved embryos showed no development. The seeds kept in the chambers of desiccation lose water in proportion to the relative humidity of the environment where they were. The environment was kept open with the same weight remained the start of treatment.

Key-words: liquid nitrogen, moisture, conservation.

INTRODUÇÃO

A conservação de recursos genéticos vegetais é importante para a manutenção da diversidade de qualquer espécie. Para conservar estes recursos vegetais existem variadas estratégias de conservação, seja estas *in situ* ou *ex situ*. A conservação *ex situ* pode ser feita através de bancos de germoplasma, mantidos em campo, em laboratório (in vitro, de sementes) e em casas de vegetação.

Conservar o germoplasma tem uma importância notável dentro dos programas de melhoramento vegetal. Uma vez que o germoplasma conservado serve como um depósito genético aos quais os melhoristas podem recorrer quando lhes for necessário, como por exemplo, na resolução de um problema relacionado à resistência a uma doença ou desenvolvimento de uma determinada cultivar com características desejáveis pelo mercado.

A preservação do germoplasma de banana pode ser feito através de coleções em campo, através de bancos de sementes (diploides) e em laboratórios sob condições reduzidas de crescimento ou por criopreservação. A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui um Banco Ativo de Germoplasma de Bananeira (BAG Banana) que foi estabelecido a partir de 1983 mediante a realização de coleta e intercâmbio de germoplasma em nível nacional e internacional (ALVES, 1993; DANTAS et al., 1993). Este banco de germoplasma possui 341 acessos em condições de campo e in vitro (AMORIM et al, 2013), dos quais 90% são de cultivares e 10% de espécies silvestres (SILVA et al., 2005).

O BAG banana serve como reservatório de genes para o programa melhoramento genético da bananeira desenvolvido na Unidade, que tem como objetivo desenvolver bananas resistentes a doenças, produtivas, com porte e

ciclo da cultura reduzidos, mantendo o sabor dos frutos semelhante ao das cultivares Prata e Maçã (SILVA et al., 2005). Para isso têm sido utilizadas técnicas clássicas e não convencionais de melhoramento genético. A utilização do melhoramento convencional é feita através da hibridação, com o cruzamento entre diploides (AA) com cultivares comerciais (AAB), que geram sementes de híbridos diploides e tetraploides.

As sementes de banana produzidas pelos cruzamentos, mesmo quando armazenadas em condições de baixa temperatura (6 a 8°C) não se mantêm viáveis por um longo período. Necessitando de ajustes no armazenamento e utilização de novas técnicas para que a viabilidade máxima dessas sementes seja mantida.

A semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores, sendo, portanto uma importante fonte de material genético. A metodologia convencional de conservação de sementes utilizada em bancos de germoplasma e baseia na dessecação das sementes para teores muito baixos (cerca de 5%) e armazenamento em câmaras a temperatura abaixo de zero (-18 a -20°C) (SANTOS, 2000).

Naquelas condições o armazenamento de sementes de algumas espécies nem sempre é viável (RADHA et al., 2012), uma vez que muitas plantas não produzem sementes, como as bananas domesticadas, ou as sementes são recalcitrantes (não sobrevivem a secagem e congelamento durante a conservação *ex situ*) ou perdem a viabilidade em um curto espaço de tempo.

Dentro deste cenário, a criopreservação se destaca por ser um bom método de conservação das espécies, pois além de protegê-las de ataque de insetos e patógenos, consegue preservá-las por um longo período devido à estagnação do metabolismo celular (PANIS e LAMBARDI, 2005). A criopreservação vem sendo pesquisada desde a década de 1960 e tem sido testada com sucesso para várias espécies de plantas (VEIGA et al, 2006). E não são poucos os trabalhos que trazem listas de espécies que tem sido criopreservadas com sucesso (ENGELMANN, 1997; ENGELMAN e TAKAGI, 2000; REED, 2008).

Esta técnica consiste basicamente na conservação de material biológico em nitrogênio líquido, com temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Stushnoff e Seufferheld (1995) afirmam que a temperatura do nitrogênio líquido mantém a viabilidade das sementes durante o armazenamento por muitos anos, além de manter uma alta estabilidade genética.

Existem fatores que limitam a utilização rotineira da criopreservação em algumas culturas, uma vez que a sobrevivência e a regeneração do material criopreservado dependem de elementos como tamanho, estágio de desenvolvimento do material, dessecação, congelamento e descongelamento (SANTOS, 2000), demandando de uma etapa de preparação da estrutura vegetal a ser criopreservada.

Um destes procedimentos é desidratar o material a ser criopreservado evitando a formação de cristais de gelo no interior da célula. Os cristais de gelo quando formados causam danos físicos às células acarretando, por exemplo, a ruptura do sistema de membranas celulares, perda da permeabilidade seletiva e a compartimentalização das células.

