

**DETECÇÃO DE VARIANTES
SOMACLONAIS DE BANANEIRA ‘PRATA
ANÃ’(AAB) MICROPROPAGADA**

JANAÍNA DE OLIVEIRA COSTA E SILVA

2007

JANAÍNA DE OLIVEIRA COSTA E SILVA

**DETECÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIAS DE BANANEIRA
'PRATA ANÃ'(AAB) MICROPROPAGADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Co-orientadores

Prof. Antônio Chalfun-Júnior

Prof. Amauri Alves de Avarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Janaína de Oliveira Costa

Detecção de variantes somaclonais de bananeira 'Prata Anã' (AAB)
micropropagada / Janaína de Oliveira Costa e Silva. -- Lavras: UFLA, 2007.
97 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva

Co-orientadores: Antônio Chalfun-Júnior, Amauri Alves de Avarenga

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Micropropagação.
 2. Variação Somaclonal
 3. Espectrometria de Massas.
 4. Giberelina
 5. Anatomia vegetal
- I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.7723

JANAÍNA DE OLIVEIRA COSTA E SILVA

**DETECÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIAS DE BANANEIRA
'PRATA ANÃ' (AAB) MICROPROPAGADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 02 de fevereiro de 2007.

Prof. Antônio Chalfun-Júnior

Prof. Evaristo Mauro de Castro

Prof. Mário César Guerreiro

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por ter me dado a mão em todos os momentos de minha vida, e por ter me carregado do colo no mais difíceis.

OFEREÇO.

Aos meus pais e meu irmão que são a base do meu ser e que sempre estão ao meu lado me dando força para seguir em frente.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz que guia meus caminhos e sempre está ao meu lado acompanhando os passos da minha vida

Aos meus pais e meu irmão, a quem eu tanto amo e que sempre me apoiaram e me deram muito carinho e amor para que eu pudesse continuar sempre

Ao Júnior, meu amor e companheiro que esteve ao meu lado para me ajudar a superar os momentos difíceis e celebrar os de felicidade

A todos os meus amigos que são a família que Deus nos permite escolher, sempre companheiros e que me fizeram e me fazem ainda muito mais feliz

As minhas avós e aos meus familiares que sempre estiveram junto comigo me acompanhando me dando todo apoio

A Marli e ao Geldo que me adotaram como filha e que me deram todo carinho e força

A Janinha e ao Evandro que me acolheram como filha e sempre tiveram muito carinho comigo

Ao Marcel, meu amigo e grande mestre, que me ensinou os primeiros passos da Fisiologia Vegetal e que sempre esteve ao meu lado me apoiando e acreditando em mim

A todos os meus professores, se hoje estou redigindo essa dissertação é porque eles acreditaram em mim e me ajudaram a crescer em aprendizado a cada dia

A todos os amigos do LCBM que me acompanharam nesses dois anos e me ajudaram demais em todos os experimentos e me deram muito apoio também

Ao Izonel, a Lena, a Tininha, ao Marcelo, ao Odorencio, ao Joel ao Tanhan, e a todos os funcionários da Fisiologia, sempre amigos e que me ajudaram muito, sem eles este trabalho não seria possível

À Cynthia, além de amiga, me ajudou tanto nos trabalhos anatômicos e que acreditou sempre que seríamos capazes de fazer um bom trabalho

Ao Delly e a Lu, sempre disponíveis e que me ajudaram muito na parte estatística

Ao Miguel por toda ajuda no laboratório e pelo carinho e amizade sempre

À Maraisa e ao Dedé por toda ajuda nos trabalhos de espectrometria e pelos cafezinhos e conversas que me ajudaram a distrair nos momentos de tensão

Ao Hermínio, pelas dicas e conselhos e pela amizade

À Jamile, minha querida professora e amiga, nunca vou me esquecer de como você foi e é importante para mim

Ao pessoal do pomar, que me ajudaram a plantar todas aquelas bananeiras

Ao Luciano e ao Chalfun, pela orientação e por ceder o laboratório e o subsídio para a realização dos trabalhos

Ao Mário e ao Evaristo, que além de me orientarem foram grandes amigos e me apoiaram muito para que eu pudesse alcançar meus objetivos e concluir mais essa etapa da minha vida

BIOGRAFIA

Janaína de Oliveira Costa e Silva, filha de Aloísio José da Silva e Raquel de Oliveira Costa e Silva, nasceu em 5 de maio de 1983, na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino médio no Colégio São Bento em dezembro de 2000, na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais.

Graduou-se Bióloga pela Universidade Federal de Minas Gerais em dezembro de 2004, onde foi bolsista de monitoria do PID, de maio a setembro de 2003, na área de Fisiologia Vegetal.

Ingressou no mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, em março de 2005, na Universidade Federal de Lavras, onde concluiu o curso em 2 de fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1 INTRODUÇÃO	4
2 REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1 Origem, taxonomia e evolução de bananeiras cultivadas.....	6
2.2 Cultivares de banana	6
2.3 Propagação convencional.....	7
2.4 Micropropagação.....	7
2.4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	8
2.4.2 Variação Somaclonal	9
2.4.3 Giberelinas	11
2.5 Anatomia vegetal comparada.....	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPITULO II - DETECÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIIS DE BANANEIRA ‘PRATA ANÃ’ MICROPROPAGADA	18
POR ASPERSÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO	18
1 RESUMO	19
2 ABSTRACT	20
3 INTRODUÇÃO	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Material vegetal.....	24
4.2 Experimento 1 - Aplicação de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA ₃) em mudas de bananeiras ‘Prata Anã’ micropropagadas para verificar a presença de variantes somaclonais e possível ação fitotóxica de GA ₃	25
4.3 Experimento 2 - Aplicação foliar de ácido giberélico (GA ₃), juntamente com espalhante adesivo, para verificar a frequência de aplicação adequada para a detecção precoce de variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ micropropagadas	26
4.4 Experimento 3 - Aplicação de ácido giberélico (GA ₃), com espalhante adesivo, visando detectar precocemente os variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ utilizando delineamento em DIC	27

4.5 Experimento 4 - Aplicação de ácido giberélico (GA ₃), com espalhante adesivo, visando detectar precocemente os variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ utilizando delineamento em DBC.....	28
4.6 Experimento 5 - Anatomia foliar de bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais após aplicação de ácido giberélico (GA ₃) com espalhante adesivo	29
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Experimento 1	31
5.2 Experimento 2	32
5.3 Experimento 3	36
5.4 Experimento 4	40
5.5 Experimento 5	42
6. DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES.....	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO III - CARACTERÍSTICAS DA ANATOMIA FOLIAR VISANDO A DETECÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIIS DE BANANEIRA CV. ‘PRATA ANÃ’ (AAB) MICROPROPAGADAS	55
1 RESUMO	56
2 ABSTRACT	57
3 INTRODUÇÃO	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS	60
5 RESULTADOS.....	62
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÕES	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO IV - PERFIL DE COMPOSTOS EM VARIANTES SOMACLONAIIS E NÃO VARIANTES DE BANANEIRAS ‘PRATA ANÃ’ MICROPROPAGADAS	73
1 RESUMO	74
2 ABSTRACT	75

4 MATERIAIS E MÉTODOS	79
4.1 Material vegetal.....	79
4.2 Extração e purificação do material vegetal	80
4.3 Organização dos dados	83
4.4 Processamento dos dados	84
4.5 Análise estatística	84
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÕES	91
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	95

RESUMO

SILVA, Janaína de Oliveira Costa. **Detecção de variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ (AAB) micropropagada.** 2007. 97 p. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O cultivo *in vitro*, também conhecido como micropropagação, é uma técnica bastante utilizada na obtenção de mudas de valor comercial. Esta técnica é bastante útil já que através dela podem ser produzidas plantas livres de patógenos e que mantém as características genéticas das plantas matrizes. No entanto, a micropropagação pode levar a um tipo de mudança fenotípica nas plantas, conhecida como variação somaclonal. A variação somaclonal pode levar a produção de mudas de baixo valor comercial, e isso implica em limitações no uso dessa técnica. A bananeira ‘Prata Anã’ apresenta como variação somaclonal uma anomalia no crescimento conhecida como gigantismo e estas produzem cacho de baixo valor comercial. Porém, a constatação dessa variação somente é possível após plantio em campo. No intuito de minimizar este problema, o presente trabalho buscou desenvolver alternativas para diferenciar bananeiras ‘Prata Anã’ normais daquelas que apresentam variação somaclonal. Para isso, buscamos marcadores morfoanatômicos e químicos que permitissem diferenciar as variantes das normais. A aplicação de ácido giberélico (GA_3) nas partes aéreas das plantas em fase de aclimatação permitiu distinguir as mudas variantes das normais. Tal procedimento fez com que as variantes crescessem mais em relação as normais. Além disso, as variantes lançaram folhas com a bainha estiolada e com morfologia do limbo foliar lanceolado. Foi realizado o estudo da anatomia foliar de ‘Prata Anã’ variantes somaclonais e não variantes nas fases de cultivo *in vitro*, aclimatação e em campo. Foram feitas análises comparativas entre as bananeiras normais e variantes para verificar aspectos do desenvolvimento das estruturas anatômicas entre as fases de cultivo. Os resultados obtidos permitiram diferenciar as bananeiras variantes das normais em relação ao diâmetro da nervura central e da hipoderme inferior. Nas análises de espectrometria de massas foi possível distinguir as variantes das normais em fase de aclimatação e as plantas normais e variantes que receberam GA_3 também diferenciaram das demais.

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antônio Chalfun-Júnior, Amauri Alves de Avarenga (Co-Orientadores) – UFLA.

ABSTRACT

SILVA, Janaína de Oliveira Costa. **Detection of somaclonal variants of micropropagated banana plants 'Prata Ana' (AAB)** 2007, 97 p. (Master Program in Agronomia/ Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

The *in vitro* culture, also known as micropropagation, is a technique used in the attainment of plants with commercial value. This technique is useful in achievement for free pathogenic plants and to maintain the genetic characteristics of the mother plant. However, the micropropagation can lead to phenotypic changes in the plants, known as somaclonal variation. The somaclonal variation can reduce the production of commercial value plants, and this implies in limitations in the use of this technique. The 'Prata Anã' banana plant presents as somaclonal variation an anomaly growth known as gigantism. The banana plant that possesses this variation produce bunches with low commercial value. However, the variation in 'Prata Anã' is only verified after plantation. Aiming to reduce this problem the present work was carried out searching for an alternative way to differentiate normal 'Prata Anã' banana plant from somaclonal variant ones. Morphological, anatomical and chemical markers that allowed differentiating the variants of the normal ones were used as tools. By the application of gibberellic acid (GA₃) in the aerial parts of the plants in acclimatization phase it was possible distinguishing variant plants from the normal ones allowing the variant plants to grow bigger than the normal ones. Moreover, the variant plants launched leaves with the etiolated stem and foliar limb lanceolated. Data of foliar anatomy of variant and non-variant somaclonal plants of 'Prata Anã' were measured during *in vitro*, acclimatization and in the field stages. The analyses were carried out to search for morphological markers that allowed to differentiate them. Comparative analyses between the normal and variant banana plant were performed to verify developmental aspects of the anatomical structures during the culture phases. Based on the results it was possible to differentiate banana plants from somaclonal variant ones based in the main vein diameter and inferior hypoderm. Analyses of mass spectrometry was also carried to distinguish plant extract from normal and variant banana plant *in vitro*, in the field and in the acclimatization conditions with and without GA₃ application. The fingerprint of composite in the samples allowed distinguishing the somaclonal variant plants from the other ones in acclimatization phase without application of GA₃.

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Antônio Chalfun-Júnior, Amauri Alves de Avarenga (Co-advisers) – UFLA.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A bananeira pertence ao gênero *Musa* e atualmente é cultivada nas regiões localizadas nos trópicos e sub-trópicos e abrange mais de 80 países ao redor do mundo. O Brasil é o segundo produtor no mundo de bananas com uma produção média de 13,844 kg/ha por ano, totalizando uma produção média de 6,997 mil toneladas ao ano e é a fruta mais consumida no país, em especial pela população de baixa renda. (Ministério da Agricultura, 2006).

A banana ocupa a quarta colocação mundial em termos de importância alimentar, após o arroz, trigo e leite (Crouch et al., 1999), sendo é rica em carboidratos (24%), fibras (6-7%), assim como em elementos minerais como potássio, magnésio, cálcio, fósforo, sódio, ferro e vitaminas A, B e C (Sharrock & Lusty, 2001).

Ultimamente tem se observado uma crescente demanda por mudas de bananeira de alta qualidade para renovação dos bananais de diversas regiões do país. A produção comercial de mudas de bananeira *in vitro* é empregada em larga escala e com sucesso em diversos países com o intuito de produzirem mudas de qualidade superior e livre de pragas e doenças tais como o Mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*), Moko (*Pseudomonas solanacearum*), nematóides *Radopholus similis* e a Broca-do-Rizoma (*Cosmopolites sordidus*) (Souza, 1994) e pelos fungos Sigatoka Amarela (*Mycosphaerella musicola*) e Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) (Cordeiro et. al, 2005). No entanto, as altas porcentagens de variação somaclonal em mudas micropropagadas têm gerado perdas para os produtores.

A variação somaclonal em bananeiras corresponde, em geral, ao surgimento de plantas com anomalias relativas na estatura, cor, forma e

arquitetura das folhas e má formação dos cachos. Alguns estudos indicam que a presença de tais anormalidades se deve ao número excessivo de repicagens (Rodrigues, 1996; Santos & Rodrigues, 2004).

A variação somaclonal mais comum em 'Prata Anã' é o crescimento exagerado das partes aéreas na fase adulta das plantas. Os aspectos morfológicos para esta anomalia é o aparecimento de folhas lanceoladas e mais eretas, elevado porte e pseudocaule mais fino em relação às plantas que não apresentam tal variação (Guimarães, 2005). Porém, esta variação somente é detectada após o plantio das bananeiras em campo, já que as plantas normais e variantes *in vitro* e em aclimação apresentam aspectos morfológicos muito semelhantes.

As giberelinas são reguladores de crescimento que estão ligados a diversos processos fisiológicos nos vegetais, entre eles, os processos de expansão celular. Estudos fisiológicos realizados com plantas anãs e gigantes têm focado no papel das giberelinas. Atualmente, as pesquisas têm utilizado técnicas de quantificação de compostos, como a espectrometria de massas, para visualizar e identificar esse regulador de crescimento.

Estudos anatômicos, bioquímicos e a identificação de compostos podem contribuir para o entendimento do processo que leva a variação somaclonal, como também propor marcadores para esse processo, identificando essa anomalia precocemente minimizando problemas para os produtores.

Assim faz-se necessário a compreensão dos processos que levam a variação somaclonal em cultivares de Prata Anã, enfocando a resposta hormonal que estas plantas apresentam em relação a biossíntese de giberelinas, o que possivelmente leva ao gigantismo de tais variantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem, taxonomia e evolução de bananeiras cultivadas

O gênero *Musa* pode ser dividido em *Callimusa*, *Rhodochalamys* (que possui apenas interesse ornamental), *Australimusa*, *Ingentimusa* e *Eumusa*. Esta última destaca-se por conter a maioria dos cultivares de bananas comestíveis e comercialmente mais importantes (Souza, 2002).

A maioria dos cultivares de banana teve suas origens evolutivas no continente asiático a partir de cruzamentos intra e interespecíficos das espécies selvagens dipóides *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* pertencentes ao gênero *Eumusa* (Simmonds & Shepherd, 1955; Souza, 2002).

As bananeiras (*Musa spp.* L.) pertencem à classe Liliopsida, ordem Zingiberales, família Musaceae, e podem ser gigantes ou herbáceas perenes, que se desenvolvem em áreas tropicais e subtropicais úmidas.

Apesar do sudeste da Ásia ser considerado o centro da origem das espécies de *Musa* (Simmonds, 1995), existe grande diversidade na África sub-Saara. A introdução da bananicultura ocorreu nos demais continentes com a expansão do comércio, atingindo toda a costa asiática banhada pelo oceano Índico, e posteriormente difundindo-se pela costa africana, atingindo as Américas com as conquistas européias (De langhe, 1995).

2.2 Cultivares de banana

De acordo com Álvares & Caldas (2002), as duas principais cultivares plantadas que visam consumo no Brasil são ‘Nanicão’ (grupo AAA, subgrupo Cavendish) e ‘Prata Anã’ (grupo AAB). A produção de bananas visando o

mercado de exportação é concentrada em cultivares do subgrupo “Cavendish” (AAA). A produção para consumo doméstico em várias regiões do mundo está focalizada em cultivares de constituição AAA (Caru, São Tomé, Nanica, Nanicão), AAB (Prata, Maçã, Mysore, Terra, Prata Anã) e ABB (Figo) (Souza, 2002). É importante observar que as cultivares mais plantadas e apreciadas pelos consumidores tem ploidia igual a $3n$. Dos grupos diplóides ($2n$) tem-se a banana Ouro (AA) e tetraplóide ($4n$) a Ouro da Mata (Silva, 2001).

2.3 Propagação convencional

A banana é propagada vegetativamente por meio de mudas e brotos, embora as espécies selvagens sejam propagadas por sementes (Simmonds, 1973). A propagação convencional de bananeiras é realizada a partir de gemas presentes no caule subterrâneo, denominado rizoma. Estes rizomas podem ser propagados por uma técnica simples conhecida como fracionamento de rizomas. Este método permite uma elevada taxa de multiplicação das bananeiras e pode ser utilizada para qualquer cultivar. No entanto, as práticas convencionais podem levar a propagação de mudas de baixa qualidade fitossanitárias, já que pragas e doenças podem ser disseminadas pelo uso de mudas contaminadas (Embrapa, 2006). Desta maneira, a micropropagação surge como uma alternativa para a propagação de mudas livres de patógenos. Esta técnica de cultivo *in vitro* vem sendo muito utilizada na produção de mudas de bananeiras em escala comercial em diversas regiões do mundo.

2.4 Micropropagação

Torres et al. (2001) descrevem que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais (água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia,

vitaminas e reguladores de crescimento) e opcionais (aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas). A composição do meio de cultura tem importante papel nas respostas de crescimento de células e tecidos *in vitro* (Borgatto et al., 2002).

As plantas ou explantes cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais específicas. Assim, ao excisar parte da planta para cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meios nutritivos suplementados com as necessidades exógenas da célula, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (Torres et al., 2001).

Nesse contexto, o meio Murashige & Skoog (MS) proposto em 1962, é um dos mais utilizados na cultura de tecidos da maioria das espécies, sendo realizadas algumas alterações de acordo com o explante utilizado (Caldas et al., 1998).

Os meios de cultura podem ser ainda modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie na qual se está trabalhando, sendo importante deter o conhecimento da importância de cada elemento contido em um meio de cultivo (Torres et al., 2001).

2.4.1 Estabelecimento *in vitro*

Um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação bacteriana ou fúngica, principalmente presente na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais. É freqüente deparar-se com contaminação presente no interior dos tecidos e que é conhecida como contaminação endógena. Este tipo de contaminação é mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (Teixeira, 2004).

