

RUTH GABRIELA ANCASI ESPEJO



**META-TOPOLINA E MODIFICAÇÕES NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO
COMO ALTERNATIVAS NA MICROPROPAGAÇÃO DE PLÁTANOS**
(*Musa paradisíaca* L.)

RIO BRANCO - AC

2020

RUTH GABRIELA ANCASI ESPEJO

***META-TOPOLINA E MODIFICAÇÕES NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO
COMO ALTERNATIVAS NA MICROPROPAGAÇÃO DE PLÁTANOS***
(Musa paradisiaca L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Produção Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Frederico H. da Silva Costa

RIO BRANCO - AC

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

A538m Ancasi Espejo, Ruth Gabriela, 1985 -

Meta-topolina e modificações nas condições de cultivo como alternativas na micropropagação de plátanos (*Musa paradisíaca* L.) / Ruth Gabriela Ancasi Espejo; orientador: Prof. Dr. Frederico H. da Silva Costa. -- 2020.

54 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Acre. Centro de Ciências Biológicas e da Natureza. Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Produção Vegetal. Rio Branco, Acre, 2020.

Inclui referências e apêndice.

1. Plátanos - cultivo 2. Plátanos - micropropagação 3. Citocininas 4. Carboidrato - suplementação exógena I. Costa, Frederico H. da Silva (orientador) II. Título

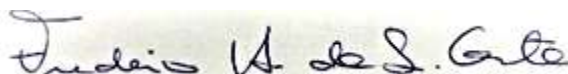
CDD: 338

RUTH GAGRIELA ANCASI ESPEJO

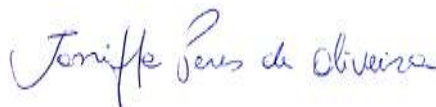
**META-TOPOLINA E MODIFICAÇÕES NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO
COMO ALTERNATIVAS NA MICROPROPAGAÇÃO DE PLÁTANOS**
(*Musa paradisiaca* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Produção Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.


BANCA EXAMINADORA



Dr. Frederico Henrique da Silva Costa
Universidade Federal do Acre



Dra. Janiffe Peres de Oliveira
Instituto Federal do Acre



Dra. Inaê Mariê de Araújo Silva Cardoso

RIO BRANCO - AC

2020

A Deus, por conceder-me a vida e suas bençãos. Ao meu esposo Edy Edwin Lopez Rojas, pelo respeito e companheirismo, minha eterna gratidão na concretização desse sonho. Aos meus pais Hermes e Gabina pelo apoio incondicional, e aos irmãos Hermanos David, Jhenny e Daniel.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Meus eternos agradecimentos às seguintes pessoas e instituições:

À Universidade Federal do Acre (Ufac) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pelo apoio à formação *Stricto Sensu*, como também aos professores pela dedicação e conhecimentos transmitidos durante o curso de mestrado.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia e Anatomia Vegetal da Ufac, pelo apoio, compreensão e conhecimentos compartilhados, ampliando e fortalecendo minha formação acadêmica.

Ao professor Dr. Frederico Henrique da Silva Costa pela parceria, paciência e orientação na pesquisa de dissertação, e principalmente pela oportunidade e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. Júlio Gabriel pela revisão textual e contribuições para a melhoria desse trabalho.

Aos amigos e colegas Jamayra Araújo, Camilla Pedrosa, João Bosco de Oliveira Júnior, Hendril da Silva Lopes e Gabriely de Paula Alves, por fazerem do ambiente de trabalho um lugar agradável e principalmente pelos nossos momentos de confraternização e cafezinhos da tarde.

RESUMO

A micropropagação é a estratégia biotecnológica de maior importância e aplicabilidade na multiplicação massal em larga escala e conservação de *Musacea*. Como consequência, inúmeros estudos são reportados na literatura com o objetivo de otimizar o processo morfogênético *in vitro* e obter plantas de melhor qualidade morfoanatômica e fisiológica. Nesse contexto, esta pesquisa teve por objetivo avaliar a eficiência de duas citocininas aromáticas, *Meta*-topolina (*mT*) e 6-Benzilaminopurina (BAP), e os efeitos advindos da suplementação exógena de carboidrato associada ao tipo de fechamento do recipiente na micropropagação de plátanos 'Vellaco' e 'Largo' (grupo AAB). Para tanto, dois experimentos foram realizados, o primeiro comparou cinco concentrações de BAP e *Meta*-topolina (0; 6,7; 11,1; 15,5 e 22,2 μM) sobre a indução e formação de brotações axilares. No experimento 2, foram avaliadas concentrações de sacarose (0; 15; 30 e 45 g L^{-1}) e dois sistemas de vedação dos frascos (MC: tecido de máscara cirúrgica tripla e TP: tampa de polipropileno) na regulação do crescimento e aspectos fisiológicos das plantas produzidas. De acordo com os resultados obtidos, houve efeito significativo dos fatores aplicados para ambos os experimentos. Para a multiplicação *in vitro* das variedades 'Velhaco' e 'Largo', a concentração de 11,1 μM de *Meta*-topolina promoveu maior formação de novas brotações e de gemas axilares, nos cinco subcultivos consecutivos. Na etapa de enraizamento e crescimento das brotações, a redução da concentração de sacarose para 15 g L^{-1} possibilitou maior número de folhas expandidas, altura e diâmetro do pseudocaule das plantas, independente do sistema de vedação do frasco. Por fim, plantas produzidas em frascos com tecido de máscara cirúrgica tripla (sistema de fechamento alternativo) tiveram maior teor de pigmentos e conteúdo relativo de água.