O processo de dessecação envolve a retirada parcial da água das sementes através de dois eventos simultâneos como a evaporação da água superficial das sementes e o movimento de água do interior para a superfície das sementes. Isto ocorre devido à diferença de gradiente hídrico entre a umidade relativa da superfície e a do interior da semente durante o processo de secagem (SILVA, 1986). Deste modo, quanto menor a umidade relativa do ambiente maior é a capacidade de retirada de água da semente.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a resposta de sementes de bananeiras à dessecação visando à criopreservação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes utilizadas nos ensaios foram retiradas de frutos amadurecidos naturalmente, lavadas em água para a retirada de restos de polpa aderidos à superfície e para que as sementes inviáveis (que boiaram na água) fossem separadas e descartadas. Em seguida foram as sementes viáveis foram submetidas à secagem ao ar por 7 dias, à temperatura ambiente.

Previamente aos ensaios, as sementes foram submetidas ao processo de desinfestação, em ambiente asséptico, promovido por câmara de fluxo laminar, que consistiu na imersão das sementes em álcool 70% por 5 minutos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 60% durante 30 minutos e depois lavadas por três vezes com água destilada estéril.

Ensaio de dessecação de sementes de banana em câmara de fluxo e criopreservação:

- **Dessecação das sementes em câmara de fluxo**

Utilizou-se como material biológico sementes oriundas de polinização aberta dos híbridos diploides 013018-01 (H1) e 073041-03 (H2), e dos cruzamentos entre 091094-04 e 017041-01 (H3), e entre 091094-04 e 042079-06 (H4). Amostras contendo 40 sementes foram submetidas à dessecação por fluxo laminar (Figura 1), durante os intervalos de tempo: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas (exceto para H1 e H2 onde não foi feita dessecação por 16 horas) em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

Para estimar o teor de umidade das sementes, as amostras foram pesadas antes e depois do processo de dessecação, utilizando a fórmula abaixo (BRASIL, 2009):

$$\text{TU} = \frac{\text{MA}}{\text{Pi}} \times 100$$

Em que:

TU = Teor de Umidade;

MA= Massa de Água, dada pela diferença entre o peso inicial e o peso final;

Pi = Peso inicial.



Figura 1. Sementes de banana sendo expostas ao fluxo de ar proporcionado por câmara de fluxo laminar.

- **Criopreservação de sementes de bananeira desidratadas em câmara de fluxo**

Após a dissecação por 4, 8, 12 e 16 horas, metade das sementes de cada amostra (20 sementes) dos híbridos H3 (híbridos 091094-04 x 017041-01) e H4 (091094-04 x 042079-06) foi acondicionada em criotubos de 2,0 ml, sendo 10 sementes por criotubo, e armazenada em nitrogênio líquido durante uma semana (Figura 2). Como testemunha utilizou-se sementes que não sofreram nenhum tipo de desidratação por fluxo laminar, sendo que uma amostra foi diretamente para o resgate de embrião e outra foi congelada em nitrogênio líquido.

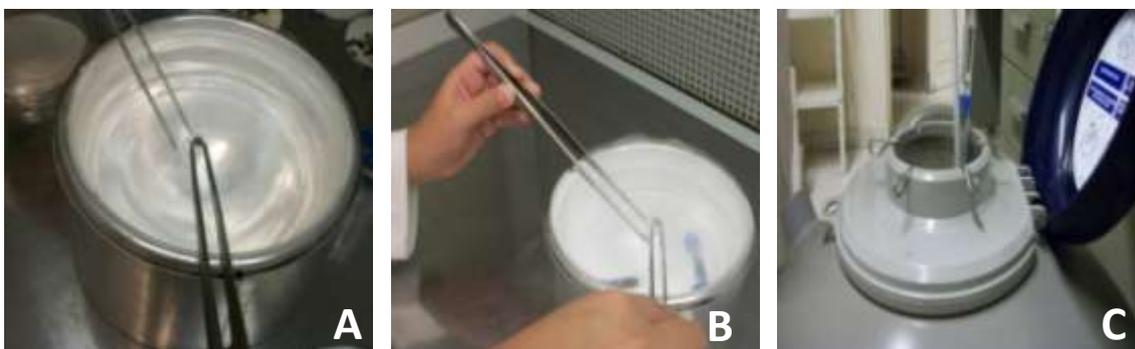


Figura 2. Criopreservação de sementes de bananeira. A - Acondicionamento de sementes em criotubos de 2mL após dessecação em câmara de fluxo laminar. B- Imersão dos criotubos contendo as sementes de banana em nitrogênio líquido. C- Armazenamento dos criotubos em botijão criogênico.