Os principais compostos utilizados para a desinfestação são o etanol e o cloro. O modo de ação do etanol consiste na rápida desnaturação protéica e na dissolução de lipídios, tendo como desvantagem o fato de ser pouco ativo contra esporos fúngicos. O cloro inativa enzimas, age como oxidante, tem efeito sobre bactérias e sua desvantagem é o odor irritante e também a baixa atividade contra esporos (Pasqual et al., 1997).

A desinfestação de segmentos de brotos, folhas e botões florais pode ser feita com álcool etílico comercial na concentração de 50% a 70% (v/v), por um período de 1 a 3 minutos, seguida de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio 0,5% a 2% (p/v), por 5 a 20 minutos e de 3 a 5 lavagens com água destilada autoclavada por um período mínimo de 5 minutos (Teixeira, 2004).

Os explantes apicais são os mais comumente utilizados para o cultivo em laboratório de bananeiras. Por apresentarem certa uniformidade genética, as mudas de banana micropropagadas possibilitam a aplicação de tratamentos culturais e colheitas mais homogêneas e são recomendadas para sistemas de produção tecnificados. Estas mudas são ainda mais produtivas e diminuem a disseminação de pragas e doenças (Embrapa, 2006).

2.4.2 Variação Somaclonal

A micropropagação é responsável pela produção de grande quantidade de mudas de bananeira de qualidade. No entanto, a falta de domínio completo dessa técnica de cultivo *in vitro* coloca no mercado mudas com a presença de variação somaclonal (Santos & Rodrigues, 2004).

A variação somaclonal corresponde a uma variação fenotípica que pode ter origem genética ou epigenética (Sahijram et al., 2003). De acordo com alguns estudos, o surgimento de variação somaclonal relaciona-se com o aparecimento de calos (Scowcroft, 1984; Santos & Rodrigues, 2004). O número

de subcultivos *in vitro* também pode ser um fator importante no controle da variação somaclonal. Para a cultivar ‘Willians’ (AAA), Reuveni (1986) afirma que o número máximo de plantas obtidas a partir de um único ápice caulinar deve ser de 1000 plantas. No cultivo *in vitro* da cultivar ‘Pacovan’ (AAB), a porcentagem de variação somaclonal aumenta com o número de subcultivos (Santos & Rodrigues, 2004). Estudos avaliando variantes somaclonais de diversas cultivares de bananeiras demonstraram que, dependendo da cultivar, as plantas poderiam apresentar morfologias diversas como porte baixo, porte gigante, folhas afiladas ou lanceoladas, colorações variegadas e ausência de cerosidade (Smith, 1988).

Na cultivar ‘Prata Anã’, o tipo de variação somaclonal mais comum é o surgimento de um fenótipo gigante. Esta variação somaclonal apresenta como parâmetros morfológicos de identificação folhas lanceoladas, porte elevado, folhas mais eretas e pseudocaule mais fino em relação às plantas normais como pode se visualizado na figura 1 (Guimarães, 2005). No entanto, esta anormalidade só pode ser detectada em campo após o plantio das bananeiras, já que as mudas normais e variantes somaclonais em fases de cultivo *in vitro* e de aclimatação apresentam morfologia bastante semelhante.



FIGURA 1 Bananeira ‘Prata Anã’ variante somaclonal apontada pela seta, em bananal no município de Andradas, MG (Fonte: Guimarães, 2005).

2.4.3 Giberelinas

O termo giberelina foi usado pela primeira vez em 1935 para descrever uma substância produzida pelo fungo *Gibberella fujikuroi* que causava um crescimento exagerado em arroz. Este fenômeno foi caracterizado como uma doença denominada *bacane* ou planta boba. Foi comprovado que a substância produzida por este fungo era uma mistura de giberelinas, das quais GA₁ e GA₃ eram as que possuíam atividade (Hedden & Proebsting, 1999).

Há muito tempo, as giberelinas têm sido consideradas como reguladores de crescimento e, quando em atividade em plantas, como fitohormônios, responsáveis por controlar vários aspectos do crescimento e do desenvolvimento vegetal como o alongamento de caule, crescimento de raízes e frutos, formato das folhas, estiolamento, assim como, no desenvolvimento da floração e das flores pela quebra de dormência de gemas (Swain & Singh, 2005). São também promotoras de crescimento, efeitos que podem ou não ser semelhantes aos da auxina. No entanto, essas substâncias produzem grande efeito em plantas intactas enquanto as auxinas produzem melhor efeito sobre plantas segmentadas (Hedden & Proebsting, 1999).

As giberelinas são diterpenóides tetracíclicos sintetizados em uma complexa rota metabólica que envolve plastídeos, retículo endoplasmático e o citosol. Até o momento já foram identificadas 126 giberelinas em plantas superiores e fungos, porém poucas têm atividade biológica comprovada (Swain & Singh, 2005).

As giberelinas ativas mais comumente utilizadas em estudos são GA₁, GA₃ e GA₄ (Figura 2), as quais promovem o crescimento vegetativo (Swain & Singh, 2005). No entanto, as giberelinas bioativas mais encontradas nas plantas, em geral, são as GA₁ e GA₄ cujos precursores diretos são GA₂₀ e GA₉, respectivamente (Alcázar et al., 2005).

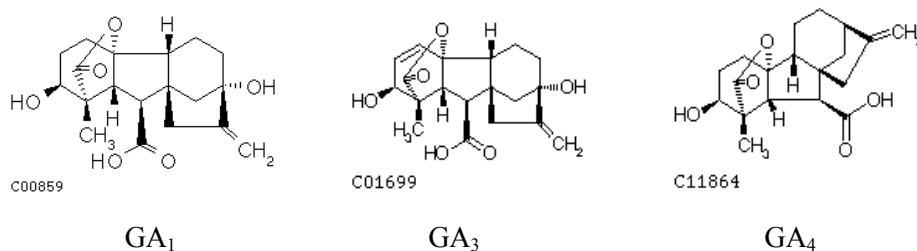


FIGURA 2 Estrutura molecular das giberelinas 1, 3, 4 (Fonte: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00904.html>).

Os estádios iniciais de síntese são semelhantes aos de outros terpenóides, como os carotenóides, os esteróis e o grupo fitol da clorofila, sendo constituídos por unidades de isopreno, contendo cinco átomos de carbono (Hedden & Proebsting, 1999).

Brian & Hemming (1955), verificaram em ervilhas anãs o alongamento caulinar semelhante ao das normais de ervilha e também o alongamento exagerado de plantas de ervilha com a aplicação exógena de ácido giberélico (GA₃) obtido de extratos de culturas de *Gibberella fujikuroi*. Com base nesses experimentos, eles propuseram que a giberelina é um fator de crescimento natural que é deficiente nas plantas anãs. Esta hipótese foi confirmada por Margaret Radley em 1956. Neste trabalho, foram utilizados extratos purificados de ervilhas gigantes para induzir o alongamento caulinar em ervilhas anãs. Isso levou a evidências de que as GAs ocorrem de forma natural em plantas de ervilha de porte elevado (Hedden & Proebsting, 1999).

Assim, é possível que bananeiras que apresentam como variação somaclonal o crescimento exagerado das partes aéreas apresentem distúrbios no metabolismo de biossíntese das giberelinas.

2.5 Anatomia vegetal comparada

Os conhecimentos de anatomia vegetal são importantes quando se trata da propagação vegetativa, pois a identificação dos aspectos estruturais é importante para o sucesso da propagação, a qual depende da regeneração de tecidos vegetais. A escolha da amostra utilizada para a realização da propagação depende do conhecimento das potencialidades dos tecidos vegetais. Além disso, as substâncias reguladoras de crescimento utilizadas nessas práticas interferem na formação das células e tecidos (Silva *et al.*, 2005).

Assim, o estudo e caracterização da anatomia comparada podem servir como ferramenta útil e prática para distinguir variantes somaclonais e não variantes de bananeira Prata Anã em estágio *in vitro* e *ex vitro*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÁZAR, R. et al. Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. **The Plant Journal**, v.43, p.425-436, 2005.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas:** culturas Brasil. Produtividade média de lavouras temporárias e permanentes: banana. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/CULTURAS/2.2.C.XLS>>. Acesso em: 16 set. 2006.

BRIAN, P.W.; HEMMING, H.G. The effect of gibberellic acid on shoot growth and development. **Plant Physiology**, v.8, p.669-681, 1955.

BORGATTO, F. et al. Calcium, potassium and magnesium treatment of *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” and callogenesis *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.4, p.669-693, Oct./Dec. 2002.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.87-132.

CROUCH, J.H. et al. VNTR-based diversity analysis of 2x and 4x full-sib *Musa* hybrids. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.2, n.3, p.99-108, 1999.

CORDEIRO, Z.J.M. et al. ‘Preciosa’: Variedade de Banana Resistente à Sigatoka-Negra, Sigatoka-Amarela e ao Mal-do-Panamá. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.3, p.316, 2005.

DE LANGHE, E. Banana and plantain: the earliest fruit cops? In: INTERNATIONAL NETWORK FOR THE IMPROVEMENT OF BANANA AND PLANTAIN – INIBAP, **Annual Report...** 1995. p.6-8.

Disponível em:

<<http://www.inibap.org/publications/annualreport/focus195.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Cultivo de banana para o ecossistema dos tabuleiros costeiros. **Mandioca e fruticultura, sistema de produção**, 4. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaTabCosteiros/sementes.htm>>. Acesso em: 15 dez 2006.

GUIMARÃES, N.C.C. **Identificação de variantes somaclonais em bananeiras Prata-anã, utilizando técnicas moleculares e citogenéticas**. 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HEDDEN, P.; PROEBSTING, W.M. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. **Plant Physiology**, v.119, p.365-370, 1999.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p..

REUVENI, O.; ISRAELI, Y.; DEGANI, H.; ESHDAT, Y. Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. In: **INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES MEETING**. 1986, Rome. Resumos... Rome. IBPGR, 1986, p.36.

RODRIGUES, P.H.V. **Efeito do número de subcultivos, na ocorrência de variação somaclonal, em mudas de bananeira micropropagadas, das cultivares Nanicão e Grande Naine**. 1996. 104p. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-CENA, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.R.; BOLLAMMA, K.T. Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant**, v.39, p.551–556, 2003.

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

SCOWCROFT, W. R. Genetic variability in tissue culture, impact on germplasm conservation and utilization. In: INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES MEETING, 1984, Rome. **Resumos...** Rome: IBPGR. 1984. p.41.

SHARROCK, S.; LUSTY, C. Nutritive value of banana. Disponível em: <http://www.inibap.org/publications/annualreport/focus299.pdf> Acesso em Dezembro, 2001.

SILVA, C.R.R. **Fruticultura tropical**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 178p.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica do Brasil**, v.19, n.1, p.183-194, 2005.

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

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

SIMMONDS, N.W. Bananas. In: SAMARTT, J. (Ed.) **Evolution of crop plant**. Exess: Longman, 1995. p.370-375.

SMITH, M.K. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. **Fruits**, v.43, p.210-223, 1988.

SOUZA, F.V.D. **Multiplicação *in vitro* da bananeira tripóide (AAA) “Cipira” e instabilidade mitótica das plantas produzidas**. 1994. 73p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA.

SOUZA, S.A.C.D. **Avaliação da variabilidade genética *em Musa spp.* utilizando marcadores microssatélites**. 2002. 86p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SWAIN, S.M. SINGH, D.P. Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. **Trends in Plant Science**, v.10, n.3, 2005.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: EMBRAPA, 2004. Disponível em: <<http://www.redbio.org/portal/encuentros>>. Acesso em: 12 set. 2005.

TORRES, A.C. et al. Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. **Circular Técnica nº24**. Embrapa, Brasília, p 1-20, 2001.

**CAPITULO II - DETECÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIAS DE
BANANEIRA 'PRATA ANÃ' MICROPROPAGADA
POR ASPERSÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO**

1 RESUMO

SILVA, Janaína de Oliveira Costa. Detecção de variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ micropropagadas por aspersão de ácido giberélico. **In: Detecção de variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ (AAB) micropropagada.** 2007, Cap. 2, p.18 – 55. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A micropropagação vem sendo aplicada com sucesso para a propagação em larga escala de mudas de bananeira. Este processo garante qualidade genética e fitossanitária para as mudas. No entanto, em decorrência do cultivo *in vitro*, pode surgir plantas mutantes que produzem cachos sem valor comercial, levando prejuízos aos produtores. Estas plantas são conhecidas como variantes somaclonais. Em ‘Prata Anã’ o tipo de variação somaclonal mais comum é o gigantismo e esta só é detectada após meses de plantio das mudas em campo. Alguns pesquisadores tentaram diversos métodos para detecção desta variação antes do repasse das mudas para os produtores. Até o momento, não foi obtido nenhum método eficiente para detecção precoce dessas plantas variantes. Mutantes para a produção de giberelina apresentaram fenótipo anão e esta mutação já foi revertida com a aplicação de ácido giberélico exógeno. Verificou-se nessa pesquisa que a aplicação de GA₃ exógena com espalhante adesivo, duas vezes semanais, em bananeiras ‘Prata Anã’ micropropagadas e aclimatadas por 30 dias, permitiu diferenciar mudas variantes somaclonais das não variantes considerando-se a altura de plantas. Nestas condições, as plantas normais variantes somaclonais apresentaram aumento no diâmetro da nervura central e da espessura do parênquima esponjoso em relação aos demais tratamentos.

Palavras-chave: ácido giberélico, variação somaclonal, micropropagação, bananeira ‘Prata Anã’.

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antônio Chalfun Júnior, Amauri Alves de Avarenga (Co-Orientadores) – UFLA.

2 ABSTRACT

SILVA, Janaína de Oliveira Costa. Somaclonal variants detection of micropropagated banana plants 'Prata Anã' by gibberellic acid application. **In: Detection of somaclonal variants micropropagated banana plants 'Prata Ana' (AAB) 2007**, Cap. 2, p.18 - 55. (Master Program in Agronomia/Plant Physiology) Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

The micropropagation has been applied at a large scale successfully for the propagation of banana plants. This process ensures genetic and phytosanitary quality plants. However, the somaclonal variation is one of the problems that causes difficulties to the *in vitro* culture process and it can increase losses to producers due to the low productivity of bananas bunches. Considering the cultivar 'Prata Anã', the most common somaclonal variation is the gigantism. This problem is only detected after months of plantation in the field. However, until now, there is no efficient method to detect before the problem is revealed. Some researchers tried several methods for the detection of this variation before selling the plants to the producers. Several gibberellins are growth regulators that induce stem growth in the plants. Mutants for gibberellin production present dwarfed and this mutation is reverted with the application of gibberellic acid. In this work, a usefull method of detention of somaclonal variants of micropropagated banana plant 'Prata Anã' was investigated, during the period of acclimatization with the application of gibberellic acid. Moreover, the anatomy of leaves of these plants that received application of gibberellic acid as well as the controls, were studied. As result when the gibberellic acid is applied, in the acclimatization phase, differentiates the normal plants from the somaclonal variant ones and these last ones presented differently diameter of the central cylinder from the normal ones.

Key-words: gibberellic acid, somaclonal variation, micropropagation, banana plant 'Prata Anã'.

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Antônio Chalfun Júnior, Amauri Alves de Avarenga (Co-advisers) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de bananas no mundo (FAO, 2006). Os principais cultivares produzidos no país são ‘Prata Anã’(AAB) e ‘Nanicão’(AAA), sendo que a maior parte destas plantas são originadas a partir de mudas obtidas por ápices caulinares micropropagados. A micropropagação é uma técnica de cultivo *in vitro* que permite gerar plantas com qualidade fitossanitária em um curto espaço de tempo (Álvares & Caldas, 2002). Uma das limitações da micropropagação é o surgimento de variação somaclonal. A variação somaclonal é definida por alguns autores como uma variação fenotípica que ocorre em plantas regeneradas por cultura de tecidos e que pode ter origem genética ou epigenética. Essas variações podem levar a diferentes fenótipos anômalos, sendo que, dependendo da cultivar, ela pode apresentar características do tipo anã ou gigante, assim como a presença de folhas variegadas ou com deformação no limbo foliar, presença de elevado conteúdo de antocianinas entre outras anomalias (Sahijram *et al.*,2003).

Um tipo de variação freqüente em ‘Prata Anã’ cultivadas *in vitro* é o crescimento exagerado da parte aérea após o plantio em campo. Esta característica, também conhecida como gigantismo, prejudica o desenvolvimento dos cachos e frutos. Esta variação somaclonal é detectada somente após o cultivo no campo através de aspectos da morfologia, tais como pseudocaule fino, folhas lanceoladas, porte elevado entre outras características que são atípicas para esta cultivar (Guimarães, 2005).

As causas para as diversas variações somaclonais em bananeiras ainda parecem bastante incertas. Porém, sugere-se que muitas dessas anomalias podem estar relacionadas a distúrbios no metabolismo das giberelinas. Sandoval *et al.*

(1995) mostrou que variantes somaclonais para o gigantismo e nanismo responderam a aplicações exógenas de ácido giberélico (GA₃).

Evidências da participação desses reguladores de crescimento tem sido obtidas com mutantes de *Arabidopsis*, arroz e ervilha, deficientes na produção de algumas giberelinas, apresentam diminuição no crescimento que levam a fenótipos anões. Isto indica que estes compostos estão diretamente envolvidas no crescimento e alongamento dos vegetais (Ikeda *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 1997; Hedden & Proebsting, 1999). Muitos destes estudos utilizam a aplicação de ácido giberélico (GA₃) para reverter um fenótipo anão gerado pela deleção dos genes relacionados à produção de giberelinas (Ikeda *et al.*, 2001; Alcázar *et al.*, 2005). A identificação e caracterização de mutantes com defeitos no alongamento caulinar revelaram que alguns deles têm apresentado níveis muito baixos de giberelinas bioativas. Este defeito pode ser detectado em algum dos passos na rota de biossíntese dessas moléculas (Hedden & Kamiya, 1997; Hedden & Proebsting, 1999; Alcázar *et al.*, 2005). Em trabalhos anteriores, foram feitas aplicações foliares de ácido giberélico em bananeiras da cultivar ‘Gand Naine’ (AAA) que apresentavam como variação somaclonal o gigantismo. Este tratamento permitiu diferenciar os variantes dos não variantes (Sandoval *et al.*, 1999). Desta maneira, acreditamos que as giberelinas podem estar relacionadas à variação somaclonal que leva ao gigantismo das bananeiras ‘Prata Anã’ cultivadas *in vitro*.

Análises de citometria de fluxo foram realizadas para distinguir bananeiras ‘Prata Anã’ variantes somaclonais das não variantes. Esta técnica não se mostrou satisfatória para tal propósito (Guimarães, 2005; Lacerda, 2006). Também foram utilizadas técnicas de microscopia eletrônica para o mesmo fim. Neste caso, foi observada diferença no padrão da cera cuticular de bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais (Lacerda, 2006). No entanto, esta

técnica exige elevado custo em equipamentos e mão-de-obra especializada o que inviabiliza o trabalho na prática diária.