Palavras-chave: Plátanos. Citocininas. Trocas gasosas. Carboidrato.

ABSTRACT

Micropropagation is the biotechnological tool of greatest importance and applicability in the reproduction and conservation of Musacea. As a consequence, numerous studies are reported in the literature with the aim of improving the morphogenetic process *in vitro* and consequently obtaining plantlets of better structural and morphophysiological quality. In this context, this research aimed to evaluate the efficiency of two aromatic cytokinins, Meta-topolin (*mT*) and 6- Benzylaminopurine (BAP), as well changes in exogenous carbohydrate supplementation associated with increased gas exchange in the micropropagation of plantain 'Vellaco' and 'Largo' (group AAB). For this, two experiments were carried out, the first comparing five concentrations of BAP and *mT* (0, 6.7, 11.1, 15.5 and 22.2 μM) on the induction and formation of axillary shoots. In experiment 2, sucrose concentrations (0, 15, 30 and 45 g L^{-1}) and two bottle sealing systems (MC: triple surgical mask tissue and TN: polypropylene cap) were evaluated as factors for regulating the growth and physiological aspects of the plantlets produced. According to the results obtained, there was a significant effect of the factors applied for both experiments. For the *in vitro* multiplication of the varieties 'Velhaco' and 'Largo', the concentration of Meta-topolin 11.1 μM promoted greater formation of new shoots and axillary buds, in the five consecutive subcultures. In the stage of rooting and shoot growth, the reduction of the sucrose concentration to 15 g L^{-1} allowed a greater number of expanded leaves, height and pseudostem diameter of the plantlets, regardless of the bottle sealing system. Finally, plantlets grown in jars with triple surgical mask tissue (alternative system) showed higher levels of pigments and higher relative water content.

Keywords: Plantain. Cytokinins. Gas exchange. Carbohydrate.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	Plantas matrizes de plátano (<i>Musa paradisiaca</i> L.). ‘Velhaco’ (A) e ‘Largo’ (B), Rio Branco, Acre.....	21
Figura 2 -	Mudas convencionais tipo chifrão utilizadas para o estabelecimento <i>in vitro</i> . Plátano ‘Velhaco’ (A) e ‘Largo’ (B), Rio Branco, Acre.....	22
Figura 3 -	Propagação <i>in vitro</i> de plátano (<i>Musa paradisiaca</i> L.) evidenciando a formação de tecido de calo (A), brotos (B) e gemas (C).....	24
Figura 4 -	Sistemas de vedação avaliados para o cultivo <i>in vitro</i> de plátano (<i>Musa paradisiaca</i> L.). Tampa de Polipropileno modificada com tecido de máscara cirúrgica tripla (A) e Tampa de polipropileno (B).....	25
Figura 5 -	Aspecto geral das brotações e tecido de calo de plátanos propagados <i>in vitro</i> em função do tipo e concentração de citocinina, Rio Branco, Acre.....	28
Figura 6 -	Efeito das concentrações de BAP e Meta-topolina (<i>mT</i>) na formação de brotos, gemas e calos em plátano propagado <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre.....	31
Figura 7 -	Número de novos brotos formados em explantes de bananeiras sob a influência da concentração de citocinina, durante cinco subcultivos, Rio Branco, Acre	31
Figura 8 -	Número de calos formados em explantes de bananeira sob a influência da concentração de citocinina, durante cinco subcultivos, Rio Branco, Acre	32
Figura 9 -	Aspecto das plantas de bananeira, cultivares Vellaco e Largo, sob a influência da concentração de sacarose na etapa de enraizamento das brotações, Rio Branco, Acre.....	35
Figura 10-	Taxa de perda de vapor d’água nos frascos em função do sistema de vedação, durante 28 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Tampa de polipropileno (TP) e Tampa com tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), Rio Branco, Acre.....	35
Figura 11-	Conteúdo relativo de água (CRA) de plantas de bananeira, variedade Vellaco (A) e Largo (B), propagadas <i>in vitro</i> em função da concentração sacarose, Rio Branco, Acre.....	40

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do tipo de citocinina na formação de brotos, gemas e tecido de calo em duas variedades de plátano (Vellaco e Largo) propagadas <i>in vitro</i>	27
Tabela 2 - Efeito de concentrações de Meta-topolina (<i>mT</i>) e 6-Benzilaminopurina (BAP) na formação de brotos, gemas e tecido de calo em duas variedades de plátano (Vellaco e Largo) propagadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre.....	29
Tabela 3 - Efeito de concentrações de sacarose sobre o crescimento de brotações de bananeira cultivares Vellaco e Largo, na fase de enraizamento <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre.....	34
Tabela 4 - Concentração de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> , e carotenoide de plantas propagadas <i>in vitro</i> em função do sistema de vedação (MC: máscara cirúrgica e TP: Tampa de polipropileno), Rio Branco, Acre.	36
Tabela 5 - Concentração de clorofila <i>a</i> e carotenoide de plantas propagadas <i>in vitro</i> em função da concentração de sacarose, Rio Branco, Acre.....	38
Tabela 6 - Conteúdo relativo de água de plantas de bananeira, variedade Vellaco e Largo, propagadas <i>in vitro</i> em função do sistema de vedação dos frascos (MC: máscara cirúrgica e TP: Tampa de polipropileno), Rio Branco, Acre	39

LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE A - Quadrado médio (QM) do número de brotos, gemas e calo em explantes de bananeira, variedades Velhaco e Largo, propagados *in vitro* em função do tipo e concentração de citocinina (Experimento 1). Média de cinco subcultivos sucessivos 53
- APÊNDICE B - Quadrado médio (QM) do número de folhas expandidas (NFE), altura (ALT, cm) e diâmetro (DPC, mm) do pseudocaule de plantas de bananeira, variedades Velhaco, formadas *in vitro* a partir de brotações cultivadas em função do tipo de vedação do recipiente e concentração de sacarose (Experimento 2 – etapa de enraizamento/crescimento)..... 53
- APÊNDICE C - Resumo da análise de variância (Anova) para a taxa de perda de vapor d'água (PVDA) em função do sistema de vedação do recipiente, medida aos 30 dias de cultivo *in vitro* (Experimento 2) 54
- APÊNDICE D - Quadrado médio (QM) para conteúdo de clorofilas *a* e *b*, e de carotenoide (mg g^{-1} de massa fresca) em folhas de bananeira propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação do recipiente e concentração de sacarose (Experimento 2)..... 54
- APÊNDICE E - Quadrado médio (QM) para o conteúdo relativo de água (CRA) em folhas de bananeira propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e concentração de sacarose (Experimento 2)..... 54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 IMPORTÂNCIA SÓCIOECONÔMICA DE PLÁTANOS.....	13
2.2 PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL DE PLÁTANOS	13
2.3 MICROPROPAGAÇÃO DE <i>MUSACEAS</i>	14
2.4 REGULAÇÃO DA MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i> POR FITOREGULADORES...15	
2.4.1. Uso de 6-Benzilaminopurina (BAP).....	16
2.4.2 Topolinas.....	17
2.5 REGULAÇÃO DA MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i> PELA FONTE E CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATO	17
2.6 FOTOSSÍNTESE DE PLANTAS CULTIVAS <i>IN VITRO</i>	18
2.7 SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO HETEROTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E FOTOAUTOTRÓFICO	19
2.8 TIPO DE VEDAÇÃO DOS RECIPIENTES EM SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	21
3.2 ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE ÁPICES CAULINARES E CONDIÇÕES GERAIS DE CULTIVO	22
3.3 EXPERIMENTO 1: REGULAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS PLÁTANOS ‘VELLACO’ E ‘LARGO’ PELO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA	23
3.4 EXPERIMENTO 2: EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SISTEMA DE VEDAÇÃO DOS FRASCOS SOBRE O CRESCIMENTO E FISIOLOGIA <i>IN VITRO</i> DOS PLÁTANOS ‘VELLACO’ E ‘LARGO’	24
3.4.1 Taxa de perda de vapor d’água	25
3.4.2 Conteúdo relativo de água (CRA) em tecido foliar.....	25
3.4.3 Determinação dos teores de pigmentos	26
3.4.4 Características de crescimento.....	26
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

4.1 EXPERIMENTO 1: REGULAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DOS PLÁTANOS 'VELLACO' E 'LARGO' PELO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA	27
4.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SISTEMA DE VEDAÇÃO DOS FRASCOS SOBRE O CRESCIMENTO E FISIOLOGIA IN VITRO DOS PLÁTANOS 'VELLACO' E 'LARGO'	33
5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICES.....	52

1 INTRODUÇÃO

Os plátanos (grupo genômico AAB), com origem na Melanésia Ocidental e sudeste da Ásia (PERRIERA et al., 2011; LI et al., 2013; ISRAELI; LAHAV, 2017), possuem importância socioeconômica e cultural em diversas outras regiões. Os frutos contêm elevado nível calórico, são ricos em fibras, carboidratos, vitaminas e potássio. Além disso, são versáteis e consumidos cozidos ou fritos, utilizados no preparo culinário e obtenção de biomassa verde. Por essas razões, constituem a dieta alimentar em países do Sudeste da Ásia, Oceania, Norte da América do Sul e África.

A produção mundial de plátanos é de 116 milhões toneladas de frutos, com destaque para Índia, China, Filipinas, Brasil e Equador (FAO, 2019). O Brasil é o quarto maior produtor de bananas e plátanos, com 6,787.155 milhões de toneladas (IBGE, 2020), e os principais estados produtores incluem São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Santa Catarina e Pará. No estado do Acre, o cultivo de bananas e plátanos é uma atividade agrícola importante, com produção de 106.268 toneladas (IBGE, 2018).

Apesar da importância e expansão do cultivo e consumo de bananas e plátanos, os sistemas de produção necessitam do desenvolvimento e aprimoramento tecnológico, principalmente para evitar ou mitigar os danos causados por pragas e doenças. Nesse contexto, a utilização de mudas certificadas garante maior uniformidade no crescimento das plantas e estabelecimento do bananal.

Em geral, o estabelecimento e renovação de bananais são feitos com a utilização de mudas obtidas a partir de métodos tradicionais. Esses métodos utilizam mudas formadas pelo desenvolvimento de gemas axilares pré-existentes no rizoma. Todavia, essas mudas diferem quanto ao estágio de desenvolvimento: tipo chifão, chifre e chifrinho. Além dessas, é possível obter plantas a partir do fracionamento do rizoma, e mais raramente por sementes, de uso específico em programas de melhoramento genético. Embora bem difundido e utilizado por pequenos e médios produtores, a multiplicação por metodologias convencionais é um processo lento e que permite a disseminação de doenças e pragas de importância econômica.