Para descongelamento os criotubos contendo as sementes criopreservadas foram imersos em água a 40 °C por 1 minuto. Em seguida, as sementes foram submetidas novamente ao processo de desinfestação (álcool 70% por 5 minutos, hipoclorito de sódio a 60% por 30 minutos e lavagem por três vezes em água esterilizada), seguido de reidratação (Figura 3A) por 20 minutos.

Após este processo, os embriões foram excisados (Figura 3B) e inoculados em placas de Petri contendo 40 ml de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 0,035 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃), 2,0 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 30 g.L⁻¹ de sacarose e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel[®] (Figura 3C).



Figura 3.Resgate de embrião de sementes de banana.A- Sementes de banana imersas em água esterilizada após dessecação. B- Excisão dos embriões sob estereoscópio. C- Inoculação do embrião na placa de Petri contendo o meio de cultura.

As outras 20 sementes de cada amostrados híbridos H3 e H4,dessecadas por 4, 8, 12 e 16 horas,foram embebidas em água esterilizada por 20 minutos para serem reidratadas e facilitar a excisão dos embriões sob estereoscópio. Os embriões foram excisados e inoculados sob as mesmas condições das outras sementes que foram submetidas ao processo de congelamento em nitrogênio líquido.

Após a inoculação, os embriões tanto das sementes apenas secas quanto os das sementes criopreservadas foram mantidos no escuro a 26±1°C

durante 6 semanas. Após este período avaliou-se a quantidade de embriões germinados.

Ensaio de dessecação de sementes de banana através de soluções salinas saturadas e criopreservação:

Para este ensaio utilizou-se 200 sementes oriundas do cruzamento entre FHIA-02 e M53. As sementes foram repartidas em 5 amostras de 40 sementes dispostas em recipiente de papel e colocadas em câmaras de dessecação hermeticamente fechadas contendo ao fundo soluções salinas saturadas (Figura 4).

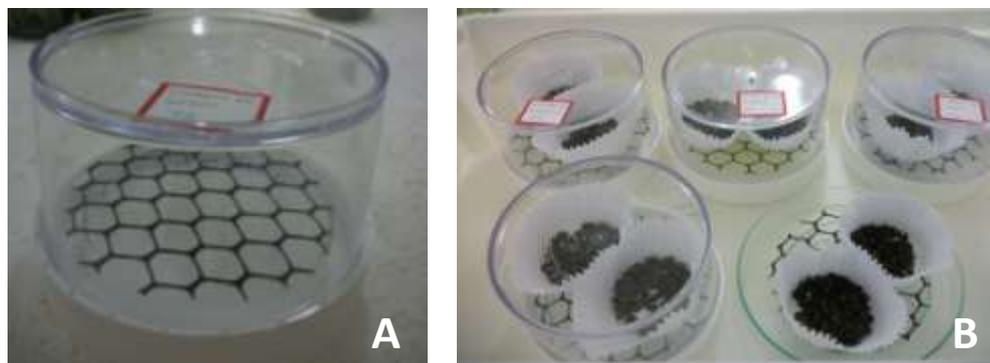


Figura 4. A- Câmara de dessecação contendo placa de Petri com solução salina saturada, coberta com uma tela plástica. B- Amostras de sementes de banana submetidas à dessecação.

Para o preparo da solução salina saturada, adicionou-se uma quantidade de sal suficiente para ocupar $\frac{3}{4}$ da altura da placa de Petri (90 x 20 mm) e em seguida água destilada até que o sal se tornasse úmido. Misturou-se a solução salina com auxílio de uma espátula de inox e estas foram mantidas destampadas nos recipientes hermeticamente fechados por 48 horas, retirando o excesso de água periodicamente com uma pipeta descartável. As soluções salinas saturadas produzem umidade relativa do ar própria de cada sal em uma determinada temperatura, portanto considerou-se que as sementes estavam sobre as umidades relativas da atmosfera conferida por cada sal.

As soluções salinas saturadas utilizadas neste experimento foram:

- a) Nitrato de Magnésio – $Mg(NO_3)_2$ – que mantém umidade relativa da atmosfera (URA) igual a 53%;
- b) Nitrito de Sódio – $NaNO_2$ – URA = 64%;
- c) Cloreto de sódio – $NaCl$ – URA = 75%;

No tratamento controle as sementes ficaram expostas ao ambiente, suscetível a variações umidade relativa do ar. A umidade relativa do ar na sala onde o experimento era de 60% conforme a medida do higrômetro.

As amostras permaneceram a temperatura ambiente ($26\text{ }^\circ\text{C}\pm 1$) durante 7 dias. Para verificar o teor de umidade de equilíbrio das sementes, pesaram-se as amostras antes e depois do procedimento de dessecação.