A compreensão da anatomia de plântulas cultivadas *in vitro* pode fornecer informações para o controle da morfogênese, de alterações fisiológicas e pode auxiliar na melhoria das técnicas de micropropagação. Assim, análises anatômicas de ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais após o tratamento com GA₃ podem contribuir para a compreensão do papel desses reguladores sobre esta mudança fenotípica presente em bananeiras cultivadas *in vitro*.

Pelo exposto, essa pesquisa visa estudar alterações morfoanatômicas em plantas normais e variantes somaclonais de bananeiras ‘Prata Anã’ submetidas à aplicação exógena de ácido giberélico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para obtenção das mudas, explantes de bananeira ‘Prata Anã’ foram cultivados *in vitro* no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, sendo em seguida, após enraizamento *in vitro*, aclimatados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, da mesma universidade.

Os explantes foram extraídos de ápices caulinares de plantas matrizes de bananeiras ‘Prata Anã’ em fase de produção no campo, consideradas normais (N) de acordo com os padrões de desenvolvimento da cultivar, e de plantas com variação somaclonal (V) identificadas pela característica do gigantismo por Guimarães (2005).

Os explantes de ‘Prata Anã’ variantes somaclonais e não-variantes foram cultivados em meio de cultura descrito por Lacerda (2006) para multiplicação durante 30 dias e de enraizamento por mais 30 dias em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 16 horas de fotoperíodo. Em seguida, as plantas foram aclimatadas em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo, a $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância, por 60 dias, em tubetes com substrato PlantMax®.

4.2 Experimento 1 - Aplicação de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) em mudas de bananeiras ‘Prata Anã’ micropropagadas para verificar a presença de variantes somaclonais e possível ação fitotóxica de GA₃.

No intuito de verificar o efeito de diferentes doses de ácido giberélico exógeno aplicado em bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais, assim como o efeito fitotóxico deste regulador de crescimento nestas plantas foi realizado o procedimento a seguir.

Na condução deste experimento, foram utilizadas 100 mudas de bananeira ‘Prata Anã’ micropropagadas com aproximadamente 2 meses de aclimação sem o prévio conhecimento de quais mudas apresentavam ou não variação somaclonal. Estas plantas foram cultivadas de acordo com o material vegetal descrito acima.

Foram determinados 5 tratamentos para avaliar a dose resposta e a indução de fitotoxidez, sendo o primeiro tratamento o controle com água destilada e os demais tratamentos com as concentrações de 10mg/L, 20mg/L, 40mg/L e 80mg/L de GA₃ da Invitrogen®. Com o auxílio de um borrifador manual foi aplicado 250 mL das soluções correspondentes a cada tratamento nos tempos 0, 20, 40 dias.

O experimento foi conduzido em DBC (delineamentos blocos casualizados), em parcelas subdivididas no tempo, sendo que cada um dos tratamentos possuía 4 plantas por repetição e 5 repetições que correspondiam aos blocos totalizando 20 mudas por tratamento. As mudas foram mantidas em estufa, em 5 bandejas de 24 células contendo substrato PlantMax®. Os fatores foram avaliados pelo teste de médias Tukey, no programa SISVAR (Ferreira, 2000), a 5% de probabilidade.

O parâmetro utilizado para medição da altura da folha foi tomado como a medida da base da planta até o ápice da bainha da folha de número 1 (Rocha, 2005). Foram analisados nos tempos 0, 20 e 40 dias a altura de cada planta.

4.3 Experimento 2 - Aplicação foliar de ácido giberélico (GA₃), juntamente com espalhante adesivo, para verificar a frequência de aplicação adequada para a detecção precoce de variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ micropropagadas

Para condução deste experimento, explantes de bananeira ‘Prata Anã’ variantes e não variantes somaclonais, cultivados *in vitro*, foram aclimatados por um período de 60 dias em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo, a $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância, em tubetes com substrato PlantMax® e irrigadas diariamente com água destilada somente no substrato.

Foram utilizadas 9 mudas normais (N) e 18 mudas variantes, sendo que das variantes, 9 pertenciam a um clone denominado variante 1 (V1) e 9 a outro clone, variante 2 (V2). As mudas aclimatadas foram colocadas em bandejas de 128 células.

Em um pré-experimento foi estabelecida a solução de ácido giberélico com espalhante adesivo, na concentração de 10g.L^{-1} de GA₃, para pulverização nas mudas. Com o auxílio de um borrifador manual, foi aplicada nas folhas e bainhas das mudas 100 mL da solução de GA₃ com espalhante adesivo (10g.L^{-1} de GA₃) com a frequência de 1 e 2 vezes por semana por um período de 30 dias. No grupo controle foi aplicado 100 mL de água destilada em todos os momentos de aplicação do produto nas mudas. Cada tratamento possuía 3 mudas normais, 3 variantes 1 e 3 variantes 2. Foram realizadas medidas das alturas das plantas nos tempos 0, 15 e 30 dias. O parâmetro utilizado para medição da altura foi do

comprimento da base da planta até o ápice da bainha da folha de número 1 (Rocha, 2005).

O delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com parcelas subdivididas, no tempo, foi utilizado com os fatores: Freqüência de aplicação (FREQ), plantas normais e variantes sendo os tratamentos (TRAT) e período experimental em dias (DIAS). Os fatores foram avaliados pelo teste de médias Tukey, no programa SISVAR (Ferreira, 2000), a 5% de probabilidade.

4.4 Experimento 3 - Aplicação de ácido giberélico (GA₃), com espalhante adesivo, visando detectar precocemente os variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ utilizando delineamento em DIC

No experimento 2 foi determinado que a freqüência de aplicação de ácido giberélico com espalhante deveria ser de 2 vezes por semana. Assim, para comprovar a eficiência do método foi realizado o experimento a seguir.

Para tanto, mudas de bananeira ‘Prata Anã’ variantes somaclonais (V) e normais (N), cultivadas *in vitro*, foram aclimatadas por um período de 60 dias em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo, a $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância, em tubetes com substrato PlantMax® e irrigadas diariamente com água destilada somente no substrato.

Para condução do experimento, foram utilizadas 26 mudas normais (N) e 26 mudas variantes (V). Em uma bandeja de 128 células, 13 mudas V e 13 mudas não variantes foram colocadas para o tratamento com GA₃. Em outra bandeja, 13 mudas V e 13 N foram colocadas como grupo controle. Com o auxílio de um borrifador manual, foi aplicada nas folhas e bainhas das mudas tratadas 200 mL da solução de GA₃ com espalhante adesivo (10g.L^{-1} de GA₃) com a freqüência de 2 vezes por semana por um período de 30 dias. No grupo

controle foi aplicado 200 mL de água destilada 2 vezes por semana em um período de 30 dias. Nos tempos 0, 15 e 30 dias foram medidas as alturas das plantas (cm) tomando como parâmetro de medida a distância da base da planta até o ápice da bainha da folha de número 1.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em parcela subdividida, onde as parcelas foram os tratamentos e as subparcelas os tempos. Os fatores foram avaliados pelo teste de médias Tukey, no programa SISVAR (Ferreira, 2000), a 5% de probabilidade.

4.5 Experimento 4 - Aplicação de ácido giberélico (GA₃), com espalhante adesivo, visando detectar precocemente os variantes somaclonais de bananeira 'Prata Anã' utilizando delineamento em DBC

Nos experimentos 2 e 3 foram determinadas a frequência de aplicação de ácido giberélico com espalhante e a repetibilidade dos resultados. Para reafirmar a veracidade dos resultados e verificar a ação de blocos experimentais foi realizado o experimento 4.

Este experimento foi realizado com base nos resultados obtidos nos experimentos 2 e 3, para verificar a ação de blocos experimentais e para confirmação dos resultados anteriores.

Neste experimento, foram utilizadas 42 mudas normais (N) e 42 mudas variantes somaclonais (V). Sete blocos experimentais foram montados, sendo que cada bloco possuía 4 tratamentos: 1) plantas normais tratadas com GA₃ (Nt), 2) plantas normais controle (Nc), 3) plantas variantes tratadas com GA₃ (Vt) e 4) planta variantes controle (Vc). Cada um dos tratamentos possuía 3 plantas totalizando 12 plantas por bloco. Cada parcela dos blocos foi devidamente separada com plástico para evitar deriva.

As mudas foram colocadas em bandejas de 24 células em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo, a $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância, em tubetes com substrato PlantMax® e irrigadas diariamente com água destilada somente no substrato para condução deste experimento.

Com o auxílio de um borrifador manual, foi aplicada nas folhas e bainhas das mudas dos tratamentos 1 e 3 uma solução de GA_3 (10g.L^{-1}), com espalhante adesivo, 2 vezes por semana durante de 30 dias. Nos grupos controles (tratamentos 2 e 4), foi aplicado água destilada também duas vezes por semana por 30 dias. Nos tempos 0, 15 e 30 dias as alturas (cm) das plantas foram medidas, tomando como parâmetro de medida a distância da base da planta até o ápice da bainha da folha de número 1.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC), com parcela subdividida no tempo. Os fatores foram avaliados pelo teste de médias Tukey, no programa SISVAR (Ferreira, 2000), a 5% de probabilidade.

4.6 Experimento 5 - Anatomia foliar de bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais após aplicação de ácido giberélico (GA_3) com espalhante adesivo

Neste experimento, foram coletadas as folhas de número 1 (Rocha, 2005) de bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais com aproximadamente três meses de aclimação após o tratamento com ácido giberélico (GA_3) e controle (aplicação de água destilada) duas vezes por semana por um período de 30 (experimento 3). O intuito deste experimento foi o de verificar as alterações estruturais provocadas pela ação do ácido giberélico exógeno (GA_3) nas folhas.

Após a coleta, as folhas foram fixadas em F.A.A. (formaldeído: ácido acético: álcool etílico 70%), (Johansen, 1940), por 72 horas e posteriormente conservadas em álcool 70°GL. Os cortes transversais foram realizados na região mediana da folha, por meio de secções obtidas com o auxílio do micrótomo manual. Em seguida, as secções foram clarificadas em solução a 50% de hipoclorito de sódio, foram lavadas em água destilada e submetidas ao processo de coloração com safrablau, seguindo-se os métodos descritos por Kraus & Arduin (1997). Para montagem de lâminas semi-permanentes, utilizou-se glicerina 50%. Na avaliação do número de estômatos por mm² realizaram-se secções paradérmicas na epiderme da face abaxial. Para cada tratamento, foram utilizadas 5 folhas oriundas de cinco indivíduos e quatro campos do terço médio foliar, por folha coletada. Secções transversais foram realizadas para mensuração dos tecidos clorofilianos, das epidermes e da nervura central das folhas.

Nas secções paradérmicas foram analisadas as seguintes variáveis de cada tratamento: densidade estomática, diâmetros estomáticos polar e equatorial. Nas secções transversais dos tratamentos foram analisados: espessura das epidermes das faces abaxial e adaxial, parênquimas paliçádico e esponjoso, hipodermes superior e inferior e diâmetro da nervura central.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com dois tratamentos para cada uma das três fases de cultivo com cinco plantas para cada tratamento. O esquema experimental foi o fatorial de 2 x 2. Os fatores foram avaliados pelo teste de médias Tukey, no programa SISVAR (Ferreira, 2000), a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

No experimento 1, em que foram aplicadas doses de ácido giberélico para verificar a ação dessas doses e a possível ocorrência de fitotoxidez em função da presença do regulador foi observado que a aplicação de diferentes concentrações de GA₃ em mudas de ‘Prata Anã’ micropropagadas não apresentaram diferença significativa de crescimento entre os tratamentos, ao nível de 5% pelo teste de F, após os 40 dias de avaliação da altura das mudas. No entanto, as alturas das plantas modificaram-se de acordo com o passar dos dias, mostrando o crescimento padrão das mudas como esperado. Tal comportamento de crescimento é linear, com um ajuste de 99,97%, como observado no gráfico da análise de regressão (Figura 1).

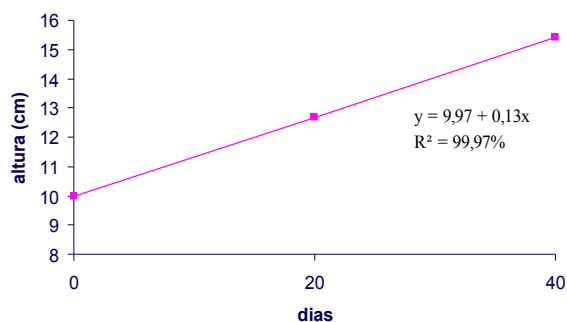


FIGURA 1 Equação de regressão para o crescimento das plantas durante o período experimental, sendo que, (y) representa a altura de plantas, (x) representa os dias e (R^2) representa o ajuste experimental.

De acordo com os resultados obtidos não foi possível distinguir os variantes dos não variantes somaclonais com a aplicação das soluções a base de

ácido giberélico (GA_3) e água destilada. As diferentes doses utilizadas não apresentaram efeito de fitotoxicidade nas plantas tratadas.

5.2 Experimento 2

Nos resultados da aplicação de ácido giberélico com espalhante adesivo para verificar a frequência de aplicação mais adequada para verificar os variantes somaclonais de 'Prata Anã' verificou-se que não houve diferença significativa, pelo teste F, ao nível de 5%, entre a interação de todos os fatores e, entre a interação dos fatores frequência de aplicação (FREQ) e plantas normais e variantes (TRAT) (Anexo, Tabela 1B). As demais análises apresentaram significância, o que mostra que a frequência de aplicação do GA_3 influenciou nas avaliações ao longo dos dias e os tratamentos também foram significativos ao longo dos dias avaliados. O maior coeficiente de variação foi observado na parcela (29,27%), seguido do coeficiente de variação das subparcelas (20,69% e 17,94%). Embora um pouco elevado na parcela, este coeficiente é ainda aceitável para indicar a razoável precisão do experimento. Nas subparcelas, a precisão pode ser considerada boa.

A tabela a seguir mostra a média geral de crescimento de todas as plantas ao longo do período experimental com aplicação de GA_3 mostrando que com a aplicação de GA_3 uma vez por semana as plantas cresceram em média 15,08 cm ao longo do período experimental. Já com a aplicação de GA_3 duas vezes por semana as plantas cresceram em média 15,68 cm. O grupo controle apresentou um crescimento médio de 10,51 cm (Tabela 1). Assim, o grupo controle difere dos demais tratamentos, apresentando a menor média observada.

TABELA 1 Quadro das médias de crescimento em altura (cm) ao longo do período experimental para cada frequência de aplicação de GA₃ e para o controle

Frequência de Aplicação	Médias *
Controle	10.51 a
1X semana	15.09 b
2X semana	15.69 b

*As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

A tabela 2 apresenta a média geral de crescimento das plantas ao longo do período experimental. Estes resultados demonstram que as plantas normais (N) apresentaram a menor média de crescimento ao longo dos dias experimentais nos tratamentos com e sem GA₃. Diferentemente, os variantes (V1 e V2) apresentaram maior média de crescimento ao longo do experimento.

TABELA 2 Quadro das médias de crescimento em altura (cm) ao longo do período experimental. Bananeiras normais (N), bananeiras variantes 1 (V1), bananeiras variantes 2 (V2)

Tratamentos	Médias *
N	10.33 a
V1	14.87 b
V2	16.09 b

*As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

A figura 2 apresenta o resultado da análise de regressão do experimento 2, o qual a altura das plantas tem um comportamento linear, explicado em 99,50% de confiança, mostrando que a análise de regressão demonstrou que o experimento apresenta um ajuste adequado com a realidade e uma boa confiança.

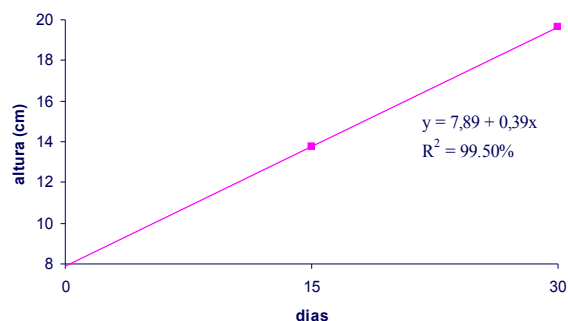


FIGURA 2 Equação de regressão para altura de plantas em todos os tratamentos ao longo do período experimental, sendo que, (y) representa altura de plantas e (x) representa os dias das medições dos tratamentos.

Os resultados a seguir mostram o desdobramento dos dias experimentais dentro de cada nível de frequência aplicada de GA₃ nas plantas tratadas. Na tabela 3 abaixo é mostrado que a frequência de aplicação de GA₃ modifica a altura da planta, de acordo com os dias. De acordo com os resultados, ao aplicar uma vez por semana GA₃ (1x) nas folhas e bainha, todas as alturas são alteradas, a cada quinze dias. O mesmo ocorre ao aplicar GA₃ duas vezes por semana (2x) nas folhas e bainha. No entanto, o grupo controle apresenta crescimento pequeno das plantas, com leves alterações, a cada 15 dias, sendo praticamente todas as alturas iguais ao longo do período experimental.

TABELA 3 Médias das alturas (cm) para cada frequência de aplicação de GA₃, em 'Prata Anã' normais e variantes somaclonais, sendo: (1x) uma vez por semana; (2x) duas vezes por semana.

Dias	Média das Frequências*		
	Controle	1x	2x
0	8.40 a	6.57 a	7.99 a
15	10.80a b	15.11 b	16.81 b
30	12.33 b	23.58 c	22.27 c

*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

Na tabela 4 abaixo pode-se observar que, na primeira medição, tanto as plantas normais (N) como as variantes (V1 e V2) apresentaram média de altura estatisticamente igual. Com 15 dias de experimento, as normais (N) apresentaram menor média de altura e conseqüentemente menor média de crescimento, diferentemente dos demais que cresceram de maneira considerável. No entanto, o crescimento pode ser considerado igual para os tratamentos V1 e V2. Com 30 dias de experimento, as normais (N) apresentaram menor média de crescimento em altura (cm) diferente das demais que cresceram consideravelmente.

TABELA 4 Desdobramento das médias das alturas (cm) de bananeiras ‘Prata Anã’ normais (N) e variantes somaclonais (V1 e V2) para cada dia de medição das alturas das plantas.

Tratamento	Dias		
	0	15	30
N	7.21 a	11.34 a	12.37 a
V1	7.28 a	15.38 b	22.02 b
V2	8.47 a	16.01 b	23.79 b

*As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

Os resultados apresentados no gráfico a seguir (Figura 3) estão de acordo com os resultados das tabelas 1, 2 e 3. Assim, ao longo do período experimental a aplicação de ácido giberélico (GA₃) promoveu um crescimento diferencial das plantas possibilitando distinguir ainda em fase de aclimação as mudas normais das mudas variantes somaclonais. Basicamente, as plantas variantes apresentaram estiolamento da bainha da folha de número 1 assim com estrutura lanceolada do limbo foliar. As plantas normais apresentaram comportamento indiferente a aplicação de GA₃ (Figura 4).