Acrescenta-se, ainda, que as mudas produzidas de forma convencional têm baixa qualidade fitossanitária e acarretam heterogeneidade na formação do bananal, além de reduzir a produção e elevar os custos decorrentes das perdas e reposição de

mudas (POLTRONIERI et al., 2009). Para além disso, os plátanos são particularmente susceptíveis ao gorgulho negro (*Cosmopolites sordidus*) considerada a praga de maior importância econômica, além do ataque da broca do rizoma (*Cosmopolites sordidus*), transmitidos pelo uso de material propagativo inadequado (BORGES et al., 2002).

Sendo assim, o aprimoramento de técnicas biotecnológicas é a principal estratégia para superar as limitações impostas pela propagação convencional de bananas e plátanos. Isso porque a biotecnologia, mais especificamente a micropropagação, possibilita a produção de mudas com certificação genética e fitossanitária, além de ser um processo sem sazonalidade e muito utilizado em larga escala por biofábricas (produção industrial de plantas).

Semelhante a outras culturas agrícolas, a propagação *in vitro* é de importância e aplicabilidade reconhecidas na reprodução e conservação de bananeiras, um mercado considerado consolidado em diversas regiões do Brasil e de outros países (CARVALHO et al., 2014). Portanto, é a alternativa empregada para controle e prevenção de disseminação de pragas e doenças (MAFIA et al., 2012; ZUZARTE et al., 2010; REIS et al., 2009). Como consequência, inúmeros estudos são reportados na literatura com o objetivo de melhorar a eficiência do processo morfogênico *in vitro* e por conseguinte obter plantas de melhor qualidade morfoanatômica e fisiológica.

Para a micropropagação de bananeiras, a citocinina mais utilizada ainda é o 6-Benzilaminopurina (BAP) e poucas pesquisas avaliam os efeitos de moléculas alternativas. Além do mais, a redução dos níveis exógenos de carboidrato, quando associado a sistemas *in vitro* que aumentem as trocas gasosas, é uma estratégia interessante e comprovada visando mitigar os efeitos negativos observados na fisiologia e bioquímica de plantas micropropagadas.

Nesse contexto, esta pesquisa teve por objetivo avaliar a eficiência de duas citocininas aromáticas, *Meta*-topolina (*mT*) e BAP, bem como estudar os efeitos da alteração na concentração de sacarose associado ao tipo de vedação dos frascos no cultivo *in vitro* de plátanos 'velhaco' e 'Largo' (grupo AAB). A *mT* [*N* 6-(3-hidroxibenzilmino) purina] foi escolhida por ser um análogo de benziladenina e uma citocinina de alta atividade. Já as modificações propostas no cultivo *in vitro* visam propor um sistema mixotrófico. Até a presente data, não existem estudos avaliando esses fatores na regulação do processo morfogênico *in vitro* para as variedades de plátanos utilizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA SÓCIOECONÔMICA DE PLÁTANOS

Os plátanos pertencem ao grupo de plantas herbáceas conhecidas como monocotiledônea, da família *Musaceae* e com origem no Sudeste Asiático (CORPOICA, 2006). São mundialmente reconhecidos por sua importância alimentar, econômica e sociocultural, e considerados o quarto produto alimentício devido ao seu alto teor de carboidratos, proteínas, vitaminas A, B, C e minerais (AQUIL et al., 2012). Além disso, os frutos são versáteis e consumidos globalmente, na forma cozida, frita ou assada (BORGES et al., 2004), bem como em receitas culinárias.

Amplamente cultivados nas regiões tropicais do mundo, os plátanos estão presentes em 120 países tropicais de cinco continentes (BAKRY et al., 2009). Segundo dados da FAO (2019), o maior produtor de banana e plátano é a Índia com 29 milhões de toneladas por ano, seguido da China com 11 milhões de toneladas, Filipinas (7,5 milhões de toneladas) e do Equador e Brasil com 7 milhões toneladas.

2.2 PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL DE PLÁTANOS

Bananas e plátanos podem ser reproduzidos por sementes (no caso de espécies diploides e cruzamentos controlados), ou vegetativamente, utilizando rebentos (brotações) desenvolvidos a partir de gemas axilares presentes no rizoma, as quais resultam em mudas do tipo chifrão, chifre e chifrinho. Além disso, também é utilizado o método de fracionamento do rizoma (SOUZA et al., 2006).

Apesar de utilizado, o método tradicional rende de 5 a 10 mudas por planta por ano, mesmo utilizando material de ótima qualidade. Sendo assim, é considerado um processo lento e de baixo rendimento que, dependendo das condições de cultivo, favorece a disseminação de doenças como o Mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense*), Moko (*Ralstonia solanacearum*), Sigatoka-negra, nematoides (*Radopholussimilis*, *Helicotylenchusmulticinctus*, *Pratylenchuscoffeae* *Meloidogynespp.*) (SOUZA et al., 2010) e a broca-do-rizoma (PEREIRA et al., 2005).

Para além disso, a multiplicação e uso de mudas obtidas por metodologias convencionais acarretam desuniformidade do bananal e conseqüentemente na produção

e, em alguns casos, necessidade de reposição da muda morta ou não desenvolvida. Como consequência, há aumento nos custos de produção e falhas no estabelecimento do bananal. Como alternativa, técnicas biotecnológicas são adotadas visando melhorias qualitativas e quantitativas no sistema de produção de bananas e plátanos, sobretudo a prevenção ou mitigação dos danos causados por pragas e doenças.

A estratégia mais utilizada em musáceas é a micropropagação, com impactos fitossanitários e econômicos reconhecidos. Essa alternativa permite a produção de mudas clonais em larga escala, com certificação genética e fitossanitária, sem sazonalidade (SÁ; BRAGA, 2002, ALVES et al., 2004).