Semelhante ao que foi feito com as sementes dissecadas em fluxo laminar, metade das sementes de cada amostra foi reidratada e o embrião excisado e inoculado em meio M5. A outra metade foi acondicionada em criotubos e congelada em nitrogênio líquido por uma semana, descongelada em banho-maria a 40°C por 1 minuto e submetidas à desinfestação superficial e reidratada em água estéril por 20 minutos, antes da excisão do embrião e inoculação em meio M5. A percentagem de embriões germinados foi contabilizada após 6 semanas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de dessecação de sementes de banana em câmara de fluxo e criopreservação:

Observou-se uma instabilidade no teor de umidade das sementes durante o intervalo de tempo de exposição ao fluxo laminar (Tabela 1). Com a dessecação por câmara de fluxo, esperava-se que o teor de umidade reduzisse proporcionalmente ao longo do tempo. A ocorrência da oscilação pode ser devido ao equilíbrio higroscópico da semente com o ambiente proporcionado pelo fluxo laminar.

Tabela 1. Massa de água (g) e Teor de água perdida (TAP, %) nas sementes de quatro híbridos de bananeira expostas à dessecação em câmara de fluxo laminar ao longo do tempo.

Tempo	H1		H2		H3		H4	
	TAP	MA	TAP	MA	TAP	MA	TAP	MA
2 horas	1,72	0,83	1,51	0,73	1,65	0,66	2,19	0,73
4 horas	1,97	0,86	1,06	0,41	3,04	1,29	1,01	0,56
6 horas	1,06	0,45	1,63	0,78	2,20	1,04	2,56	1,30
8 horas	1,05	0,51	0,97	0,59	2,13	0,96	2,29	1,08
10 horas	1,18	0,58	2,26	1,12	2,40	1,22	2,21	1,36
12 horas	1,77	0,88	0,77	0,37	5,98	2,44	5,42	1,85
14 horas	1,00	0,43	2,55	0,99	2,61	1,09	2,80	2,80
16 horas	*	*	*	*	1,75	0,97	2,79	2,79

* Não houveram sementes submetidas a este processo de dessecação.

As sementes entram em equilíbrio higroscópico com o ambiente, e cedem ou absorvem umidade do ambiente que as envolve. Sendo assim, se a pressão de vapor de água na semente for menor do que a do ar, ela absorve a umidade deste, caso ocorra o inverso, a semente cede água ao ambiente.

A partir dos resultados obtidos, podemos observar que em ao longo do tempo houve momentos em que as sementes perderam maior quantidade de água (entre 2 e 8 horas de dessecação) e outros (entre 14 e 16 horas) com absorção de água (Tabela 1). Isto pode indicar que o método de secagem por câmara de fluxo laminar não é um método preciso para se desidratar sementes de banana por um longo período de tempo, uma vez que após entrar em equilíbrio com a umidade relativa do ambiente a perda de água é minimizada e a variação do teor de umidade e da temperatura do ambiente alteram o processo de perda de água.

Na tabela 2 encontram-se os dados de germinação das sementes dos híbridos H3 e H4 submetidas ou não ao congelamento em nitrogênio líquido a -196°C. De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que as sementes de banana se comportaram como sementes ortodoxas, conforme sugerem Ellis (1991) e Chin (1996), mantendo a viabilidade germinativa a baixas temperaturas e baixo teor de água.

Tabela 2. Percentagem de germinação de embriões zigóticos de bananeira oriundas dos cruzamentos 091094-04 x 017041-01 (H3) e 091094-04 x 042079-06 (H4) submetidos à dessecação por fluxo laminar por diferentes períodos, após armazenamento em nitrogênio líquido.

Tempo (Horas)	H3		H4	
	Controle (%)	Nitrogênio Líquido (%)	Controle (%)	Nitrogênio Líquido (%)
0	10,00	0,0	5,00	0,0
4	10,00	35,00	20,00	35,00
8	10,00	15,00	10,00	47,22
12	10,00	5,00	35,00	15,00
16	15,00	19,09	20,00	27,39

Notou-se que independentemente do teor de água de água perdido e do tempo de dessecação a percentagem de germinação após a criopreservação sofreu um acréscimo (Figura 5). Especula-se que a ocorrência de modificações na fisiologia dos componentes internos da semente durante a permanência em temperaturas ultra-baixas, como a proporcionada pelo nitrogênio líquido, pode interferir na germinação do embrião. Goldfarb et al. (2008) obtiveram um resultado semelhante ao verificar que os percentuais germinativos das sementes de pinhão manso crioconservadas (-196°C) foram superiores aos das sementes armazenadas a temperatura ambiente. Jitsopakula et al. (2012) observaram que o nitrogênio líquido favoreceu a germinação em sementes maduras de *Vanda tricolor*, o que poderia indicar que as sementes tinham algum mecanismo de dormência induzido por substâncias inibidoras ou causadoras de impermeabilidade no embrião. Com o tratamento com a criopreservação essas sementes podem ter tido parte do tegumento rompido, promovendo a germinação delas.