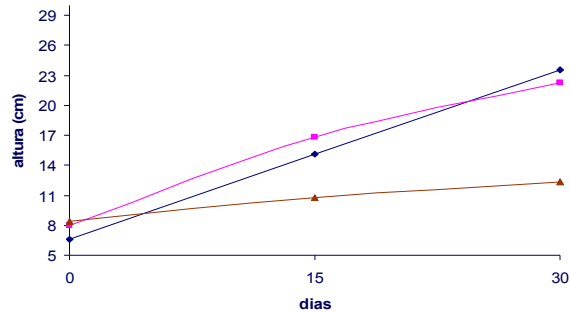


FIGURA 3 Representação gráfica das alturas médias (cm) de cada tratamento ao longo do período experimental, sendo (-◆-) aplicação de GA₃ uma vez por semana, (-■-) aplicação de GA₃ duas vezes por semana, e (-▲-) o controle.

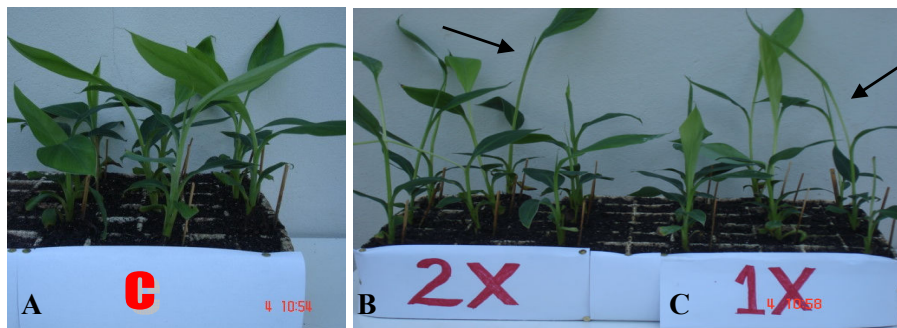


FIGURA 4 Bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais sem pulverização de GA₃ (A), com pulverização de GA₃ com espalhante duas vezes por semana (B) e com pulverização de GA₃ com espalhante uma vez por semana (C). As setas indicam plantas variantes que receberam aplicação de GA₃ com espalhante adesivo.

5.3 Experimento 3

De acordo com os resultados da aplicação de ácido giberélico (GA₃), com espalhante adesivo, para detectar os variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ utilizando delineamento inteiramente casualizado (DIC), como apresentado na tabela 5, as médias de crescimento das plantas ao longo de todo o período experimental são diferentes entre si (teste Tukey, ao nível de 5%). As

plantas normais controle (Nc) apresentaram em média menor crescimento seguido das plantas variantes controle (Vc). As plantas normais tratadas com GA₃ (Nt) apresentaram em média crescimento um maior que as anteriores, porém suas médias de crescimento foram inferiores às médias das variantes tratadas com GA₃ (Vt), cujo tratamento apresentou em média a maior taxa de crescimento. Estes resultados também estão demonstrados na figura 6.

TABELA 5 Médias de crescimento (cm) das plantas ao longo do período experimental. Nc (planta normal controle), Vc (Planta variante controle), Nt (planta normal tratada com GA₃), Vt (planta variante tratada (GA₃)).

Tratamentos	Médias *
Nc	9.57 a
Nt	13.02 c
Vc	11.49 b
Vt	19.22 d

*As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

De acordo com a análise de contraste (Anexo, Tabela 1E), a planta normal tratada com GA₃ (Nt) apresentou média de crescimento superior a planta normal controle (Nc). No segundo contraste, a planta variante tratada com GA₃ (Vt) apresentou média de crescimento superior a planta variante controle (Nc). Para o terceiro contraste, a variante tratada com GA₃ (Vt) superou a média de crescimento do tratamento Nt. No quarto contraste, a variante controle (Vc) apresentou maior média de crescimento em altura (cm) que a normal controle (Nc). Já o quinto resultado mostrou que ao contrastar a variante tratada com GA₃ (Vt) com os demais tratamentos, Vt apresentou média de crescimento superior a todos os demais. O resultado desta análise foi importante já que é a partir desta análise pode-se verificar a viabilidade da aplicação de ácido giberélico exógeno para distinguir bananeiras ‘Prata Anã’ variantes somaclonais das normais ainda em fase de aclimação das mudas.

A altura das plantas pode ser explicada pelo comportamento linear representado pela análise de regressão, como mostrado na figura 5.

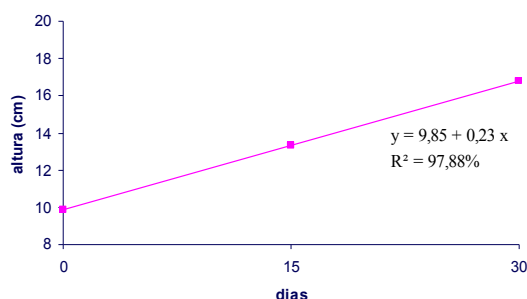


FIGURA 5 Equação de regressão para o crescimento das plantas em todos os tratamentos ao longo do período experimental, sendo que, (y) representa a altura das plantas, (x) representa os dias das medições dos tratamentos e (R^2) representa o ajuste experimental.

O resultado da tabela 6 apresenta a análise de desdobramento de dias dentro de cada tratamento. Este resultado mostra o crescimento de cada tratamento ao longo dos dias experimentais, mostrando que as plantas variantes tratadas com GA_3 , apresentaram uma média de crescimento superior aos demais tratamentos. Este resultado mais uma vez comprova a ação do ácido giberélico na identificação das bananeiras ‘Prata Anã’ variantes somaclonais.

TABELA 6 Análise das médias de crescimento ao longo dos dias experimentais nas bananeiras ‘Prata Anã’ normais controle (Nc), normais tratadas com GA_3 (Nt), variantes somaclonais controle (Vc) e tratadas GA_3 (Vt).

Dias	Tratamento*			
	Nc	Nt	Vc	Vt
0	8.98 a	8.36 a	10.61 a	10.26 a
15	9.58 a	14.57 b	11.38 a b	20.13 b
30	10.15 a	16.12 c	12.48 b	27.28 c

*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

Os resultados mostram que a média de crescimento das plantas variantes após a aplicação de GA₃ por um período de 30 dias é superior aos demais tratamentos. No entanto, este resultado já pode ser estabelecido com 15 dias de tratamento. Esta resposta pode ser visualizada no gráfico a seguir (Figura 6) e nas figuras do experimento (Figura 7 e 8).

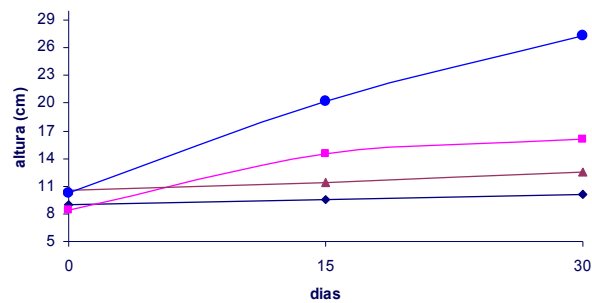


FIGURA 6 Representação gráfica das alturas médias (cm) de cada tratamento ao longo do período experimental, sendo: (-◆-) plantas normais controle, (-■-), normais tratadas com GA₃, (-▲-), variantes controle e (-●-), variantes tratadas com GA₃ (Vt).

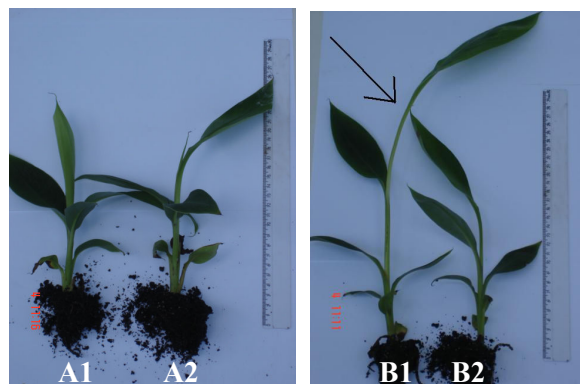


FIGURA 7 Bananeiras 'Prata Anã' normais sem pulverização de GA₃ (A1) e com pulverização de GA₃ (A2) e variantes somaclonais com pulverização de GA₃ (B1) e sem pulverização de GA₃ (B2). A seta indica a bainha estiolada da planta variante que recebeu aplicação de GA₃.



FIGURA 8 Bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais com pulverização de GA₃ (A) e sem pulverização de GA₃ (B).

5.4 Experimento 4

O experimento da aplicação de ácido giberélico (GA₃), com espalhante adesivo, para detectar os variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’, analisado em DBC, com parcelas subdivididas, apresentou boa precisão tanto na parcela quanto na sub-parcela. Todos os fatores foram significativos, estatisticamente, a 5% pelo teste F, assim como a interação entre eles (Anexo, Tabela 1E).

Os valores médios da altura das bananeiras ‘Prata Anã’ variantes e não variantes somaclonais (normais) tratadas e não tratadas com ácido giberélico (GA₃) ao longo de 30 dias de experimento com frequência de aplicação de duas vezes por semana (Tabela 7).

TABELA 7 Médias das alturas (cm) das plantas ao longo do período de aplicação de GA₃, sendo: (Nc) planta normal controle, (Nt) normal com GA₃, (Vc) variante controle, (Vt) variante com GA₃.

Tratamentos	Médias *
Nc	19.25 a
Nt	20.02 a
Vc	22.61 a
Vt	31.65 b

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7, as plantas variantes tratadas com GA₃ apresentaram uma média de crescimento superior aos demais tratamentos.

De acordo com os resultados das análises de regressão apresentados no gráfico a seguir (figura 9), o crescimento das plantas, de acordo com os dias, pode ser explicado linearmente, em 99,99% dos casos.

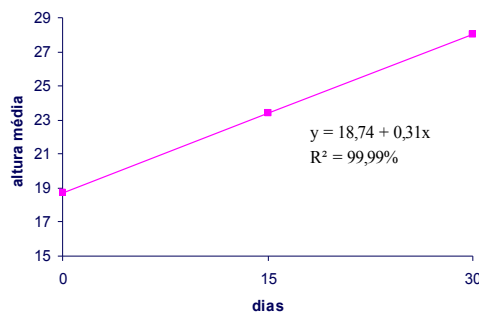


FIGURA 9 Equação de regressão para crescimento das plantas durante o período experimental, sendo que, (y) representa a altura de plantas, (x) representa os dias das medições dos tratamentos e (R²) representa o ajuste experimental.

A média de crescimento das bananeiras normais e variantes somaclonais tratadas e não tratadas com GA₃ é apresentada na tabela 8. Nas plantas normais controle não houve diferença de média de crescimento entre os dias experimentais. O contrário ocorre com os demais tratamentos que possuíram diferenças significativas entre os dias. No entanto, de acordo com os resultados apresentados pode-se verificar que as plantas variantes tratadas com GA₃ apresentaram média de crescimento superior aos demais tratamentos (Figura 10).

TABELA 8 Análise das médias de crescimento ao longo dos dias experimentais nas bananeiras ‘Prata Anã’ normais controle (Nc), normais tratadas com GA₃ (Nt), variantes somaclonais controle (Vc) e tratadas GA₃ (Vt).

Dias	Tratamento			
	Nc*	Nt*	Vc*	Vt*
0	18.86 a	16.73 a	19.59 a	19.89 a
15	19.30 a	19.30 b	22.34 b	32.41 b
30	19.60 a	24.04 c	25.91 c	42.66 c

*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

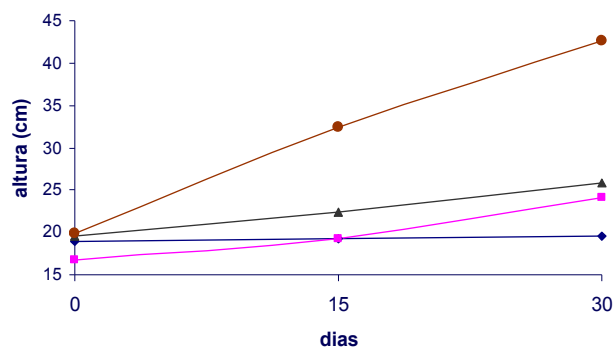


FIGURA 10 Representação gráfica das alturas médias (cm) de cada tratamento ao longo do período experimental, sendo: (-♦-) plantas normais controle, (-■-), normais tratadas com GA₃, (-▲-), variantes controle e (-●-), variantes tratadas com GA₃ (Vt).

5.5 Experimento 5

Os resultados a seguir apresentam os dados da anatomia foliar de bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais após aplicação de ácido giberélico (GA₃) com espalhante adesivo. A análise das médias da densidade estomática, diâmetros equatorial e polar das folhas de bananeira ‘Prata Anã’ variantes e não variantes somaclonais com e sem aplicação de ácido giberélico

está presente na tabela 9. De acordo com os resultados apresentados nesta tabela, o tratamento com GA₃ apresentou diferença significativa, a 5%, pelo teste de Tukey que analisou a média de número de estômatos e dos diâmetros polar e equatorial das folhas das plantas normais e variantes tratadas e não tratadas com GA₃.

TABELA 9 Análise das médias (μm) do diâmetro equatorial e polar e densidade estomática das folhas de bananeira 'Prata Anã' normais controle (Nc), normais tratadas com GA₃ (Nt), variantes somaclonais controle (Vc) e tratadas GA₃ (Vt).

Planta	Estruturas		
	Diâmetro Equatorial*	Diâmetro Polar*	Densidade Estomática*
Nc	15.66 b	32.13 b	122.84 a b
Vc	14.69 a	29.88 a	130.24 b
Nt	15.71 b	31.24 a b	125.80 a b
Vt	15.59 a b	32.40 b	102.86 a

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

Pela análise dos parâmetros anatômicos das secções transversais (tabela 10) pode-se verificar que tanto a epiderme abaxial como o parênquima paliçádico não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A hipoderme superior das plantas variantes não apresentaram diferença significativa tanto nas tratadas com GA₃ como no controle. Porém, as plantas normais controle apresentaram hipoderme superior maior que as normais tratadas e que as demais plantas. O contrário ocorre com a hipoderme inferior, na qual, as plantas normais controle apresentam menor tamanho deste tecido em relação aos demais tratamentos (Tabela 10). No caso do parênquima esponjoso, as plantas normais tratadas com ácido giberélico apresentaram menor tamanho deste tecido em relação aos demais tratamentos, enquanto as variantes tratadas apresentaram maior tamanho de parênquima esponjoso em relação às demais. A média do tamanho da nervura central permitiu distinguir as plantas variantes

somaclonais tratadas GA₃ e espalhante adesivo dos demais tratamentos. Neste caso, as variantes tratadas com ácido giberélico apresentaram maior diâmetro da nervura central em relação às normais tratadas e não tratadas com GA₃ e em relação as variantes tratadas com água. Este fato também pode ser observado na figura 11. Isto condiz com os resultados observados nos experimentos anteriores cujo tratamento com GA₃ permitiu diferenciar plantas variantes de não variantes somaclonais. Além disso, é importante observar que as plantas variantes que receberam aplicação de GA₃ com espalhante apresentaram cavidades de ar maiores em relação aos demais tratamentos (Figura 11).

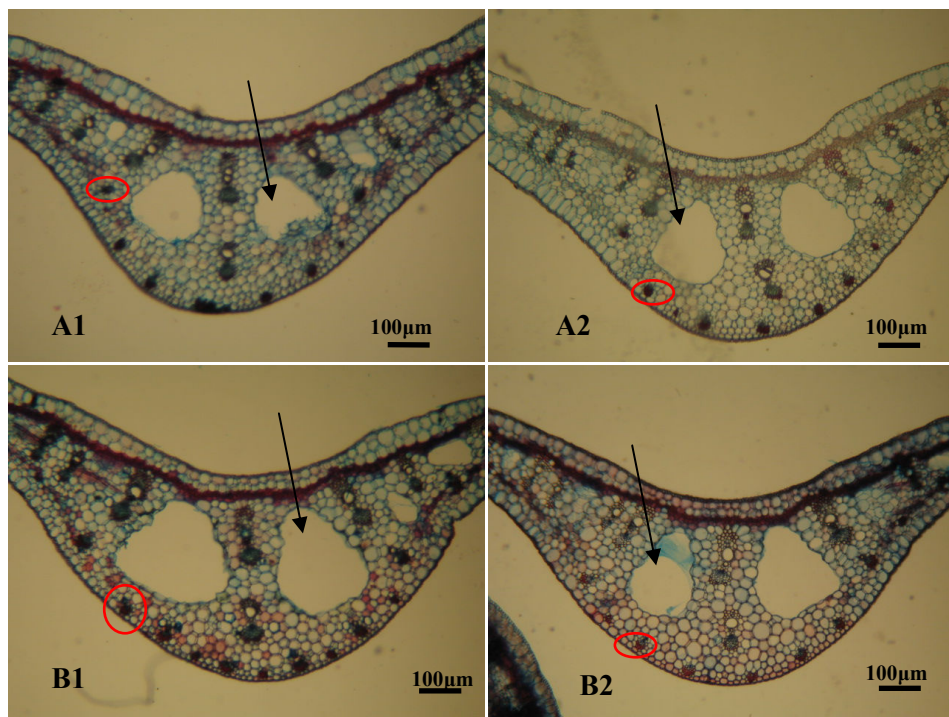


FIGURA 11 Seção transversal de folhas de bananeiras ‘Prata Anã’ normais com pulverização de GA₃ (A1), normais sem pulverização de GA₃ (A2), variantes com pulverização de GA₃ (B1) e variantes sem pulverização de GA₃ (B2). Os círculos representam os feixes vasculares de cada secção. As setas indicam as cavidades de ar.

TABELA 10 Análise das médias (μm) da Epiderme Abaxial (EAb), parênquima paliçadico (PPç), parênquima esponjoso (PEp), hipoderme superior (Hipo Sup), hipoderme inferior (Hipo Inf), epiderme adaxial (EAd) e diâmetro da nervura central (NC) das folhas de bananeira 'Prata Anã' normais controle (Nc), normais tratadas com GA₃ (Nt), variantes somaclonais controle (Vc) e tratadas GA₃ (Vt).

Estruturas							
Planta	E Ab*	P Pç*	Hipo Sup.*	P Ep*	Hipo Inf*	E Ad*	NC*
Nc	9.93 a	49.65 a	68.22 b	105.27 bc	42.99a	2.52a	786.53a
Vc	10.77a	45.78 a	54.09a	96.24a b	68.70 c	12.90 c	846.00a
Nt	10.47a	49.86 a	59.43a b	83.22a	60.48 bc	12.30bc	780.00a
Vt	9.84 a	44.88 a	57.48a	122.70 c	55.44 b	11.73b	939.90 b

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

6 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados do experimento 1, possivelmente não existia variantes em meio a população de plantas analisadas. No entanto, acreditamos que a solução não apresentou os fatores necessários para sua ação já que de acordo com Alcázar et al. (2005) a presença de Tween 20, que é um detergente biológico, seria necessária para aplicação de GA₃ e visualização dos efeitos deste regulador de crescimento. O Tween 20 é um detergente biológico que pode auxiliar na penetração do ácido giberélico (GA₃) por quebrar a barreira de cera presente na estrutura foliar. Assim, provavelmente, estas plantas não apresentaram diferenciação de crescimento devido à espessa camada de cera presente nas mudas de 'Prata Anã' (Lacerda, 2006) assim como pela ausência do espalhante na solução utilizada na condução do experimento.