2.3 MICROPROPAGAÇÃO DE *MUSACEA*

A propagação *in vitro* é a técnica biotecnológica com maior aplicabilidade e importância visando a reprodução e conservação de bananas e plátanos. Consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais sob condições assépticas, meio nutritivo e fatores ambientais controlados (OLMOS et al., 2010). Essa ferramenta permite a obtenção não sazonal de elevado número de plantas, com certificação genética e fitossanitária, portanto, com alto potencial econômico e científico (CARVALHO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011; PIATTI et al., 2011).

Como consequência, plantas micropropagadas são utilizadas no controle e prevenção de disseminação de pragas e doenças (MAFIA et al., 2012; ZUZARTE et al., 2010; REIS et al., 2009), acarretando várias vantagens ao sistema de produção. As principais etapas do processo de micropropagação são: (I) Seleção e desinfestação do explante; (II) Introdução *in vitro* em meio nutritivo sob condições assépticas (etapa de estabelecimento); (III) Subcultivos sucessivos para multiplicação de material vegetal estabelecido; (IV) Enraizamento e crescimento das brotações; e (V) Pré-aclimatização (rustificação) e ou aclimatização *ex vitro*. Todavia, essas etapas são passíveis de modificações ou mesmo exclusão de alguma dessas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), conforme as peculiaridades de cada espécie ou objetivo proposto.

Dentre as fases supracitadas, o estabelecimento dos ápices caulinares *in vitro* é uma das mais críticas, em função da ocorrência de contaminação por fungos e bactérias, como também pelo nível de oxidação dos tecidos excisados, caracterizado

pelo escurecimento do ápice caulinar ou até mesmo do meio de cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A oxidação limita, em parte, a taxa de multiplicação em algumas cultivares de bananeira (OLIVEIRA et al., 2001), principalmente genótipos diplóides AB e BB, e triplóides AAB como os plátanos. Além disso, o escurecimento das partes excisadas dos explantes acarreta obstrução do tecido oxidado e redução na taxa de absorção dos componentes do meio. Outro efeito ocasionado pela liberação desses compostos ao meio de cultivo consiste na alteração da composição nutricional (JHA; DAS, 2004; ALIYU, 2005).

Além da ocorrência de oxidação fenólica, outros fatores podem limitar o potencial regenerativo (morfogênese *in vitro*) durante as etapas da micropropagação de bananas e plátanos. Os principais estão associados ao tipo e concentração de reguladores de crescimento, que alteram a taxa de emissão de novas brotações e sua qualidade fisiológica, bem como o ambiente de cultivo. Nesse caso, moléculas com maior atividade, a exemplo da *Meta-topololina (mT)*, são avaliadas em diversas outras espécies de importância econômica (SOUZA et al., 2019), incluindo bananeiras (ESCALONA et al., 2003; AREMUN et al., 2012).

Para além disso, propor alterações na concentração exógena de carboidratos, associado ao aumento das trocas gasosas com sistemas alternativos de vedação dos recipientes, são estratégias promissoras visando melhoria da qualidade das plantas produzidas.

2.4 REGULAÇÃO DA MORFOGÊNESE *IN VITRO* POR FITORREGULADORES

Reguladores de crescimento são essenciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal *in vivo* e *in vitro*. Isso porque, essas moléculas, que são sintetizadas pelas plantas e/ou comercializadas, funcionam como inibidores ou estimuladores de processos fisiológicos vitais. Dessa maneira, visando potencializar os efeitos morfogenéticos esperados, basicamente toda intervenção no processo de propagação *in vitro* depende da suplementação exógena com algum fitorregulador vegetal.

Uma ampla variedade de classes de substâncias fitorreguladoras estão disponíveis, incluindo compostos aromáticos com atividade de citocinina, os quais promovem a divisão celular e melhorias nos processos de micropropagação de

plantas (AREMUN, et al. 2012; AHMAD; STRNAD, 2021). As citocininas mais comuns e empregadas no cultivo *in vitro* são derivadas da adenina, dentre as quais se destacam: BA (6-Benziladenina), Cinetina (6-furfurilaminopurina), Zea (zeatina) e 2-iP (N-isopentenil adenina) (SEDICI, 2017).

Essa classe de fitorreguladores é indispensável para a quebra da dominância apical e está relacionada com a diferenciação celular, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares, das quais surgirão novos brotos (MACHADO et al., 2011). Nesse contexto, o tipo e a concentração de citocinina é um fator determinante em etapas como a multiplicação (CSABAI et al., 2011). O aumento de citocininas desencadeia e regula vários eventos que levam a maior atividade celular dos meristemas, aumentando a taxa de divisão celular que dá origem à regeneração de novos pontos meristemáticos (MÜLLER; LEYSER, 2011)

2.4.1. Uso de 6-Benzilaminopurina (BAP)

Entre as citocininas aromáticas, o BAP é a mais utilizada devido à sua efetividade e acessibilidade (BAIRU et al., 2007), sendo importante na regulação do crescimento axilar, botões adventícios e foliares (BUAH et al., 2010). Para o cultivo *in vitro* de bananeiras, a indução e formação de brotações está associada ao uso de citoninas como o BAP, no entanto, a suplementação do meio de cultura com altas concentrações desse fitorregulador pode causar variação somaclonal e inviabilizar o processo de produção de mudas (BAIRUS et al., 2008).