Ainda são necessários ajustes na metodologia de dessecação e do processo de descongelamento das sementes de banana, uma vez que foi observado o rompimento do tegumento durante o descongelamento, especialmente nas sementes. Embora Villalobos et al. (1992) tenham relatado que embriões zigóticos de *Musa acuminata* e *M. balbisiana* foram mantidos em nitrogênio líquido e germinaram após descongelamento a 40 °C, observou-se no presente trabalho que o rompimento do tegumento muitas

vezes foi acompanhado pela exposição dos tecidos internos de algumas sementes, devido a grande quantidade de água absorvida nas sementes. Esta mesma tendência foi observada no tratamento controle, onde as sementes não sofreram nenhum tipo de dessecação.

A maior média de germinação obtida em H3 foi a de 35% nos embriões criopreservados com teor de água perdida igual a 3,04%. Em H4, a maior média de germinação foi a de 47,22% nos embriões criopreservados com teor de água perdida igual a 2,29%. Bhat et al. (1994) conseguiram obter sementes sobreviventes quando expostas a nitrogênio líquido, estando elas inteiras e com 13,2% de umidade com descongelamento rápido, sendo que 90% dos embriões germinaram.

Por outro lado, não houve desenvolvimento do embrião nas sementes criopreservadas que não passaram pelo processo de dessecação (Figura 5A, B), reforçando que um alto teor de água na semente pode causar a morte do embrião após a criopreservação. Almeida et al. (2007), ao estudarem o efeito do teor de umidade em sementes de *Anethum graveolensis* perceberam que do teor de umidade limite era compreendida entre 9 a 11%, acima desses valores havia redução da germinação.