Os resultados da aplicação de GA₃ com espalhante adesivo obtidos nos experimentos 2, 3 e 4 demonstraram ser possível distinguir os variantes somaclonais de bananeira 'Prata Anã', na fase de aclimatação das mudas, com aplicações semanais deste regulador de crescimento com uma frequência de duas vezes por semana em um período de 30 dias. O fenótipo observado nos variantes sob ação de GA₃ com espalhante adesivo é de estiolamento da bainha da folha de número 1 e morfologia lanceolada da folha. Esta característica não é observada nas plantas normais mesmo sob ação de GA₃ com o espalhante, o que comprova mais uma vez a eficiência deste método. Desta maneira, a aplicação de ácido giberélico por um período de 15 a 30 dias em bananeiras 'Prata Anã'

micropropagadas em período de aclimação é uma técnica eficiente para distinguir os variantes somaclonais para gigantismo das plantas normais.

Na figura 12 está representado o resultado final do experimento 4. A seta destaca o estiolamento da bainha das folhas das bananeiras 'Prata Anã' variantes. Já as bananeiras normais cresceram muito pouco em relação as variantes. Isso comprova que as variantes respondem de maneira diferenciada a aplicação de giberelina em relação as normais.



FIGURA 12 Bananeiras 'Prata Anã' normais e variantes somaclonais com e sem pulverização de GA_3 com espalhante adesivo. A seta indica uma variante somaclonal que recebeu aplicação de GA_3 com espalhante adesivo.

Os resultados apresentados comprovam mais uma vez que é possível distinguir as bananeiras 'Prata Anã' variantes somaclonais para o fenótipo gigante, das não variantes pela simples aplicação foliar de ácido giberélico durante a fase de aclimação das mudas, por um período de 30 dias, com uma frequência de aplicação de duas vezes por semana. O experimento 4, que foi desenvolvido em blocos casualizados, juntamente com os resultados do experimento 3, desenvolvido em DIC, mostra que a reprodutibilidade dos resultados é confiável. Os dois experimentos apresentaram também uma alta precisão, com coeficientes de variação de 11,62% em DIC e 20,03% em DBC.

Em trabalhos anteriores foram realizadas aplicações de GA₃ foliares e inoculações deste regulador em meio de cultura permitiram distinguir variantes somaclonais de não variantes para a cultivar ‘Gran Naine’ (Sandoval et al, 1999), porém esta prática é pouco viável quando se trabalha em larga escala de produção de mudas, já que as mudas de ‘Prata Anã’, no ambiente *in vitro*, variam bastante em tamanho e isso impossibilita distinguir as normais das variantes nessas condições. No presente trabalho, aplicações foliares em fase de aclimação em estufas de nebulização permitem viabilizar a distinção destes variantes de forma prática em um curto espaço de tempo e com baixo custo. Além do mais, não é necessária mão de obra especializada para tal procedimento já que a morfologia dos variantes é bastante característica e visível. Em trabalhos realizados com aplicação de ácido giberélico, por 30 dias, em fase de aclimação, para distinção de bananeiras das cultivares ‘Prata Anã’ e ‘Prata Gigante’ verificou-se diferença de crescimento entre as cultivares (Carvalho et al, 2005). De acordo com os autores, apesar da altura das cultivares serem diferentes após a aplicação de GA₃, elas apresentam a mesma constituição genética por serem as duas pertencentes ao grupo AAB e provavelmente deveriam ter a mesma reação a giberelina exógena. Assim, de acordo com os autores, a ‘Prata Anã’ apresenta deficiência na síntese da giberelina endógena, só respondendo a estímulo da aplicação exógena. Por outro lado, a cultivar ‘Prata Gigante’, apesar de possuir giberelina endógena, nesta etapa inicial de aclimação, só responde à aplicação de giberelina exógena, em função de seu mecanismo de síntese não se apresentar perfeitamente organizado, sendo sua superioridade verificada mais tardiamente, quando o seu mecanismo já apresenta condições fisiológicas de desenvolver adequadamente suas funções. As bananeiras ‘Prata Anã’ variantes somaclonais apresentam em campo o mesmo fenótipo das ‘Prata Gigante’ relatadas por Carvalho et al. (2005). Presume-se que o mesmo processo de sensibilidade às giberelinas que ocorre nas ‘Prata

Gigantes' ocorra em variantes somaclonais de 'Prata Anã', porém acreditamos que esta característica esteja diretamente ligada a modificações no genótipo dessas plantas já que tal fenótipo variante é reproduzido quando explantes de 'Prata Anã' variantes em campo são inoculados em meio de cultura e posteriormente plantados.

No presente trabalho, pode-se verificar que as 'Prata Anã' variantes somaclonais apresentam características genéticas que levam a um fenótipo visualmente diferente das normais quando é aplicado GA₃ nestas plantas. A diferença de altura entre as plantas normais e variantes é visualmente e estatisticamente diferente, o que permite um método eficiente de distinção destes variantes em meio aos normais.

Em estudos anatômicos comparando a anatomia cuticular de 'Prata Anã' normal e variante somaclonal, pode ser observada uma descamação da cera de plantas variantes nas fases de cultivo *in vitro* e *ex vitro* (Lacerda, 2006). Alguns autores afirmam que existe uma correlação entre o aumento da cera e a redução da condutância epidérmica de algumas plantas. Da mesma maneira a diminuição da cera aumentaria a condutância (Cameron et al., 2006). Muito provavelmente, esta descamação permitiu uma melhor penetração do ácido giberélico durante o experimento nas plantas variantes em relação às plantas normais. Este fator pode ter contribuído para o fenótipo observado durante os experimentos que permitiram distinguir as bananeiras normais das variantes somaclonais.

Com análises de microscopia de luz foi possível verificar aumento significativo no diâmetro da nervura central e no tamanho do parênquima esponjoso de 'Prata Anã' variante tratada com GA₃, em detrimento dos demais tratamentos (Figura 11). Estes marcadores morfológicos permitem demonstrar que as variantes somaclonais respondem de modo diferenciado a presença de GA₃, o que nos permite sugerir que o fenótipo de gigantismo está relacionado ao metabolismo das giberelinas. O aumento do parênquima esponjoso pode ter

ocorrido em função da necessidade de disponibilidade de espaço e luminosidade para o tecido. Tanto o parênquima paliçádico como o esponjoso são tecidos responsáveis pela fotossíntese e apresentaram um maior desempenho de crescimento devido ao aumento da capacidade e da necessidade fotossintética da planta (Araus et al., 1986). Assim, o crescimento elevado das plantas variantes que receberam GA₃ em relação as demais pode ter levado a uma maior demanda de fotoassimilados e por conseqüências ocorreu maior desenvolvimento desse tecido.

A pulverização de giberelina em cana de açúcar promoveu aumento do número de feixes vasculares na região do nó e uma diferenciação precoce do xilema e do floema tanto na região do anel de crescimento acima do entrenó como na região do nó (Martins & Castro, 1999). De acordo com Sachs et al. (1959), após a aplicação de giberelina em *Hyoscyamus* e em *Samolus* ocorreu um intenso aumento da atividade mitótica observado na medula, córtex e tecido vascular abaixo do meristema apical. A pulverização de GA₃ e paclobutrazol modificou a morfologia de folhas de arroz, no entanto o número de células da nervura central não aumentou o que sugere que estes reguladores podem estão relacionados também com a expansão celular (Yim et al, 1997). Desta maneira a aplicação de GA₃ interfere diretamente na estrutura anatômica das plantas, inclusive na nervura central, provavelmente, devido a uma taxa de crescimento elevado, em que as plantas necessitam de um sistema de transporte mais robusto e mais eficiente para garantir este crescimento.

7 CONCLUSÕES

A aplicação foliar de ácido giberélico (GA_3) em bananeiras ‘Prata Anã’ micropropagadas, aclimatadas por um período de 30 dias, com uma frequência de duas vezes por semana, permitiu diferenciar mudas variantes somaclonais das não somaclonais com base na altura das plantas.

O estiolamento da bainha e as folhas lanceoladas podem ser marcadores morfológicos para distinguir as plantas normais das variantes somaclonais após a aplicação de ácido giberélico com espalhante adesivo.

Após dois meses de aclimação, a aplicação semanal de ácido giberélico, por um período de 30 dias, promove aumento no diâmetro da nervura central e no tamanho do parênquima esponjoso de bananeiras ‘Prata Anã’ variantes somaclonais que poder ser marcadores anatômicos para determinar tais variantes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALCÁZAR, R. et al. Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. **The Plant Journal**, v.43, p.425-436, 2005.

ARAUS, J.L. et al. Relationship between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. **American Journal of Botany**, v.73, n.12, p.1760-1770, 1986.

CAMERON, K.D.; TEECE, M.A.; SMART, L.B. Increased accumulation of cuticular wax and expresión of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tabaco. **Plant Physiology**, Rockville, v.140, p.176-183, 2006.

CARVALHO, J.A.B.S. et al. Uso da giberelina GA₃ na seleção do porte de bananeira das cultivares 'Prata' e 'Prata-anã'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.449-453, 2005.

FAO. **FAO statistical databases**: major food and agricultural commodities and producers: Countries by commodity: Selected commodity: bananas. Itália, Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ess/top/commodity>>. Acesso em: 09 set. 2006.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows: versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p.255-258.

GUIMARÃES, N. C. C. **Identificação de variantes somaclonais em bananeiras Prata-anã, utilizando técnicas moleculares e citogenéticas**. 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

IKEDA, A.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SONODA, Y.; KITANO, H.; KOSHIOKA, M.; FUTSUHARA, Y.; MATSUOKA, M.; YAMAGUCHI, J. *Slender rice*, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLRI* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. **The Plant Cell**, v. 13, p. 999–1010, 2001.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: [s.n.], 1997. 198p.

LACERDA, G.A. **Características citogenéticas, moleculares e morfológicas de variantes somaclonais de bananeiras ‘prata-anã’ cultivadas *in vitro***. 2006. 62p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Vale do Rio Verde de Três Corações.

HEDDEN, P.; KAMIYA, Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.48, p.431-460, 1997

HEDDEN, P.; PROEBSTING, W.M. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. **Plant Physiology**, v.119, p.365–370, 1999.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. 2nded. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 523p.

MARTINS, M.B.G.; CASTRO, P.R.C. Efeito de giberelina e ethephon na anatomia de cana de açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1855-1863, 1999.

PENG, J. et al. The Arabidopsis *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. **Genes & Development**, v.11, p.3194-3205, 1997.

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

SACHS, R.M.; BRETZ, C.F.; LANG, A. Shoot histogenesis: the early effects of gibberellin upon stem elongation in two rosette plants. **American Journal of Botany**, New York, v. 46, n. 5, p. 376-384, 1959.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.R.; BOLLAMMA, K.T. Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant**, v.39, p.551-556, 2003.

SANDOVAL, J. et al. Distribution of endogenous gibberellins in dwarf and giant off-types banana (*Musa* AAA, cv. 'Grand nain') plants from in vitro propagation. **Plant Growth Regulation**, v.17, p.219-224, 1995.

SANDOVAL, J.A.; CÔTE, F.; DOUMAS, P. Reconocimiento *in vitro* de variantes somaclonales de porte alto en banano (cv. 'Gran enano, *Musa* AAA). Respuesta a un tratamiento con GA₃. **Corbana**, v.24, n.51, p.11-20, 1999.

SWAIN, S.M.; SINGH, D.P. Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. **TRENDS in Plant Science**, v.10 n.3, p.123-129, 2005.

YIM, K.O.; KWON, Y.W.; BAYER, D.E. Growth Responses and Allocation of Assimilates of Rice Seedlings by Nclobutrazol and Gibberellin Treatment. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.16, p.35-41, 1997.

**CAPÍTULO III - CARACTERÍSTICAS DA ANATOMIA FOLIAR
VISANDO A DETECÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIIS DE
BANANEIRA CV. 'PRATA ANÃ' (AAB) MICROPROPAGADAS**

1 RESUMO

SILVA, Janáina de Oliveira Costa. Características da anatomia foliar visando a detecção de variantes somaclonais de bananeira cv. ‘Prata Anã’ (AAB) micropropagada. **In: Detecção de variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ (AAB) micropropagadas.** 2007, Cap. 3, p. 56 - 74. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

A micropropagação do gênero *Musa* vem sendo aplicada em larga escala para obtenção de mudas de qualidade fitossanitária. Esta propagação em condições *in vitro* de bananeiras ‘Prata Anã’ pode gerar variantes somaclonais que originam plantas sem valor comercial. Atualmente, a diferenciação das plantas variantes somaclonais é possível somente quando as mesmas encontram-se em condições de campo, mediante crescimento exagerado, conhecido como gigantismo. A anatomia de plântulas cultivadas *in vitro* e *ex vitro* fornece informações que podem auxiliar na melhoria das técnicas de micropropagação e na sua seleção precoce. Objetivou-se verificar a diferenciação das estruturas anatômica entre plantas normais e variantes somaclonais. Para tal, utilizou-se folhas de ‘Prata Anã’ cultivadas *in vitro*, em fase de aclimatação e no campo após a constatação da variação somaclonal. Secções paradémicas foram realizadas para avaliação da estrutura estomática. Secções transversais foram realizadas para medições da espessura das epidermes, medições dos parênquimas e da nervura central. Os resultados permitiram verificar diferenças estruturais das plantas ao longo das fases de cultivo. Foi possível também determinar marcadores anatômicos baseados no diâmetro da nervura central e na hipoderme inferior que permiti distinguir as plantas normais das variantes somaclonais.

Palavras-chave: variação somaclonal, bananeira, anatomia foliar.

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador) Antônio Chalfun-Júnior, Amauri Alves de Avarenga (Co-Orientadores) – UFLA.

2 ABSTRACT

SILVA, Janaína de Oliveira Costa. Anatomy characteristics of leaves in detection of somaclonal variants of micropropagated banana plants cv. ‘Prata Anã’ (AAB). **In: Detection of somaclonal variants of micropropagated banana plants ‘Prata Ana’ (AAB)** 2007, Cap. 3, p. 56 - 74. (Master Program in Agronomia/Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The micropropagation of *Musa* genus is applied at a wide scale in order to obtain plantlets with high sanitary quality. This *in vitro* propagation of ‘Prata Ana’ banana plant can generate somaclonal variants which originate plants without commercial value. Currently, differentiation of somaclonal variants is possible only in the field based on the exaggerated growing of the plants. The anatomy of plants cultivated *in vitro* and *ex vitro* can give information to improvement of micropropagation techniques. The objective of this work was to differentiate normal plants from variant ones by anatomic structures. For this purpose, leaves of banana plants ‘Prata Anã’ cultivated *in vitro*, during acclimatization phase and in the field after the visual detection of somaclonal variation were performed. Paradermic sections were produced to evaluate stomata structure. Transversal sections were done to measurement epidermis thickness, parenchyma and central vein. It could be seen by the results structural differences in plants during developmental phases. Moreover, in this work it was possible to determine anatomical markers to distinguish normal from variant plants based on the diameter vein and inferior hypoderm.

Key-words: somaclonal variation, banana plant, foliar anatomy.

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Antônio Chalfun Júnior, Amauri Alves de Avarenga (Co- advisers) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

O Brasil é hoje o segundo maior produtor de bananas no mundo, superado apenas pela Índia (FAO, 2006), onde os cultivares ‘Prata Anã’ e ‘Nanicão’ estão entre os principais plantados no país.

A micropropagação a partir de ápices caulinares cultivados *in vitro* está sendo extensivamente utilizada em diversos países para produção de mudas de bananeira. Esta técnica garante a obtenção de mudas livres de pragas e doenças o que reduz a disseminação de patógenos (Damasco et al., 1996; Álvares & Caldas, 2002). Porém, o cultivo *in vitro* pode levar a ocorrência de variação somaclonal que pode acarretar em prejuízos aos produtores (Santos & Rodrigues, 2004).

A variação somaclonal é definida como um tipo de variação no fenótipo de plantas regeneradas por cultura de tecidos. Esta variação pode ser de origem genética ou epigenética, que dependendo da cultivar, pode levar a morfologia do tipo anã, gigante, variegada, folhas lanceoladas entre outras (Sahijram et al., 2003). Em ‘Prata Anã’ (AAB) uma variação somaclonal freqüente é o crescimento exagerado das plantas que é detectado somente após o plantio em campo. Tal anormalidade prejudica o desenvolvimento dos cachos e dos frutos. A dificuldade em detectar esta variação antes do repasse destas para os agricultores tem limitado a utilização da propagação em bananeiras (Sandoval et al., 1999; Albany et al., 2005).

A anatomia vegetal tem sido adotada como ferramenta para o entendimento biológico de diversas espécies. Secções transversais de raiz, caule, folhas, entre outros órgãos permitem diferenciar espécies dentro de um mesmo gênero. Tal ferramenta pode ser utilizada também para o entendimento

fisiológico. Existem evidências de que a relação entre os diâmetros polares e os diâmetros equatoriais é importante para determinar o momento de transferir bananeiras ‘Prata Anã’ do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (Rocha, 2005). Em outros estudos a microscopia eletrônica permite detectar marcadores morfológicos para distinguir variantes somaclonais de plantas normais em ‘Prata Anã’ (Lacerda, 2006). Porém, esta técnica apresenta custo bastante elevado.

Objetivou-se analisar alterações anatômicas foliares de bananeira ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais obtidas no cultivo *in vitro*, em fase de aclimação e em campo após cinco meses de plantio, período em que se pode visualizar esse fenômeno.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O cultivo *in vitro* dos explantes de bananeira ‘Prata Anã’ foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular e a aclimação das mudas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, ambos da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Para o cultivo *in vitro*, explantes foram extraídos de bananeiras ‘Prata Anã’ consideradas normais (N) pelos padrões de desenvolvimento esperados para a cultivar e de plantas com variação somaclonal (V) identificadas pela característica do gigantismo. Estas matrizes encontravam-se em fase de produção no campo.

Os explantes provenientes de ápices caulinares de ‘Prata Anã’ variantes somaclonais e não-variantes foram cultivados em meio de cultura para multiplicação durante 30 dias e de enraizamento por mais 30 dias em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 16 horas de fotoperíodo, de acordo com os protocolos descritos por Lacerda (2006). Em seguida, as plantas foram aclimatadas em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo, a $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância por 60 dias, em tubetes com substrato PlantMax®.

Foram coletadas folhas de número 2 (Rocha, 2005) de variantes somaclonais provenientes de três explantes distintos (variante 1, 2 e 3) e de um não variante somaclonal nas seguintes fases de cultivo: 1) cultivo *in vitro* após o período de enraizamento, 2) após 60 dias de aclimação, 3) em campo após a constatação da presença ou ausência de variação somaclonal de acordo com as características morfológicas descritas por Guimarães (2005).