De acordo com Cedeño et al. (2016) as prováveis características de anormalidade encontradas nas plantas micropropagadas devem-se à alta concentração de BAP. Dessa forma, pode haver a existência de brotos ou plantas com hiperhidricidade, necroses, formação de tecidos de calo, reduzida qualidade das brotações formadas, bem como ocorrência de folhas amareladas, retorcidas e lanceoladas. Dessa forma, é preponderante avaliar as concentrações de BAP durante o estabelecimento de protocolos a cada grupo genômico de bananeira, como também avaliar outras citocininas como alternativa (AREMUN et al., 2012).

2.4.2 Topolinas

Topolinas são compostos aromáticos naturais utilizados em protocolos de micropropagação como alternativa a outras citocininas. Entre as topolinas, a meta-topolina (*mT*) [6-(3-hydroxybenzylamino)purine] é a mais conhecida e que tem efeitos positivos, com várias vantagens na micropropagação de espécies vegetais, lenhosas e herbáceas. Vários são os estudos corroborando o melhor efeito da *mT* na propagação *in vitro*, não apenas na indução de novas brotações, como também na promoção de melhorias pela redução de desordens morfofisiológicas, melhor taxa de enraizamento e aclimatização das plantas micropropagadas (AHMAD; STRNAD, 2021).

Ao avaliar a *mT* na micropropagação de duas cultivares de bananeira, Bairu et al. (2008) observaram maior taxa de multiplicação e maior número de brotos com 7,5; 15 e 30 μM de *mT* comparado aos tratamentos com BAP. Além disso, esses autores constataram que a meta-topolina promoveu redução do aparecimento de anormalidades comumente verificadas no cultivo *in vitro* das cultivares estudadas. A eficiência no uso de *mT* também é reportada em outras pesquisas com musáceas (ALDERBERG, 2012; ESCALONA et al., 2003).

2.5 REGULAÇÃO DA MORFOGÊNESE *IN VITRO* PELA FONTE E CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATO

As células, tecidos e plantas completas cultivados *in vitro* geralmente possuem limitações quanto à capacidade autotrófica, comportando-se como sistemas biológicos heterotróficos. Sendo assim, a suplementação do meio requer a adição de carboidratos exógenos, que na maioria das vezes é suprido pela sacarose.

A sacarose é o açúcar utilizado universalmente, embora também sejam comumente usados glicose, maltose, rafinose, frutose ou galactose, entre outros (SEGRETÍN, 2006). Dessa maneira, Leifert et al. (1995) destacam que devido à baixa capacidade fotossintética das plantas cultivadas *in vitro*, essas requerem a adição de carboidratos para suprir suas necessidades metabólicas, seja participando da geração de energia ou como fonte de esqueletos carbônicos para vários processos biossintéticos como o crescimento e diferenciação celular (NICOLOSO et al., 2003).

Como fonte de carbono, os carboidratos fornecem energia e esqueletos de carbonos para a biossíntese de compostos orgânicos essenciais ao crescimento celular, além do papel na regulação do potencial osmótico do meio de cultura (SEVCÍKOVÁ et al., 2018). As concentrações de 2 a 4% (p / v) são as mais utilizadas nos meios de cultura. Abaixo de 2% pode aparecer clorose e acima de 4% podem ocorrer problemas decorrentes de alterações no potencial osmótico do meio nutritivo, o que favorece a degradação do tecido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Segundo George (1993), a presença de sacarose no meio de cultura inibe a formação de clorofila e, conseqüentemente, a fotossíntese, prejudicando o crescimento autotrófico. Por sua vez, Debergh (1991) salienta que a redução ou até mesmo a eliminação da sacarose do meio de enraizamento devem ser utilizadas com a finalidade de facilitar a passagem das plantas para o estágio autotrófico, ainda em condições *in vitro* ou durante a etapa de transplante para a fase de aclimatização.

Desse modo, modificações no suprimento exógeno de sacarose, sobretudo nas etapas que antecedem ao plantio *ex vitro*, podem acarretar uma melhor condição autotrófica. Isso é interessante, uma vez que culturas autotróficas geralmente apresentam folhas persistentes que perduram por mais tempo e são mais produtivas no novo ambiente *ex vitro* (GROUT; MILLAM, 1985). Nesse contexto, Zobayed et al. (2001) indicam o aumento da intensidade luminosa na sala de incubação e redução ou eliminação da fonte de açúcar no meio de cultura na fase de enraizamento. De acordo com os autores, essas alterações estimulam mudanças significativas na taxa fotossintética das plantas.

2.6 FOTOSÍNTESE DE PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO*

A fotossíntese é um processo complexo altamente regulado no qual a energia solar (ou energia luminosa) é capturada pelas clorofilas, e por meio da cadeia de transporte de elétrons e reações enzimáticas ocorre a formação de ATP e NADPH essenciais para assimilação de CO₂ e síntese de carboidratos como a sacarose e amido. Dessa forma, constitui o processo fisiológico indispensável ao crescimento e desenvolvimento vegetal.

Sob condições de cultivo *in vitro*, a atividade fotossintética das plantas é limitada e de baixa eficiência, principalmente devido a reduzida qualidade e

intensidade luminosa, baixa concentração de CO₂ no recipiente de cultivo e presença de elevadas concentrações de carboidratos exógenos no meio de cultura que é, em geral, a única ou principal fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (DEC CETTI et al., 2008).