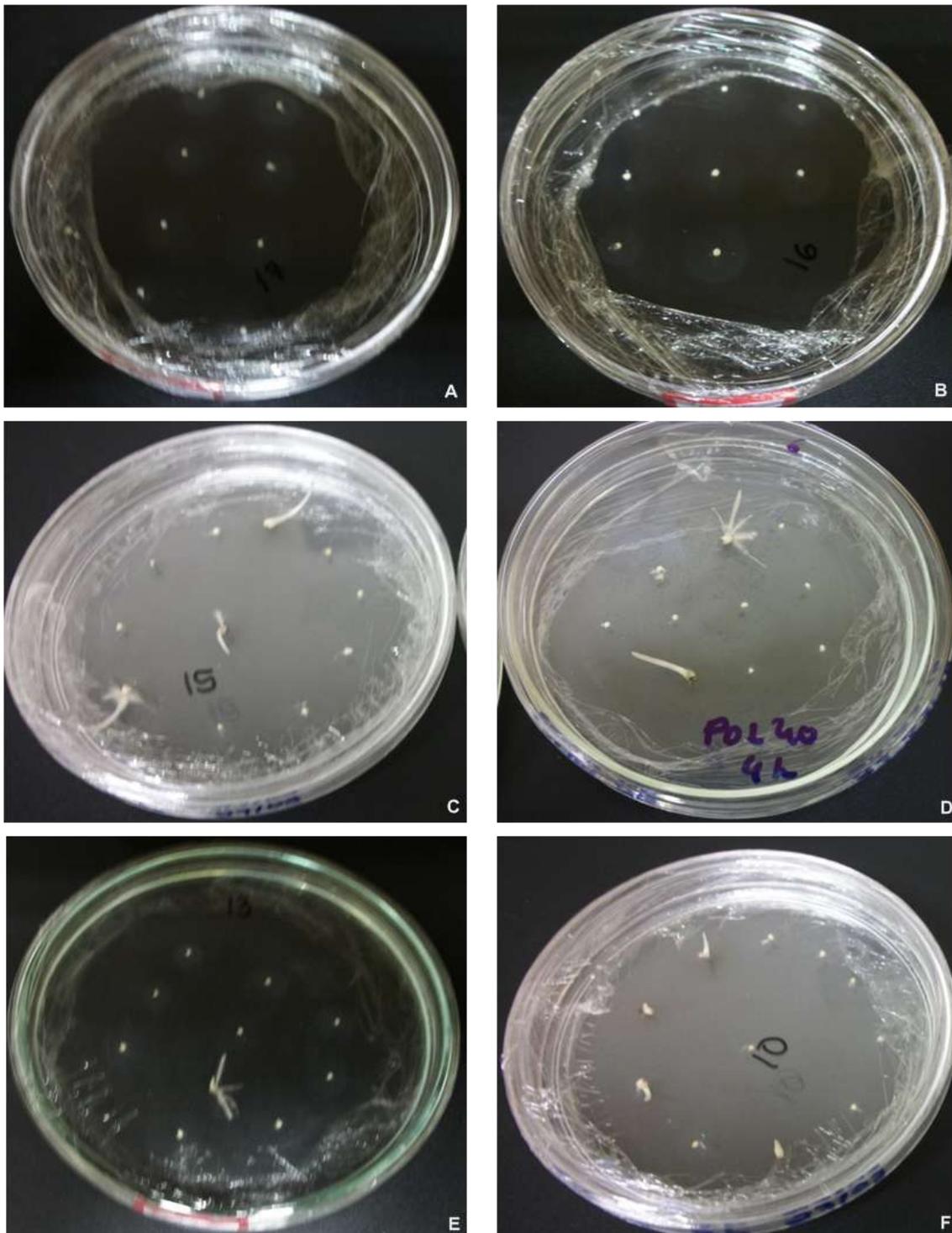


Figura 5. Cultivo in vitro após 6 semanas dos embriões excisados das sementes criopreservadas: A e B – Embriões de H3 e H4, respectivamente, pertencentes ao controle. C e D- Embriões de H3 e H4, respectivamente, após a dessecação das sementes em câmara de fluxo por 4 horas. E- Embriões de H3 após secagem das sementes por 12 horas. F- Embriões de H4 extraídos após 8 horas de dessecação das sementes por 8 horas.

Ensaio de dessecação de sementes de banana através de soluções salinas saturadas

Uma vez que as sementes estavam acondicionadas em câmaras de dessecação onde a umidade relativa do ambiente foi determinada pela solução salina utilizada. Como estavam sobre condições controladas, notou-se que quanto menor era a umidade mais água era retirada da semente pelo sal. Esses dados atenderam à regra do equilíbrio de gradiente hídrico, onde o ambiente que tem maior concentração de água transfere para o ambiente onde tem menos, para assim promover o equilíbrio hídrico.

Tabela 3. Umidade Relativa do Ambiente (URA), Massa de água perdida (MA, g) pelas sementes e percentual de germinação dos embriões de bananas oriundos do cruzamento entre FHIA-02 e M53 após mantidos por 7 dias em câmaras contendo soluções salinas saturadas e imersos em nitrogênio líquido (Nliq).

Solução Saturada	URA (%)	MA (g)	Germinação Sem Nliq (%)	Germinação Após Nliq (%)
Nitrato de Magnésio	53	1,38	10,0	10,0
Nitrito de Sódio	64	1,96	15,0	20,0
Cloreto de sódio	75	0,11	20,0	5,0
Ambiente	60	0,01	5,0	10,0

O uso de soluções salinas é bastante comum para o estabelecimento do teor de umidade de sementes, uma vez que o sal mantém a umidade do recipiente constante, favorecendo assim a umidade de equilíbrio pretendida.

O percentual de germinação dos embriões excisados das sementes mantidas em câmara de dessecação contendo solução salina saturada de Nitrato de Magnésio (URA= 53%) permaneceu constante quando comparado às sementes que não passaram pelo processo de criopreservação. O percentual de germinação dos embriões das sementes mantidas em câmaras contendo solução salina de Cloreto de Sódio (URA= 75%) reduziu após a criopreservação, tal fato pode ter sido pela elevada quantidade de água da semente que pode ter proporcionado formação de cristais de gelo e

consequente morte de alguns dos embriões. Nos demais tratamentos observou-se o acréscimo da germinação após a criopreservação, repetindo o resultado observado com a dessecação por câmara de fluxo.

CONCLUSÃO

Entre os dois métodos de dessecação utilizados, o uso de solução saturada salina apresenta maior controle da umidade relativa do ambiente, podendo ser mais indicado para dissecação das sementes a um nível mais baixo de umidade.

A imersão em nitrogênio líquido pode ter estimulado o potencial germinativo dos embriões das sementes de banana dos genótipos estudados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. de A. C.; ALVES, N. M. C.; GOMES, J. P.; SILVA, D. R. S. Determinação do teor de umidade limite de sementes de endro (*Anethum graveolens*) para crioconservação. **Revista Brasileira de Biologia e Ciências da Terra**, p. 153-159, 2007.
- ALVES, E. J. Programa de melhoramento genético da banana e plátano na Embrapa-CNPMPF: planejamento, implantação e progressos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 15, p. 83-94, 1993.
- AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. Banana Breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**, v. 986, p. 171-176, 2013.
- BHAT, S. R.; BHAT, K. H. e CHANDEL, K. P. S. Studied on germination and cryopreservation of *Musa balbisiana* seed. **Seed Science and Technology**, v. 22, p. 637-640, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, p. 307, 2009.