As folhas coletadas foram fixadas em F.A.A. (formaldeído: ácido acético: álcool etílico 70%) (Johansen, 1940) por 72 horas e posteriormente

conservadas em álcool 70°GL. Cortes transversais foram realizados na região mediana da folha por secções obtidas com o auxílio do micrótomo manual. Em seguida, as secções foram clarificadas em solução a 50% de hipoclorito de sódio, foram lavadas em água destilada e submetidas a coloração com safrablau, seguindo-se os métodos descritos por Kraus & Arduin (1997). As lâminas semi-permanentes foram montadas em glicerina 50%. Na avaliação do número de estômatos por mm² realizaram-se secções paradérmicas na epiderme da face abaxial. Nas fases de cultivo *in vitro* e aclimação foram analisadas 5 folhas de plantas normais e 5 folhas de cada um dos três variantes somaclonais. Na fase de campo foram analisadas 5 folhas provenientes de 5 diferentes bananeiras com variação somaclonal e 5 diferentes bananeiras normais. Secções transversais foram realizadas de folhas provenientes de todas as fases de cultivo para mensuração dos tecidos clorofilianos, das epidermes das faces abaxial e adaxial e da nervura central das folhas. Foram avaliados quatro campos do terço médio foliar, por folha coletada para a mensuração de células e tecidos.

Os parâmetros avaliados nas secções paradérmicas em cada tratamento foram: densidade estomática, diâmetros estomáticos polar e equatorial. Nas secções transversais de todos os tratamentos foram analisados: comprimento das epidermes das faces abaxial e adaxial, parênquimas paliçádico e esponjoso, hipodermes superior e inferior e diâmetro da nervura central, sendo que, a nervura central das folhas em campo não foi avaliada.

O delineamento experimental inteiramente casualizado foi utilizado com dois tratamentos (variantes e normais, e a repetição composta por três explantes variantes) para cada uma das três fases de cultivo e cinco plantas para cada tratamento. O esquema experimental foi o fatorial de 2 x 2. Os fatores foram avaliados pelo teste de médias Tukey, no programa SISVAR (Ferreira, 2000), a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

Nos resultados obtidos nas secções paradérmicas dos materiais coletados em diferentes fases de cultivo, somente o diâmetro polar dos estômatos na fase de campo apresentou diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de F nas bananeiras ‘Prata Anã’ em relação às plantas nas outras fases de cultivo (Tabela 1). As plantas variantes apresentaram diâmetro polar estomático menor em relação às plantas normais (Figura 1 - A2 e B2). No entanto, esta diferença não pode ser visualizada nas plantas em aclimação e *in vitro*. Já na fase *in vitro* e de aclimação, tanto as plantas normais quanto as variantes apresentaram diâmetro polar estomático maior que as plantas em campo. Além disso, pode-se verificar que a densidade estomática das plantas normais e variantes somaclonais aumenta ao longo das fases de desenvolvimento *in vitro*, de aclimação e em campo (Tabela 1). Já o diâmetro equatorial não apresentou tendência à diferenciação ao longo das fases de cultivo (Tabela 1). De acordo com a figura 1, também é possível observar que os estômatos tanto das plantas normais como variantes apresentam-se mais elípticos na fase de cultivo *in vitro* e na fase de aclimação em relação à fase de campo.

TABELA 1 Médias dos diâmetros equatorial e polar (μm) e da densidade estomática de folhas de bananeira ‘Prata Anã’ normais (N) e variantes somaclonais (V) comparando as fases de cultivo *in vitro*, aclimatadas e em campo.

Planta	Estruturas comparando as três fases de cultivo		
	Diâmetro Equatorial*	Diâmetro Polar*	Densidade Estomática*
N <i>in vitro</i>	17.42 b	33.06 b	92.45 a
V <i>in vitro</i>	17.23 a b	33.25 b	94.80 a
N aclimatada	17.93 b	32.45 b	135.05 b
V aclimatada	18.25 b	32.69 b	136.30 b
N campo	17.19 a b	27.80 a	243.00 c
V campo	15.41 a	25.92 a	221.52 c

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

Nas secções transversais pode-se observar que as epidermes das faces adaxial e abaxial apresentaram diminuição ao longo do desenvolvimento das plantas (tabelas 2). O parênquima paliçádico apresentou um crescimento ao passar do ambiente *in vitro* para a aclimação assim como no transplante para o campo. Já o parênquima esponjoso apresentou média de tamanho igual nas fases *in vitro* e aclimatadas, no entanto, na fase de cultivo em campo o parênquima esponjoso apresentou em média maior tamanho em relação às demais fases de cultivo. A nervura central das plantas normais apresentou aumento no diâmetro quando as plantas foram transplantadas para o ambiente externo. E o contrário ocorreu para as variantes. Pode-se observar também que a nervura central das plantas normais em fase de aclimação é maior que a nervura das variantes na mesma fase. Já a hipoderme superior não apresentou tendência de diferenciação ao longo do desenvolvimento de ‘Prata Anã’. A hipoderme inferior apresentou diminuição na passagem das plantas para o campo. Na fase *in vitro* a hipoderme inferior das normais é maior que a das plantas variantes, já na fase de aclimação é possível verificar um padrão de crescimento deste tecido nas plantas variantes em relação as normais. Neste caso, pode se observar que na

passagem da fase *in vitro* para a de aclimação, a hipoderme inferior das plantas normais não aumentou em tamanho, já a das plantas variantes houve crescimento significativo (Tabela 2).

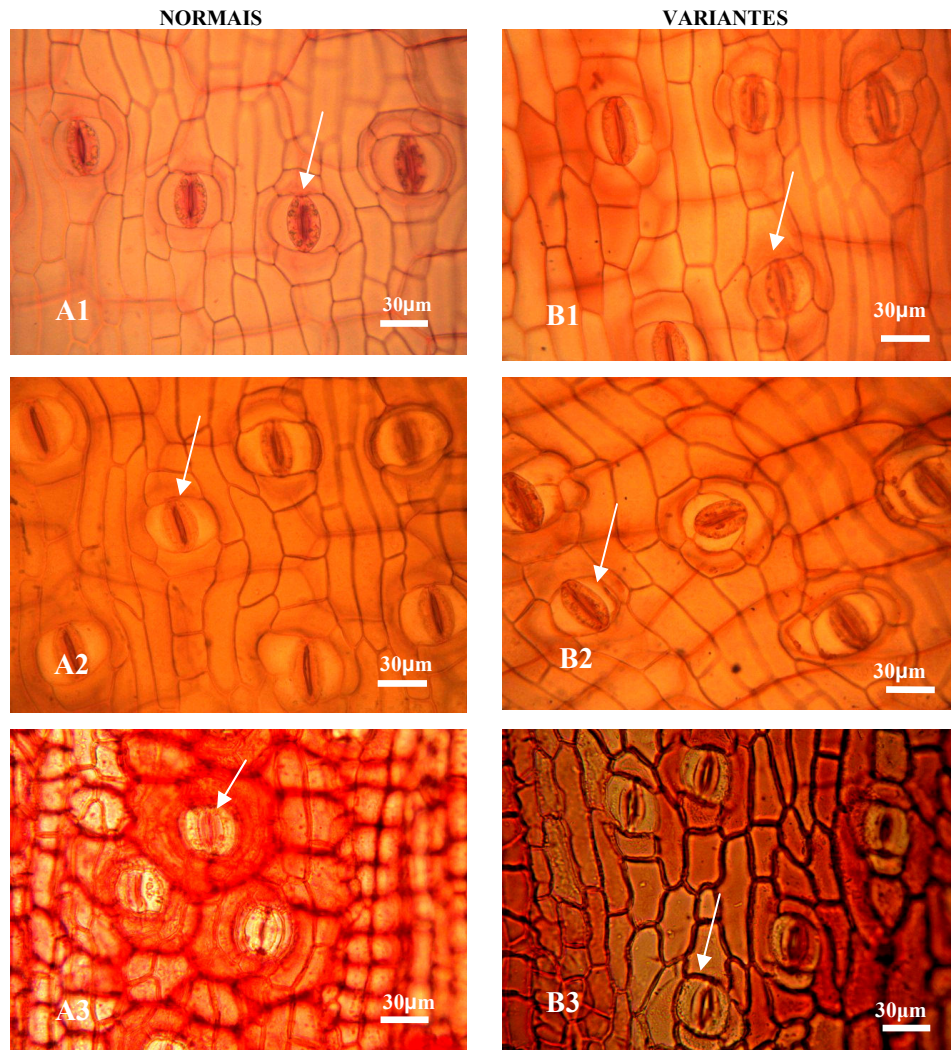


FIGURA 1 Secções paradérmicas de folhas de bananeira ‘Prata Anã’(40 ZM). A1 - plantas normais *in vitro*. B1- plantas variantes somaclonais *in vitro*, A2 - plantas normais aclimatadas. B2- plantas variantes somaclonais aclimatadas, A3 - plantas normais em campo. B3- plantas variantes somaclonais em campo. As setas indicam as estruturas estomáticas em cada uma das secções.

TABELA 2 Valores médios da epiderme abaxial (E.Ab), parênquima paliçádico (P.Pç), hipoderme superior (Hipo Sup), parênquima esponjoso (P.Ep.), hipoderme inferior(Hipo Inf), epiderme adaxial (E.Ad) e da nervura central (N.C.) das folhas de bananeira ‘Prata Anã’ normais (N) e variantes somaclonais (V) comparando as fases de cultivo in vitro, aclimatadas e em campo entre si. Os traços (-) indicam que não foram medidas estas estruturas

Estruturas comparando as três fases de cultivo							
Planta	E. Ab.*	E.Ad*	P. Pç*	Hipo Sup*	P. Ep*	Hipo Inf*	N.C*
N <i>in vitro</i>	20.93 c	22.23 d	62.37ab	70.89a	76.74a	53.49 c	536.15ab
V <i>in vitro</i>	18.18 bc	19.99 cd	52.48 ^a	68.40a	64.08a	45.23 b	557.28 b
N aclimatada	15.45 b	19.43 bc	64.31ab	65.63a	100.13a	53.44 c	627.43 c
V aclimatada	15.78 b	18.21abc	75.43 b	71.43a	96.13a	62.74 d	482.38a
N campo	10.69a	16.50a	206.91 c	60.18a	467.87 b	20.01a	-
V campo	11.46a	17.11ab	198.26 c	72.56a	479.62 b	18.788a	-

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5%.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram verificar modificações na estrutura anatômica de bananeira ‘Prata Anã’ entre as fases de cultivo *in vitro*, aclimação e em campo e entre as bananeiras normais e variantes.

A resposta à diminuição do diâmetro polar tanto nas plantas normais como nas variantes somaclonais (Tabela 1) pode estar associada à economia de água no ambiente *ex vitro*, já que, folhas com estômatos menores apresentam maior eficiência de uso da água e a diferença no tamanho da abertura estomática apresenta maior efeito sobre a difusão de água do que sobre a difusão de CO₂ (Bidwell, 1974). Este efeito pode estar acentuado nas variantes pelo fato de apresentarem estatura bastante elevada em relação as normais, fato este que pode levar a um aumento na taxa de transpiração e maior demanda de água. A ocorrência de menor densidade estomática e maior diâmetro polar em bananeiras cultivadas *in vitro* e em aclimação em relação às plantas em campo, pode indicar um mecanismo de eficiência na abertura e fechamento dos estômatos para evitar perda de água para evitar a dessecação das plantas. Além disso, a presença de estruturas estomáticas mais elípticas na fase de cultivo *in vitro* indica que estas estruturas são menos funcionais em relação às mesmas estruturas na fase de campo, na qual apresentam-se mais arredondadas. Este fato pode estar relacionado à elevada umidade relativa do ar presente nas condições *in vitro* e dessa maneira os estômatos têm pouca funcionalidade nestas condições.

O mesmo ocorre em abacaxizeiros micropropagados quando estes são passados para a fase de aclimação (Silva, 2006). No entanto, o aumento na densidade e no tamanho dos estômatos foi relatado como fator para a excessiva

perda de água após o transplante do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (Lee et al., 1988; Sciutti & Morini, 1995). Em diversas espécies, a densidade estomática decresce após o transplante dos explantes *in vitro* para o ambiente *ex vitro* entretanto, outros autores afirmam que dependendo da espécie, a densidade estomática pode sofrer um incremento após este transplante (Johansson *et al.*, 1992; Noé & Bonini, 1996; Tichá et al., 1999; Brutti et al., 2002).

Ao contrário das folhas de abacaxizeiro micropropagado em que o transplante das plantas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* levou a um aumento da epiderme adaxial e a epiderme abaxial não sofreu alterações (Silva, 2006), em ‘Prata Anã’ houve uma diminuição das epidermes ao longo das fases de desenvolvimento. Isto pode ter ocorrido em função de uma maior disponibilidade de espaço e luminosidade para o parênquima clorofiliano, o que está de acordo com os dados obtidos que mostram aumento significativo do parênquima paliçádico (Tabela 2). O parênquima esponjoso, porém, apresentou aumento somente após o transplante das plantas *in vitro* para a aclimação (tabela 2). Estes tecidos são responsáveis pela fotossíntese e provavelmente apresentaram um maior desempenho de crescimento devido ao aumento da capacidade fotossintética da planta (Araus et al., 1986).

Os fatores ambientais afetam as dimensões assim como o arranjo dos elementos vasculares para garantir um aumento na segurança do transporte quando a planta está sujeita a algum tipo de estresse (Baas & Schweingruber, 1987; Alves & AngyAlossy-Alfonso, 2000) como, por exemplo, a passagem do cultivo *in vitro* para o ambiente externo. Estes fatores podem estar relacionados ao aumento da nervura central nas plantas normais ao longo das fases de cultivo de ‘Prata Anã’. Além disso, é possível diferenciar as plantas normais das variantes somaclonais com base no diâmetro da nervura central na fase de aclimação dessas plantas. Este dado pode ser utilizado como marcador morfológico para detectar precocemente os variantes antes que eles sejam

levados para o campo. Um outro marcador morfológico que pode ser estabelecido neste trabalho é a diferença na espessura hipoderme inferior entre as variantes e as normais tanto nas fases de aclimação como *in vitro*. Neste caso, é verificado que este tecido cresce em espessura nas plantas variantes ao transplantar essas plantas do ambiente *in vitro* para *ex vitro*. Já nas plantas normais este tecido não sofre aumento significativo no meso processo.

Desta maneira, as análises da estrutura anatômica de bananeiras ‘Prata Anã’ micropropagadas representam uma importante ferramenta para distinguir plantas normais e variantes somaclonais além de permitir observar modificações estruturais ao longo das fases de desenvolvimento dessas plantas. Este estudo permite também relacionar as modificações anatômicas das plantas com diversos processos fisiológicos para a compreensão dos fatores que levam a variação somaclonal. Nesse sentido, análises mais aprofundadas são necessários para melhor compreensão da variação somaclonal em bananeiras ‘Prata Anã’.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou existir variações marcantes nas estruturas anatômicas ao longo das fases de cultivo de ‘Prata Anã’ micropropagada, representando respostas às mudanças ambientais que estas plantas sofreram ao longo do seu desenvolvimento.

Além disso, foi possível determinar marcadores morfológicos que permitem distinguir precocemente as plantas normais das variantes somaclonais. Porém, são necessários estudos mais aprofundados a respeito da anatomia dessas plantas para que seja possível compreender os processos que levam a essa variação somaclonal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVARES, M.C.; CALDAS, L.S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.3, p.415-420, 2002.
- ALVES, E.S.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Ecological trends in the wood of some Brazilian species 1: growth rings and vessels. **IAWA Journal**, v.21, p.3-30, 2000.
- ALBANY, N.R. et al. Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (Musa AAA) after in vitro multiplication with growth retardants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, p.357-361, 2005.
- ARAUS, J.L. et al. Relationship between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. **American Journal of Botany**, v.73, n.12, p.1760-1770, 1986.
- BAAS, P.; SCHWEINGRUBER, F.H. Ecological trends in the wood anatomy of trees, shrubs and climbers from Europe. **IAWA Bulletin**, v.8, p.245-274, 1987.
- BIDWELL, R.G.S. Protein synthesis and turn over in cultured plant tissue: sources of carbon synthesis and the fate of the protein breakdown products. **Nature**, v.203, p.367-373, 1974.
- BRUTTI, C.B. et al. Artichoke leaf morphology and surface features in different micropropagation stages. **Biologia Plantarum**, v.45, n.2, p.197-204, 2002.
- DAMASCO, O.P. et al. Gibberellic acid detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.36, n.2, p.237-241, 1996.
- FAO. **FAO statistical databases**: major food and agricultural commodities and producers: Countries by commodity: Selected commodity: bananas. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ess/top/commodity>>. Acesso em: 9 set. 2006.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows: versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p.255-258.

GUIMARÃES, N.C.C. **Identificação de variantes somaclonais em bananeiras Prata-anã, utilizando técnicas moleculares e citogenéticas.** 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Seropédica: [s.n.], 1997. 198p.

LACERDA, G.A. **Características citogenéticas, moleculares e morfológicas de variantes somaclonais de bananeiras ‘prata-anã’ cultivadas *in vitro*.** 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)–Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Vale do Rio Verde de Três Corações.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* – and *in vivo* – developed Sweetgum leaves. **The Journal of American Society for Horticultural Science.** v.113, n.1, p.167-171, 1988.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** New York: Mc Graw-Hill, 1940. 2v., 523p.

JOHANSON, M.; KRONESTEDT – ROBARDS, E.C.; ROBARDS, A.W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma,** v.166, p.165-176, 1992.

NOÉ, N.; BONINI, L. Leaf anatomy of highbush blueberry grown *in vitro* and during acclimatization to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum,** v.38, p.19-25, 1996.

ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira ‘Prata Anã’:** alterações morfoanatômicas. 2005. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.R.; BOLLAMMA, K.T. Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant,** v.39, p.551–556, 2003.

SANDOVAL, J.A.; CÔTE, F.; DOUMAS, P. Reconocimiento *in vitro* de variantes somaclonales de porte alto en banano (cv. ‘Gran enano, *Musa* AAA). Respuesta a un tratamiento con GA₃. **Corbana**, v.24, n.51, p.11-20, 1999.

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

SCIUTTI, R.; MORINI, S. ater loss and photosynthesis of plum plantlets by relative humidty during rooting in vitro. **Journal of Horticultural Science**, v.70, n.2, p.221-228, 1995.

SILVA, A.B. **Biorreatores e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro**. 2006. 132f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)–Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TICHÁ, I.; RADOCHOVÁ, B.; KADLECEK, P. Stomatal morphology during acclimatization of tabacco plantlets to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v.42, p. 69-474, 1999.