A alta umidade relativa no interior dos frascos de cultivo e a ineficiência dos sistemas de iluminação comumente utilizados nos laboratórios são os principais fatores envolvidos com a desorganização dos tecidos, baixo funcionamento dos estômatos e a fina camada de cera epicuticular observados em plantas micropropagadas. Tais características acarretam reduzida regulação estomática e controle da perda de água, principalmente na etapa de plantio sob condições *ex vitro* (ambiente natural), com aumento da demanda evaporativa da atmosfera (ALBANY et al., 2005; DEC CETTI et al., 2008; SILVA, et al., 2008).

2.7 SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO HETEROTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E FOTOAUTOTRÓFICO.

Convencionalmente, as plantas cultivadas *in vitro* são biologicamente heterotróficas e possuem baixa taxa fotossintética líquida. Isso porque, os sistemas convencionais de micropropagação possuem alta umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo, o meio de cultura contém altas concentrações de carboidratos e a qualidade dos sistemas de iluminação são pouco eficazes (SHIN et al., 2013).

Além do mais, o tipo de vedação dos frascos permite uma baixa troca gasosa, o que acarreta acúmulo de gases no interior dos recipientes, a exemplo do etileno. Tal condição de cultivo ocasiona alterações morfofisiológicas e anatômicas, como o funcionamento irregular de estômatos, baixa taxa de crescimento, ocorrência de hiperhidricidade, folhas pouco estruturadas anatomicamente, morte prematura de explantes, dificuldades no enraizamento, entre outras (KOZAI & KUBOTA, 2001).

No sistema mixotrófico, há aumento das trocas gasosas entre o ambiente dos frascos de cultura e a atmosfera externa ao ambiente *in vitro* (SEVCÍKOVÁ et al., 2018). Nesse sistema, a vedação dos recipientes é feita de várias maneiras como, membranas de transpiração que permitam trocas gasosas sem a entrada de microorganismos, bem como uso de tampas com sistemas alternativos de fechamento. Dessa forma, ocorre melhorias na regulação estomática, na transpiração e tecidos fotossintéticos.

Para compensar a reduzida capacidade fotossintética observadas no sistema tradicional de cultivo *in vitro*, Kozai propôs em 1991, a micropropagação fotoautotrófica, na qual os explantes são cultivados em meio desprovido de carboidrato exógeno, sob condições de alta densidade de fluxo de fótons fotossintéticos e ambiente enriquecido com CO₂. Todavia, para algumas situações esse sistema apresenta elevados custos de produção, portanto, deve ser avaliado em função do objetivo proposto e espécie em questão.

2.8 TIPO DE VEDAÇÃO DOS RECIPIENTES EM SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*

Os sistemas de vedação que permitem maiores trocas gasosas, pela abertura parcial dos tubos, favorecem o crescimento e desenvolvimento vegetal (IAREMA et al., 2012), reduzindo a umidade relativa, impedindo o acúmulo de gases e aumentando a concentração de CO₂ no interior dos frascos. Sob essas condições, há melhorias na expansão das folhas, aumento da atividade fotossintética e prevenção de distúrbios morfofisiológicos (PINHEIRO et al., 2013; GAO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2012). Além disso, é observado aumento do fluxo transpiratório e a probabilidade de maior sobrevivência das plantas na fase de aclimatização, pois melhoram o controle transpiratório (NEPOMUCENO et al., 2009).

Os tipos de vedações mais empregados abrangem desde papel de alumínio, tampa de aço inoxidável, tampa de polipropileno, tampões de algodão, de espuma de poliuretano, filme PVC (policloreto de vinil), entre outros (SALDANHA, et al., 2012; RIBEIRO, et al., 2007). No caso da utilização de materiais com maior porosidade, mediante membranas sintéticas importadas ou alternativas mais simples, como materiais oriundos de máscara cirúrgica, promovem trocas gasosas com maior absorção de CO₂ externo, aumentando a atividade fotossintética e gerando condições que podem favorecer o fotoautotrofismo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre. Foram utilizadas duas variedades pertencentes à espécie *Musa paradisiaca*, 'Velhaco' e 'Largo', popularmente conhecidas como plátanos.

Foram conduzidos dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), o primeiro na etapa de multiplicação *in vitro* (indução e formação de novas brotações) e o segundo na fase de enraizamento e crescimento das brotações (formação de plantas).

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico consistiu de mudas tipo chifrão coletadas de plantas matrizes cultivadas no Centro de Investigação de Novas Tecnologias da Amazônia (CINTA) da Universidade Amazônica de Pando (UAP) Porvenir-Bolívia (Figura 1).

Figura 1 - Plantas matrizes de plátano (*Musa paradisiaca* L.). 'Velhaco' (A) e 'Largo' (B), Rio Branco, Acre.



As plantas matrizes selecionadas apresentavam boa qualidade de produção e aparentemente saudáveis (livre de sintomas de doenças), colhendo os rebentos (mudas) medindo de 20 a 30 cm de comprimento do pseudocaule e rizoma com 15 a 10 cm de diâmetro (figura 2), os quais foram posteriormente conduzidos até o laboratório para estabelecimento dos ápices caulinares *in vitro*.

Figura 2 - Mudanças convencionais tipo chifrão utilizadas para o estabelecimento *in vitro*. Plátano Velhaco (A) e Largo (B), Rio Branco, Acre.



3.2 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES E CONDIÇÕES GERAIS DE CULTIVO

Depois de coletados em campo, as mudas foram levadas ao laboratório e submetidas ao processo de desinfestação pela imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% (v/v) por 12 horas, seguida com álcool a 70% (v/v) por 30 segundos e hipoclorito de sódio (NaClO) a 5% (v/v), sendo essa solução acrescida de duas gotas de Tween 80, onde o material permaneceu por 15 minutos. Imediatamente após, o material vegetal (pseudocaule e rizoma) teve o tamanho reduzido para 3 cm, e então transferido para câmara de fluxo laminar. Nessa condição asséptica, o material foi imerso em hipoclorito de sódio (NaClO) a 3,5% (v/v), por 5 minutos, após mantidos em solução aquosa contendo 30 mg L⁻¹ de cisteína, por 10 segundos.