CHIN, H. F. Germination and storage of banana seeds. In: NEW FRONTIERS IN RESISTANCE BREEDING FOR NEMATODE, FUSARIUM AND SIGATOKA WORKSHOP, 1995. Kuala Lumpur. **Proceedings...** Montpellier: International Network for the Improvement of Banana and Plantain, p.218-227, 1996.

DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA, S. O.; SOUZA, A. S. **Citogenética e melhoramento genético da bananeira (*Musa spp*)**. Brasília: Embrapa-CNPMPF, 1993. (Documento, 48).

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resource News**, v.112, p. 9–18, 1997.

ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of tropical plant germplasm -current research progress and applications**. JIRCAS, Tsukuba; 2000.

ELLIS, R.H. The longevity of seeds. **HortScience**, v. 26, p. 1119-1125. 1991

GOLDFARB, M.; MARTINS, M. A. E. D.; MATA, M. E. R. M. C.; PIMENTELL, L. W.; SEVERINO, L. S. Teor de água limite para crioconservação das sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 10, p. 121-129, 2008.

JITSOPAKULA, N.; THAMMASIRIB, K. YUKAWAC, T. ISHIKAWAD, K. Effect of cryopreservation on seed germination and protocorm development of *Vanda tricolor*. **Science Asia**, v. 38, p. 244 – 249, 2012.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J; SONNINO, A. (Ed.) **The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources**. Rome, FAO, 2005.

RADHA, R. K.; DECRUSE, W. S.; KRISHNAN, P. N. **Plant Cryopreservation**. In: KATKOV, I. (Ed.). *Current Frontiers in Cryopreservation*. Intech, Rijeka, p. 431-437, 2012.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, Berlin, 2008.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SILVA, S. O.; MORAIS, L. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. **Melhoramento genético de bananeira para resistência a doenças**. In: ROMÃO, R. L.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). *Recursos genéticos vegetais no Estado da Bahia*. Feira de Santana: UEFS, p.49-67, 2005.

SILVA, W. R. Secagem das sementes. In: CICERO, S. M.; MARCOS FILHO, J. **Atualização em produção de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 182p, 1986.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v. 32, **Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, p. 87-10, 1995.

VEIGA, R.F. de A.; MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C. A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agrônômico (IAC). **O Agrônômico**, v. 58, p. 19-21, 2006.

VILLALOBOS, V.M.; ABBELNOUR, A.; ADAMS, R.P.; ADAMS, J.E. Cryopreservation of *Musa* spp. and its potential for long-term storage of other tropical crops. **Conservation of plant genes: DNA banking and in vitro biotechnology**. p.197-210, 1992.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho atingiu o objetivo de adequar o meio de cultura MS a partir da adição de reguladores de crescimento do tipo BAP e GA₃ visando elevar a taxa de germinação in vitro de embriões zigóticos de bananeira oriundos do programa de melhoramento genético. A técnica de resgate de embriões e a utilização do meio MS atendiam ao programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura, porém muitos dos embriões híbridos eram eliminados por não apresentar desenvolvimento, uma vez que só obtínhamos 5% de germinação.

Adequando o meio de cultura, conforme explicado no capítulo 1, se obteve um aumento bastante significativo na germinação de embriões, obtendo-se a porcentagem de 40,50%. Diante da dificuldade de se obter embriões viáveis devido à baixa produção de sementes oriundas de alguns cruzamentos, além de barreiras fisiológicas e físicas, o uso deste meio de cultura afeta diretamente a rotina de obtenção de plantas para o programa de melhoramento. Porém, o meio de cultura é apenas uma das formas de contornar a baixa germinação, sugere-se que aliado a ele sejam efetuadas pesquisas sobre necessidades nutricionais e estágio de maturação das sementes para que se tenha um aproveitamento ainda maior dos cruzamentos.

Tendo definido o meio de cultura a ser utilizado no resgate de embriões, seria necessário também adequar as condições de armazenamento de sementes em nitrogênio líquido. A criopreservação garante a manutenção da viabilidade das sementes por um longo período, permitindo que a avaliação de híbridos seja realizada à medida que se tenha disponibilidade de área para plantio, recursos financeiros, mão de obra e demais condições necessárias.

A dessecação por solução salina saturada mostrou eficácia para promover a perda de água pela semente em proporção às umidades relativas dos ambientes. A criopreservação agiu positivamente no desenvolvimento dos embriões das sementes de banana após a dessecação.

ANEXOS

Anexo 1 - Cruzamentos efetuados durante o período 1, embriões inoculados, germinados e percentual de germinação.