**CAPÍTULO IV - PERFIL DE COMPOSTOS EM VARIANTES
SOMACLONAIS E NÃO VARIANTES DE BANANEIRAS 'PRATA ANÃ'
MICROPROPAGADAS**

1 RESUMO

SILVA, Janaína de Oliveira Costa. Perfil de compostos em variantes somaclonais de bananeiras ‘Prata Anã’ micropropagadas. **In: Detecção de variantes somaclonais de bananeira ‘Prata Anã’ micropropagada.** 2007, Cap 4, p. 75 – 96. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A micropropagação do gênero *Musa* é realizada no sentido de obter culturas assépticas a partir de ápices caulinares. As vantagens da utilização desta técnica são a obtenção de plantas livres de patógenos e a produção de mudas em um curto espaço de tempo. O surgimento de variantes somaclonais em mudas micropropagadas têm gerado perdas tanto para as empresas produtoras de mudas quanto para os produtores no campo. A variação somaclonal em ‘Prata Anã’ corresponde ao surgimento de anomalias na estatura que levam ao gigantismo. Estudos fisiológicos têm focado no papel dos derivados do ácido giberélico no crescimento. A identificação e caracterização de mutantes anões com defeitos no alongamento caulinar revelaram níveis muito baixos de giberelinas bioativas, e este defeito está em etapas da rota de biossíntese desses compostos. O objetivo deste trabalho foi verificar a diferença no perfil de compostos ácidos endógenos, os quais podem estar as giberelinas, de bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais nas fases de cultivo *in vitro*, de aclimação e no campo. A metodologia utilizada para obtenção do extrato das folhas foi baseada em Chiwocha et al. (2003). O perfil dos compostos ácidos foi obtido por espectrometria de massas (ESI – MS/MS) e os resultados analisados por PCA e HCA (análise multivariada) empregando-se o perfil dos espectros de massas obtidos por infusão da amostra na fonte de íons (ESI). Observou-se que as variantes somaclonais apresentam diferentes perfis de compostos durante a fase de aclimação, e na fase adulta e *in vitro* as plantas variantes e não variantes apresentam perfis bastante semelhantes. Com base nesses resultados, a análise do perfil de compostos presentes nessas plantas pode contribuir para verificar as diferenças que existem entre as plantas.

Palavras-chave: variação somaclonal, espectrometria de massas, micropropagação, bananeira ‘Prata Anã’

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antônio Chalfun Júnior, Amauri Alves de Avarenga (Co-Orientadores) – UFLA.

2 ABSTRACT

SILVA, Janaína de Oliveira Costa. Fingerprint of somaclonal variants of micropropagated banana plants 'Prata Anã'. **In: Detection of somaclonal variants of micropropagated banana plants 'Prata Ana' (AAB) 2007**, Cap. 4, p.75 - 96. (Master Program in Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The micropropagation of the genus *Musa* is carried out in the direction to get aseptic cultures from stem apices. The advantages of the use of this technique are the attainment of pathogenic free plants and the production in a short time. The emergence of somaclonal variants in micropropagated plants has generated losses in such a way for the producing companies of plants as for the producers in the field. The somaclonal variation in 'Prata Anã' corresponds to the appearance of anomalies in the height leading to the gigantism. Physiological studies have focused on the role of the gibberellic acid in the growing. The identification and characterization of dwarf mutants with defects in the stem growth had disclosed low levels of gibberellins active, and this defect is in the biosynthetic pathways. The objective of this work was to verify the difference in the endogenous composite, which can be the gibberellins, from 'Prata Anã' banana plants, normal and somaclonal variants during *in vitro* culture, acclimatization and in the field, phases. The methodology used to obtain extract of leaves was based in Chiwocha et al. (2003). The fingerprint of acid composites was carried out by mass spectrometry (ESI - MS/MS) and the results analyzed by PCA and HCA (multivaried analysis) having used the fingerprint of the mass specters gotten by infusion of the sample in the ion source (ESI). It was observed that the somaclonal variants presented different composite during the acclimatization phase, in the adult phase and *in vitro*, the variant and normal plants present similar profiles. On the basis of these results, the analysis of the fingerprint composite in these plants can contribute to verify the differences that exist between the two types of plants.

Key-words: somaclonal variation, mass spectrometric, micropropagation, banana plant 'Prata Anã'.

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Antônio Chalfun Júnior, Amauri Alves de Avarenga (Co-advisers) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de bananas no mundo, superado somente pela Índia (FAO, 2006) e os principais cultivares produzidos no país são 'Prata Anã' e 'Nanicão'. Os métodos convencionais de obtenção de mudas de bananeiras aumentam a possibilidade de contaminação das plantas com pragas e doenças. Assim, os produtores têm optado por mudas de bananeiras micropropagadas.

A micropropagação no gênero *Musa* tem sido realizada no sentido de obter culturas assépticas a partir de ápices caulinares. A vantagem da utilização desta técnica é a obtenção de plantas livres de organismos patogênicos, tais como Sigatoka Negra e Amarela, Mal-do-Panamá, diversos nematóides, entre outras. A micropropagação pode fornecer rapidamente um grande número de mudas, mesmo usando instalações reduzidas (Vuylsteke & Ortiz, 1996). No entanto, um problema comum é a ocorrência de variação somaclonal que corresponde ao surgimento de mudanças fenotípicas que podem ser de origem genética ou epigenética (Sahijram *et al.*, 2003). Smith (1988), em seus estudos com bananeiras micropropagadas, verificou a presença de variações somaclonais com fenótipos de porte baixo, gigantismo, folhas afiladas, coloração variegada, ausência de cerosidade no limbo foliar entre outras. Na cultivar 'Prata Anã' (AAB) o crescimento exagerado ou gigantismo é uma variação somaclonal freqüente que é detectado somente após o plantio. Esta mudança fenotípica prejudica a produtividade devido à diminuição do tamanho dos cachos.

As giberelinas são reguladores de crescimento e, quando em atividade nas plantas, como fitormônios, são responsáveis por controlar aspectos do crescimento e do desenvolvimento vegetal como alongamento de caule,

crescimento de raízes e frutos, formato das folhas, estiolamento, assim como, no desenvolvimento da floração e das flores pela quebra de dormência de gemas (Swain & Singh, 2005). Estes hormônios são promotores de crescimento, efeitos que podem ou não ser semelhantes aos da auxina. Porém, essas substâncias produzem grande efeito sobre plantas intactas enquanto as auxinas produzem melhor efeito sobre plantas segmentadas (Hedden & Proebsting, 1999).

A identificação e caracterização de mutantes com deficiência no alongamento caulinar revelaram que alguns deles apresentam baixos níveis de giberelinas bioativas e estes apresentam algum bloqueio em um dos passos na rota de biossíntese das giberelinas (Hedden & Kamiya, 1997; Hedden & Proebsting, 1999). Níveis endógenos de auxinas e brassinosteróides também afetam a expressão de genes envolvidos na biossíntese de giberelinas e isto tem sugerido que a funcionalidade das giberelinas pode estar integrada com esses hormônios ou com a presença de moléculas produzidas a partir deles (Alcazar et al, 2005).

Estudos com milho (Fujioka et al, 1990), pinheiro (Christmann & Doumas, 1998), *Prunus avium* (Huanpu et al, 2001), *Arabidopsis* sp. (Alcázar et al, 2005) entre outros tem tentado entender os aspectos fisiológicos das giberelinas através da quantificação e caracterização das giberelinas. No entanto, pouco se sabe sobre a ação de hormônios em bananeiras.

Estudos com aplicação exógena de um tipo de giberelina (GA₃) em bananeiras do tipo 'Grand Naine' (AAA) variantes somaclonais para o gigantismo foram satisfatórios para a identificação desses variantes ainda em fase de cultivo *in vitro* (Sandoval et al., 1999). O mesmo foi feito com a cultivar Cavendish (AAA) porém no intuito de detectar variantes para fenótipo anão em fase de aclimação das mudas (Damasco et al., 1996). Carvalho et al. (2005) também utilizou a aplicação exógena de ácido giberélico (GA₃) ainda em fase de aclimação para distinguir mudas da cultivar 'Prata Anã' e 'Prata-Gigante'.

Contudo, nenhum desses estudos tentou identificar o perfil de compostos produzidos pelas mudas normais e variantes somaclonais, assim como a composição endógena de giberelinas.

Desta maneira, a quantificação de giberelinas endógenas e a caracterização do perfil de compostos presentes em bananeiras ‘Prata Anã’ variante e não variante somaclonal pode dar subsídios para o entendimento desse fenótipo anormal e contribuir para a detecção desses variantes antes de disponibilizar as mudas no mercado. Assim, objetivou-se verificar a diferença no perfil de compostos ácidos endógenos, dentre os quais podem estar as giberelinas, nas fases *in vitro*, de aclimação e no campo após 5 meses de plantio de variantes e não variantes somaclonais de ‘Prata Anã’.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para obtenção do material vegetal, 5 folhas de diferentes bananeiras ‘Prata Anã’ variantes somaclonais para o gigantismo e 5 folhas de diferentes bananeiras não variantes somaclonais foram coletadas nas seguintes fases de cultivo: 1) cultivo *in vitro* após o período de enraizamento, fase que antecede a aclimação, 2) após 60 dias de aclimação, 3) em campo após a constatação da presença ou ausência de variação somaclonal de acordo com as características morfológicas descritas por Guimarães (2005).

O cultivo *in vitro* dos explantes de bananeira ‘Prata Anã’ foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular e a aclimação das mudas foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas ambos da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. A coleta das folhas em campo foi realizada no município de Andradas – MG em março de 2006.

As análises de espectrometria de massas (ESI-MS/MS) foram realizadas no Laboratório Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

Para o cultivo *in vitro*, explantes de bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais foram extraídos, considerando normais (N) pelos padrões de desenvolvimento esperados para a cultivar e variantes (V) identificadas pela característica do gigantismo. As plantas matrizes encontravam-se em fase de produção no campo.

Os explantes provenientes dos ápices caulinares de ‘Prata Anã’ variantes somaclonais e não-variantes foram cultivados em meio de cultura para

multiplicação durante 30 dias e de enraizamento por mais 30 dias em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 16 horas de fotoperíodo de acordo com os protocolos descritos por Lacerda (2006). Em seguida, as plantas foram aclimatadas em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo, a $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância por 60 dias, em tubetes com substrato PlantMax®.

Nas plantas normais e variantes somaclonais em fase de aclimação foi aplicado um tratamento com 10 g.L^{-1} de ácido giberélico (GA_3) por um período de 30 dias com uma frequência de aplicação de duas vezes por semana. As plantas do grupo controle foram tratadas com água destilada pelo mesmo período e com a mesma frequência. As mudas foram cultivadas em sala de crescimento por aproximadamente dois a três meses, em tubetes com PlantMax® em condições de temperatura e fotoperíodo controlados. Como descrito, foram coletadas 5 folhas de cada tratamento nesta fase para as análises.

No campo, foram coletadas folhas de plantas adultas após a identificação das mesmas como variantes somaclonais ou não variantes sendo que as bananeiras variantes apresentavam como parâmetros morfológicos o porte mais alto, folhas mais eretas e lanceoladas e pseudocaule fino (Guimarães, 2005).

As folhas foram identificadas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises.

4.2 Extração e purificação do material vegetal

A metodologia aplicada para extração de compostos ácidos foi baseada nos trabalhos de Chiwocha *et al.* (2003) com algumas modificações.

As amostras correspondiam a 5 folhas de cada um dos materiais: 1) bananeiras normais em fase de aclimação sem aplicação de GA_3 2) variantes somaclonais em fase de aclimação sem aplicação de GA_3 ; 3) bananeiras

variantes somaclonais em fase de cultivo *in vitro*; 4) bananeiras normais em fase de cultivo *in vitro*; 5) bananeiras normais em fase de campo; 6) variantes somaclonais em fase de campo; 7) bananeiras normais em fase de aclimação com aplicação de GA₃; 8) bananeiras variantes somaclonais em fase de aclimação com aplicação de GA₃.

Em cada amostra, as folhas foram maceradas em N₂ líquido e liofilizadas por 24 horas. As amostras liofilizadas foram pesadas e anotados os respectivos pesos (50-100 mg). Cada amostra foi colocada em um tubo de centrifuga com 4 mL de isopropanol:ácido acético glacial (99:1) e levadas ao agitador orbital a 200 rpm, 4°C por 9 horas. Os tubos foram centrifugados a 290g por 10 minutos. Foi coletado o sobrenadante e adicionado mais 500µl de isopropanol:ácido acético glacial (99:1) e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente coletado e adicionado ao anterior. Em seguida, colunas C18 foram equilibradas com 4 mL de metanol 100%, e em seguida foram filtradas as amostras individualmente. Logo após, as colunas foram lavadas com metanol 80% com 1% de ácido acético glacial e posteriormente lavadas com 0,5 mL de isopropanol: ácido acético (99:1). Todos os extratos foram coletados individualmente. Os extratos analisados corresponderam ao extrato com metanol 80% acidificado com 1% de ácido acético glacial e (99:1) isopropanol: ácido acético. O perfil dos compostos ácidos e possíveis giberelinas foi obtido por espectrometria de massas (ESI-MS/MS_ion trap).

4.3 Organização dos dados

Para a análise multivariada os dados foram organizados em uma matriz ($n \times p$), em que as linhas da matriz representam as amostras e as colunas o conjunto das massas presentes no perfil de cada amostra (m/z). Para reduzir o número de variáveis foi realizada uma análise de componentes principais e para

verificar se havia diferença entre os grupos analisados foi realizada uma análise por agrupamentos hierárquicos (Santos, 2005).

4.4 Processamento dos espectros de massas

Os espectros de massas foram obtidos na faixa de 100 a 1.000 m/z para as análises em ESI-MS/MS. Foram consideradas somente as massas que possuíam intensidade relativa superior a 5%. Foram empregadas as intensidades relativas e os dados foram centrados na média. Essa operação, geralmente, reduz a dimensão do modelo. As condições de análise das amostras foram: 1) F_{N_2} spray = 0 psi, 2) F_{N_2} secagem = 4 minutos, 3) Temperatura de secagem = 250°C, Extrator = + 3500V, Estabilidade = 100%, ICC = 30000.

4.5 Análise estatística

As análises realizadas foram: análise de componentes principais (PCA) e análise agrupamentos hierárquicos (HCA). O software utilizado para o tratamento dos dados foi o R. Para a análise de PCA, a função utilizada foi a *prcomp* (R Development Core Team, 2004). Para a análise de HCA, utilizou-se a função *hclust* (R Development Core Team, 2004). A distância utilizada foi a euclidiana e o método utilizado foi o método do vizinho mais distante (*complete linkage*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos perfis analisados não foram detectadas massas correspondentes as giberelinas em nenhum dos extratos testados, nem mesmo nos tratamentos que receberam aplicações de ácido giberélico (perfis não apresentados). Muito provavelmente, estes compostos apresentam-se em níveis abaixo do limite de detecção da técnica empregada. Possivelmente estes reguladores de crescimento podem estar ligados à variação da intensidade de compostos detectados em nosso trabalho. Alguns estudos têm utilizado técnicas de quantificação através de aparelhos tais como ESI-MS/MS (electrospray ionization-tandem mass spectrometry), HPLC (high-performance liquid chromatography), GC/MS (gas chromatography-mass spectrometry) entre outros para verificar a presença de giberelinas e outros fitormônios em diversas plantas (Croker et al., 1990; Blake et al., 1993; Chiwocha et al., 2003 Alcázar et al., 2005). Alcazar et al (2005), verificou que a superexpressão de um gene (*ACD2*) em *Arabidopsis* levava ao nanismo e floração tardia das plantas, e a partir de métodos de quantificação de compostos foi possível verificar que as características fenotípicas dessas plantas estavam relacionadas a baixa produção de giberelinas. De acordo com Hedden & Proebsting (1999), mutantes de *Arabidopsis* e ervilha para a produção ou inibição da produção de giberelinas bioativas pode levar a fenótipos gigantes ou anões, respectivamente. Desta maneira, estudos aprofundados são importantes no entendimento dos compostos produzidos por bananeiras ‘Prata Anã’ variantes somaclonais e os mecanismos que levam a esta anomalia nestas plantas. Em nossas análises alguns sinais m/z característicos foram observados mas somente com a técnica de ESI-MS não é possível identificar os compostos referentes a

cada um desses sinais. Contudo, o perfil do espectro de massas obtido para cada uma das amostras pode ser uma ferramenta poderosa para identificar plantas variantes.

5.1 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos dados obtidos na análise dos espectros de massas obtidos. Por meio do gráfico de cotovelo (Figura 1), é possível determinar o número de componentes principais necessários para resumir a variação amostral total. Este gráfico é um processo de determinação do número apropriado de componentes a ser retido.

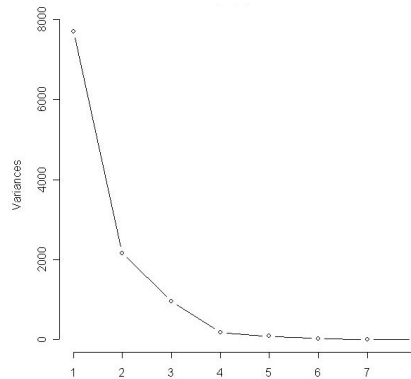


FIGURA 1 Gráfico de cotovelo para as variâncias das componentes principais dos dados obtidos por ESI-MS/MS (100-1.000 m/z). O eixo (x) representa as componentes principais e o eixo (y) representa a variância.

Pela análise da figura 1, observa-se que um cotovelo é formado na posição quatro. Isso significa que as componentes acima de 4 possuem a mesma magnitude e são relativamente pequenas. Sendo assim, as quatro primeiras componentes são suficientes para explicar a variação amostral total.

A variância cumulativa das 4 primeiras componentes principais foi de 98,91%, dos quais 69,30% são explicados pela componente principal 1 (PC1), 19,50% pela componente principal 2 (PC2), 8,57% pela componente principal 3 (PC3) e 1,58% pela componente principal 4 (PC4). A análise dos pesos de cada sinal de m/z em cada uma das PC analisadas permite diminuir a dimensionalidade do modelo. Assim, foram escolhidas somente as oito razões m/z que apresentavam maior peso em cada uma das PC (PC1, PC2, PC3 e PC4). De um total de 180 variáveis o sistema foi reduzido para 18 variáveis. A dispersão das amostras é mostrada por meio do gráfico de escores da primeira (PC1) contra a segunda componente principal (PC2). Nas figuras 2 e 3 são apresentados os gráficos de dispersão PC1xPC2 e PC2 X PC3, respectivamente.