Mãe	Pai	Embriões Inoculados	Embriões Germinados	% Germinação
95	BGB 040	1	0	0.00
Bucaneiro	118	3	0	0.00
Caipira	96	2	1	50.00
Caipira	95	5	0	0.00
FHIA 17	119	8	0	0.00
FHIA 17	118	1	0	0.00
FHIA 17	Desc	28	0	0.00
FHIA 23	96	17	5	29.41
Malbut	91	2	0	0.00
NBA	128	32	0	0.00
Pacovan	desc	4	0	0.00
Princesa	119	42	0	0.00
Princesa	98	33	0	0.00
Princesa	89	22	5	22.73
Princesa	91	10	2	20.00
Princesa	BGB 026	18	0	0.00
Princesa	112	28	0	0.00
Princesa	BGB 040	4	0	0.00
Princesa	BGB 025	4	0	0.00
Princesa	BGB 048	2	1	50.00
Princesa	48	4	0	0.00
PV79-34	119	70	0	0.00
PV79-34	desc	46	0	0.00
TDM	122	6	0	0.00
TDM	103	50	15	30.00
Tropical	desc	2	0	0.00
Tropical	128	6	0	0.00
Tropical	119	1	0	0.00
Tropical	desc	15	0	0.00
Tropical	BGB 025	1	0	0.00
YB42-03	122	7	3	42.86
YB42-03	desc	107	0	0.00
YB42-03	111	3	0	0.00
YB42-03	116	52	2	3.85

Anexo 2 - Cruzamentos efetuados durante o período 2, embriões inoculados, germinados e percentual de germinação:

Mãe	Pai	Embriões Inoculados	Embriões Germinados	% Germinação
96	96	51	4	7.84
086079-09	96	1	1	100.00
Ambrosia	106	21	0	0.00
Ambrosia	117	20	5	25.00
Ambrosia	BGB 040	4	1	25.00
Ambrosia	90	13	10	76.92
Bucaneiro	106	76	27	35.53
Bucaneiro	117	6	2	33.33
Bucaneiro	119	18	12	66.67
Bucaneiro	BGB 026	5	1	20.00
Bucaneiro	143	15	14	93.33
Caipira	106	7	0	0.00
Caipira	BGB 025	6	0	0.00
Caipira	117	3	3	100.00
Calypso	117	4	3	75.00
Calypso	106	8	6	75.00
FHIA 02	96	5	3	60.00
FHIA 02	BGB 025	1	1	100.00
FHIA 02	79	1	1	100.00
FHIA 02	BGB 048	1	1	100.00
FHIA 18	90	1	1	100.00
FHIA 18	BGB 048	2	1	50.00
FHIA 18	79	1	1	100.00
FHIA 23	106	30	14	46.67
FHIA 23	104	1	1	100.00
Garantida	79	8	8	100.00
Garantida	90	1	0	0.00
Garantida	96	7	4	57.14
IAC 504	BGB 071	1	0	0.00
Japira	96	1	0	0.00
Japira	90	1	1	100.00
Japira	79	3	1	33.33
Maçã	117	20	1	5.00
P Santa Maria	96	2	1	50.00
Pacovan	111	1	0	0.00
Pacovan	96	1	0	0.00
Pacovan Ken	119	1	0	0.00
Pacovan Ken	BGB 048	48	19	39.58
Pacovan Ken	96	2	2	100.00
Pioneira	104	5	0	0.00

Anexo 2 – Continuação... Cruzamentos efetuados durante o período 2, embriões inoculados, germinados e percentual de germinação:

Mãe	Pai	Embriões Inoculados	Embriões Germinados	% Germinação
Platina	79	1	0	0.00
PPA	96	1	0	0.00
Prata Anã	79	1	0	0.00
Prata comum	106	1	0	0.00
Preciosa	90	2	2	100.00
Preciosa	106	1	0	0.00
Princesa	BGB 025	71	4	5.63
Princesa	79	20	4	20.00
Princesa	117	203	13	6.40
PV94-01	79	1	0	0.00
Thap Maeo	BGB 035	101	60	59.41
Tropical	BGB 008	5	0	0.00
Tropical	90	22	4	18.18
Tropical	BGB 025	7	2	28.57
Tropical	126	5	5	100.00
YB42-17	BGB 048	102	88	86.27
YB42-17	BGB 025	15	0	0.00
YB42-03	BGB 048	168	62	36.90
YB42-03	106	72	1	1.39
YB42-03	96	106	10	9.43
YB42-03	BGB 025	275	130	47.27
YB42-03	BGB 008	34	14	41.18
YB42-03	126	11	0	0.00
YB42-03	BGB 049	38	31	81.58
YB42-03	117	45	41	91.11
YB42-03	111	70	8	11.43
YB42-47	BGB 049	45	0	0.00
YB42-47	BGB 048	1	0	0.00
YB42-47	BGB 025	57	19	33.33
YB42-47	117	59	48	81.36