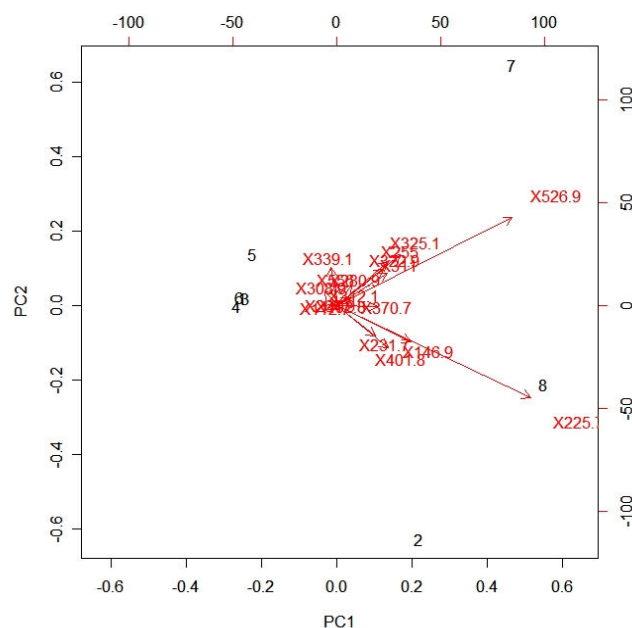


FIGURA 2 Gráfico de dispersão da primeira e segunda componentes principais (PC1 x PC2), sendo: (1) bananeira normal em fase de aclimação sem aplicação de giberelina (GA₃), (2) variante somaclonal em fase de aclimação sem GA₃, (3) variante somaclonal *in vitro*, (4) bananeira normal *in vitro*, (5) bananeira

normal em campo, (6) variante somaclonal em campo, (7) bananeira normal em fase de aclimação com GA₃, (8) variante somaclonal em fase de aclimação com GA₃.

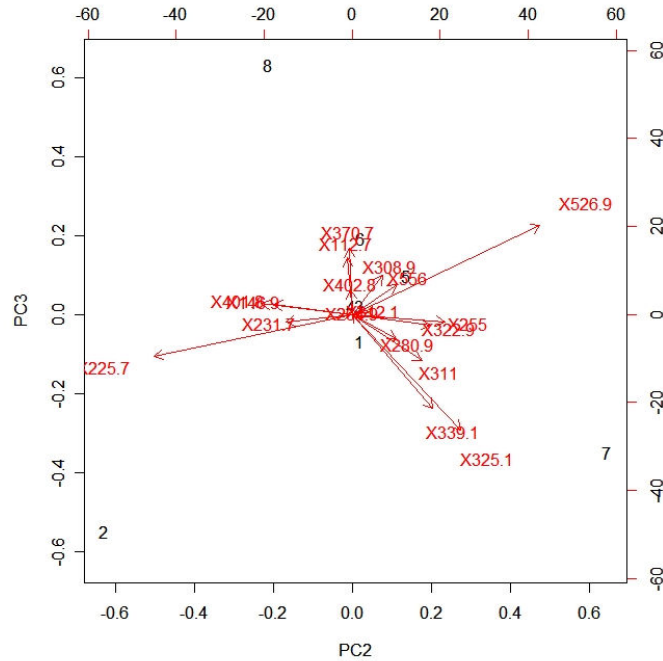


FIGURA 3 Gráfico de dispersão da segunda e terceira componentes principais (PC2 x PC3), sendo: (1) bananeira normal em fase de aclimação sem aplicação giberelina (GA₃), (2) variante somaclonal em fase de aclimação sem GA₃, (3) variante somaclonal *in vitro*, (4) bananeira normal *in vitro*, (5) bananeira normal em campo, (6) variante somaclonal em campo, (7) bananeira normal em fase de aclimação com GA₃, (8) variante somaclonal em fase de aclimação com GA₃.

O gráfico de dispersão apresenta uma separação especial entre as amostras das bananeiras normais com GA₃, das variantes com GA₃ e das variantes sem GA₃. As amostras de bananeiras normais e variantes em campo, *in vitro* e as normais em fase de aclimação estão bem agrupadas não permitindo

uma separação conveniente entre as mesmas, e estas se mostram separadas das demais, tanto para a dispersão PC1 x PC2 (figura 2) como para a dispersão PC2 x PC3 (figura 3). A análise dos pesos de cada uma das razões m/z permite avaliar quais compostos devem ser identificados para o entendimento da bioquímica do processo em estudo. Por exemplo, verifica-se que os compostos de razão m/z 146,9; 231,7; 225,7 e 401,8 são característicos das plantas variantes sob ação da GA₃. Sendo assim, a técnica de espectrometria de massas permite distinguir a bananeira ‘Prata Anã’ variante somaclonal na fase de aclimação com e sem aplicação de ácido giberélico (GA₃), além de possibilitar a diferenciação de plantas normais, nesta mesma fase, com a aplicação de GA₃.

5.2 Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA)

Após a PCA, foi realizada a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) utilizando-se, assim, um número reduzido de variáveis. A matriz de similaridade foi obtida pelo cálculo da distância euclidiana e o método utilizado foi o do vizinho mais distante (*complete linkage*). Os grupos formados estão representados no dendrograma na figura 4.

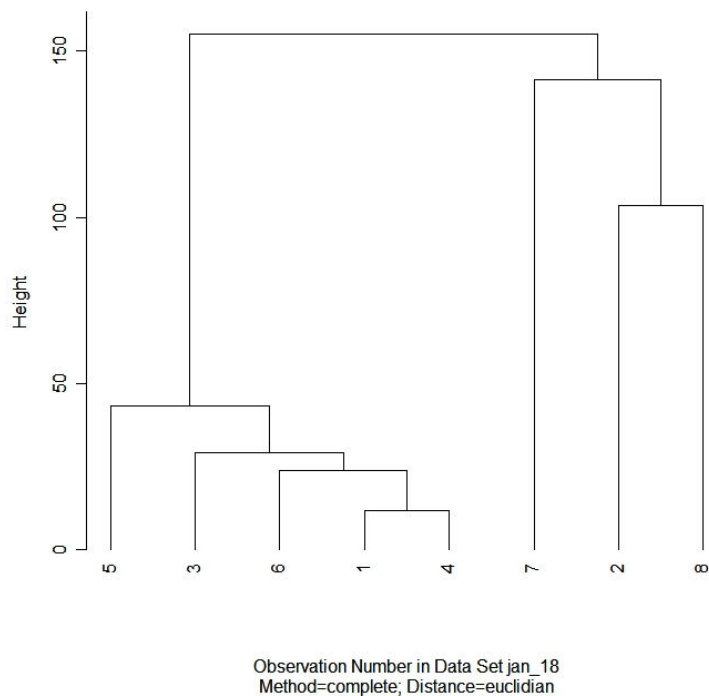


FIGURA 4 Dendrograma completo de 8 amostras de extrato de bananeira ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais em fase de cultivo *in vitro*, em fase de aclimação sem e com aplicação de GA₃ e em fase de cultivo em campo obtido por distância euclidiana e pelo método do vizinho mais distante, sendo: (1) bananeira normal em fase de aclimação sem aplicação de giberelina GA₃, (2) variante somaclonal em fase de aclimação sem GA₃, (3) variante somaclonal *in vitro*, (4) bananeira normal *in vitro*, (5) bananeira normal em campo, (6) variante somaclonal em campo, (7) bananeira normal em fase de aclimação com GA₃, (8) variante somaclonal em fase de aclimação com GA₃.

Como observado na análise de componentes principais, as amostras de plantas em campo, *in vitro*, e as normais em fase de aclimação sem aplicação de GA₃ distribuem-se de forma regular, permitindo agrupá-las. Em um grupo

bastante próximo estão variantes somaclonais sem aplicação de GA₃. No entanto, estas últimas apresentam-se mais próximas das plantas que receberam aplicação de GA₃ do que as demais. Observam-se também dois outros grupos formados pelas amostras de plantas normais e variantes somaclonais que receberam aplicação de GA₃, o que confirma o resultado observado na dispersão das amostras no gráfico de escores (Figura 4). Desta maneira, foi possível separar as plantas variantes somaclonais mesmo sem aplicação de GA₃ por meio da técnica de HCA, confirmando os resultados obtidos na PCA.

Nos resultados, os tratamentos se distinguiram em 4 grupos, sendo um grupo composto pelas plantas variantes em fase de aclimação que receberam aplicações de ácido giberélico (GA₃), o segundo grupo das plantas normais em fase de aclimação que receberam GA₃, um terceiro grupo que correspondem as plantas variantes em fase de aclimação que não foram tratadas com GA₃ e o quarto grupo com as demais plantas. As bananeiras que receberam aplicação de GA₃ apresentaram-se bastante distante das demais, provavelmente pelo fato deste regulador de crescimento ter induzido a respostas atípicas dessas plantas neste período. É importante observar que as bananeiras variantes somaclonais em período de aclimação apresentam-se bastante próximas das plantas que receberam aplicação de GA₃ e diferem das demais bananeiras, inclusive das normais em período de aclimação. Este fato pode estar relacionado ao início do processo que as plantas variantes somaclonais sofrem durante o período de aclimação que reflete no crescimento exagerado dessas plantas quando são levadas para o campo. Em trabalhos anteriores, foi relatado que com um período de 3 meses em casa de vegetação, as plantas variantes somaclonais já começam a se diferenciar das normais em altura (Guimarães, 2005). É provável que a indução de genes que levam a essa diferenciação e a consequente produção de metabólitos responsáveis pela indução do crescimento sejam estimulados anteriormente ao período em que se pode distinguir visualmente tal

anormalidade. Desta maneira, acreditamos que no período entre dois a três meses de aclimatação esta resposta pode estar começando a receber o estímulo que levará a produção de compostos que podem ser distinguíveis nos espectros analisados e que levará posteriormente ao gigantismo.

No período de cultivo *in vitro* foi observada pouca ou nenhuma diferença entre o perfil de compostos das plantas normais e variantes somaclonais (Figura 4).

Na fase de cultivo em campo, as amostras não apresentaram diferenças significativas entre as bananeiras normais e variantes somaclonais (figura 4). Isto provavelmente ocorreu pelo fato de que as plantas utilizadas para coleta das amostras de folha já se encontravam em estágio adulto e com as dimensões definidas. Assim, as variantes já apresentavam fenótipo gigante estabelecido, ou seja, elas não cresceriam mais. É provável que os fatores que induziam ao crescimento exagerado das plantas variantes durante o seu desenvolvimento já haviam cessado e desta maneira o perfil destas plantas apresentava-se muito parecido com o das plantas normais e assim não foi possível visualizar diferenças no perfil de compostos entre estas plantas.

Muitos estudos têm realizado análises de perfis genéticos e moleculares para o estudo do gênero *Musa* (Kaemmer et al., 1992; Guimarães, 2005; Ge et al., 2005) e outros grupos de plantas. Desta maneira, as análises de espectrometria de massas representam mais uma importante ferramenta de estudo dos processos fisiológicos para a compreensão do metabolismo dos vegetais. Nesse sentido, análises mais aprofundadas dos compostos presentes em bananeiras 'Prata Anã' são necessários para melhor compreensão da variação somaclonal.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que nas fases de cultivo *in vitro* e campo não é possível detectar diferenças significativas nos perfis de compostos presentes nos extratos de bananeiras ‘Prata Anã’ normais e variantes somaclonais. No entanto, na fase de aclimação é possível separar as plantas variantes somaclonais das plantas normais. Esta diferença pode ser utilizada como marcador químico para detectar variantes somaclonais no período de aclimação antes do repasse das mudas para os produtores. Além disso, a aplicação de ácido giberélico levou a uma modificação no perfil de compostos tanto das plantas normais como das variantes sendo que estas diferenciaram entre si e entre as demais.

Não foi possível detectar giberelinas nos perfis. No entanto, acreditamos que estas moléculas estejam diretamente envolvidas nas variações de intensidade de certos compostos verificados nos extratos dessas bananeiras. Assim, são necessários estudos seqüenciais no entendimento das moléculas presentes em diferentes intensidades nos perfis além de outros estudos para o entendimento dos processos fisiológicos destes variantes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÁZAR, R. et al. Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. **The Plant Journal**, v.43, p.425-436, 2005.

BLAKE, P.S. et al. Identification and synthesis of GA₈₇, a gibberellin from *Prunus Avium*. **Phytochemistry**, v.32, n.4, p.781-784, 1993.

CARVALHO, J.A.B.S. et al. Uso da giberelina GA₃ na seleção do porte de bananeira das cultivares 'Prata' e 'Prata-anã'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.449-453, 2005.

CHRISTMANN, A.; DOUMAS, P. Detection and identification of gibberellins in needles of silver fir (*Abies alba* Mill.) by combined gas chromatography-mass spectrometry. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.91-99, 1998.

CHIWOCHA, S.D.S. et al. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. **The Plant Journal**, v.35, p.405-417, 2003.

CROKER, S.J. et al. Comparison of gibberellins in normal and slender barley seedlings. **Plant Physiology**, v.94, p.194-200, 1990.

DAMASCO, O.P. et al. Gibberellic acid detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.36, n.2, p.237-241, 1996.

FAO. **FAO statistical databases: Major food and agricultural commodities and producers:** Countries by commodity: Selected commodity: bananas. Roma, Italy. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ess/top/commodity>>. Acesso em: 09 set. 2006.

FUJIOKA, S. et al. Gibberellin A3 is biosynthesized from gibberellin A20 via gibberellin A5 in shoots of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, v.94, p.127-131, 1990.

GE, X.J. et al. Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP. **Molecular Ecology**, v.14, n.4, p.933-944, 2005.

GUIMARÃES, N.C.C. **Identificação de variantes somaclonais em bananeiras ‘prata anã’, utilizando técnicas moleculares e citogenéticas.** 2005. 51f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica)–Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HEDDEN, P.; KAMIYA, Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 48, p.431-460, 1997

HEDDEN, P.; PROEBSTING, W.M. Genetic Analysis of Gibberellin Biosynthesis. **Plant Physiology**, v.119, p.365-370, 1999.

HUANPU, M. et al. Metabolism of gibberellins A₁ and A₃ in fruits and shoots of *Prunus avium*. **Phytochemistry**, v.56, p.67-76, 2001.

LACERDA, G.A. **Características citogenéticas, moleculares e morfológicas de variantes somaclonais de bananeiras ‘prata-anã’ cultivadas *in vitro*.** 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)–Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Vale do Rio Verde de Três Corações.

KAEMMER, D. et al. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild-species and cultivars of banana (*musa spp*). **Bio-Technology**, v.10, n.9, p.1030-1035, 1992.

SANDOVAL, J.A.; CÔTE, F.; DOUMAS, P. Reconocimiento *in vitro* de variantes somaclonales de porte alto en banano (cv. ‘Gran enano, *Musa AAA*). Respuesta a un tratamiento con GA₃. **Corbana**, v.24, n.51, p.11-20, 1999.

SANTOS, M.C. **Utilização da espectroscopia na região do infravermelho (ftir) e quimiometria na identificação do café torrado e moído adulterado.** 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica)–Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.R.; BOLLAMMA, K.T. Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*). **In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant**, v.39, p.551–556, 2003.

SMITH, M.K. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. **Fruits**, v.43, n.4, p.219-223, p. 123-129, 1988.

SWAIN, S. M. SINGH, D. P. Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. **Trends in Plant Science**. v. 10, n. 3. 2005.

VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Field performance of conventional vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB group). **HortScience**. v. 31, n. 5, p. 862-865, 1996.

ANEXOS

TABELA 1A Análise de variância para a medida de altura de plantas do experimento 1 (capítulo 2)

TABELA 1B Análise de variância para a medida de altura de plantas do experimento 2 (capítulo 2)

TABELA 1C Análise de variância para a medida de altura de plantas do experimento 3 (capítulo 2)

TABELA 1D Análise dos Contraste entre os tratamentos: 1) PAc X PA_t, 2) PC_c X PC_t, 3) PA_t X PC_t, 4) PAc X PC_c, 5) PC_t X (PAc + PA_t + PC_c), sendo que: PAc (planta normal controle), PC_c (Planta variante controle), PA_t (planta normal tratada com GA₃), PC_t (planta variante tratadaGA₃). Experimento 3 (capítulo 2).

TABELA 1E Análise de variância para a medida de altura de plantas do experimento 4 (capítulo 2)

TABELA 1A Análise de variância para a medida da altura de plantas do experimento 1 (capítulo 2)

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
DOSE	4	20,287467	5,071867	0,617	0,6568
BLOCOS	4	128,555133	32,138783	3,909	0,0212
Erro 1	16	131,541867	8,221367		
DIAS	2	1478,997800	739,498900	181,567	0,0000
DOSE*DIAS	8	25,724533	3,215567	0,790	0,6123
Erro 2	265	1079,308500	4,072862		
Total	299	2864,415300	2864,415300		

CV 1 (%) = 22,59 CV 2 (%) = 15,90

Média geral: 12,69

Número de observações: 300

TABELA 1B Análise de variância para a medida da altura de plantas do experimento 2 (capítulo 2)

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
FREQ	2	432,863951	216,431975	13,336	0,0062
Erro 1	6	97,371852	16,228642		
TRAT	2	498,136543	249,068272	30,728	0,0000
FREQ*TRAT	4	47,753086	11,938272	1,473	0,2709
Erro 2	12	97,265926	8,105494		
DIAS	2	1870,200247	935,100123	153,419	0,0000
FREQ*DIAS	4	437,104938	109,276235	17,929	0,0000
TRAT*DIAS	4	307,221235	76,805309	12,601	0,0000
TRAT*FREQ*DIAS	8	86,691358	10,83642	1,778	0,1141
Erro 3	36	219,422222	6,095062		
Total	80	4094,031358			

CV 1 (%) = 29,27 CV 2 (%) = 20,69 CV 3 (%) = 17,94

Média geral: 13,76

Número de observações: 81

TABELA 1C Análise de variância para a medida da altura de plantas do experimento 3 (capítulo 2)

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
TRAT	3	2040,748910	680,249637	283,471	0,0000
Erro 1	48	545,500000	11,364583	4,736	0,0000
DIAS	2	1284,501667	642,250833	267,637	0,0000
TRAT*DIAS	6	1083,859359	180,643226	75,277	0,0000
Erro 2	96	230,372308	2,399712		
Total	155	5184,982244			

CV (%) = 11,62

Média geral: 13,33

Número de observações: 156

TABELA 1D Análise dos Contraste entre os tratamentos: 1) PAc X PAAt, 2) PCc X PCt, 3) PAAt X PCt, 4) PAc X PCc, 5) PCt X (PAc + PAAt + PCc), sendo que: PAc (planta normal controle), PCc (Planta variante controle), PAAt (planta normal tratada com GA₃), PCt (planta variante tratada com GA₃). Experimento 3 (capítulo 2).

Parâmetros	Contrastes dos tratamentos				
	PAc X PAAt	PCc X PCt	PAAt X PCt	PAc X PCc	PCt X (PAc+ PAAt+ PCc)
Estimativa	-3,446	-7,731	-6,205	-1,921	7,862
Variância	0,123	0,123	0,123	0,123	0,082
Erro	0,351	0,351	0,351	0,351	0,286
Pr>F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA 1E Análise de variância para a medida da altura de plantas do experimento 4 (capítulo 2)

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
DOSE	3	2043,714286	681,238095	31,042	0,0000
BLOCOS	6	238,534524	39,755754	1,812	0,1533
Erro 1	18	395,020714	21,945595		
DIAS	2	1208,162143	604,081071	188,087	0,0000
TRAT*DIAS	6	948,469286	158,078214	49,219	0,0000
Erro 2	48	154,161905	3,211706		
Total	83	4988,062857			

CV 1 (%) = 20,03 CV 2 (%) = 7,66

Média geral: 23,39

Número de observações: 84

le raizes

6

5

4

-