Concluído o processo de assepsia, o material vegetal foi novamente reduzido até o tamanho aproximado de 1 cm de base e 1,5 cm de pseudocaule (ápice caulinar),

sendo imediatamente transferidos para os recipientes contendo meio de cultura. Foi utilizada a formulação de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescida de sacarose (30 g L^{-1}) e ácido ascórbico (150 mg L^{-1}), e gelificado com Phytigel™ (2 g L^{-1}). O pH foi ajustado para $5,7 \pm 1$. Os frascos utilizados consistiram em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) com 15 mL de meio. O processo de esterilização do meio de cultura foi por autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1,3 atm de pressão por 20 minutos.

Nos primeiros sete dias de cultivo *in vitro*, os ápices caulinares foram mantidos no escuro para minimizar possíveis problemas de oxidação, depois transferidos para 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 70%. Decorridos 35 dias do estabelecimento *in vitro*, foi avaliada a porcentagem de contaminação, observando a presença ou ausência de fungos ou bactérias pelo aspecto esbranquiçado e amarelado/alaranjado presente no meio de cultura e ao redor do explante (MÉNDEZ, 2014).

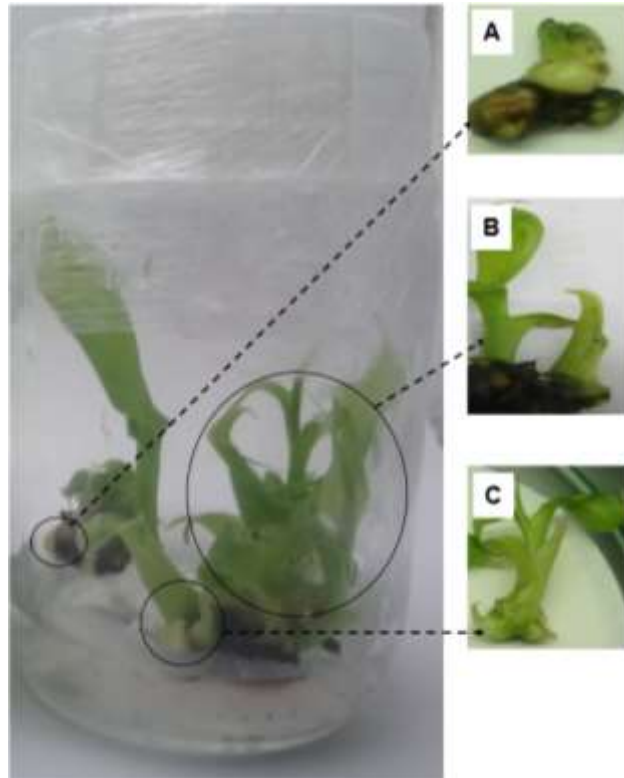
3.3 EXPERIMENTO 1: REGULAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DOS PLÁTANOS 'VELLACO' E 'LARGO' PELO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA

Com objetivo de avaliar a efetividade da citocinina meta-topolina como substituto ao BAP, foram testadas diferentes concentrações na indução e desenvolvimento de brotos axilares nas variedades 'Velhaco' e 'Largo', por cinco subcultivos sucessivos, 35 dias cada.

Os tratamentos, em esquema fatorial 2 x 5, foram representados por duas citocininas, BAP e meta-topolina, e cinco concentrações (0; 6,7; 11,1; 15,5 e $22,2 \mu\text{M}$), num total de dez tratamentos, com 10 repetições. A constituição de macro e micronutrientes, vitaminas e sacarose foi a mesma da fase de estabelecimento de ápices caulinares. Para o experimento, foram utilizados frascos tipo maionese com 40 mL de meio de cultivo. A esterilização do meio foi idêntica ao item 3.2.

Ao final de cada subcultivo, foram avaliados o número de brotações axilares, gemas e calos por explante, presença de oxidação, raiz e contaminação. Para avaliar o número de brotos, de gemas e calos verificou-se a quantidade de brotos regenerados por explantes de cada frasco (Figura 3).

Figura 3 - Propagação *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca* L.) evidenciando a formação de tecido de calo (A), brotos (B) e gemas (C).

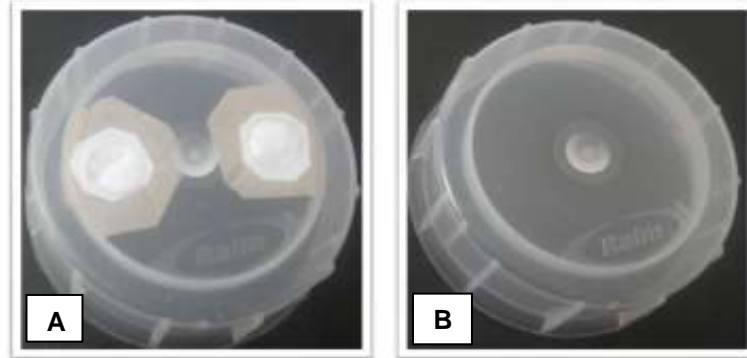


3.4 EXPERIMENTO 2: EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SISTEMA DE VEDAÇÃO DOS FRASCOS SOBRE O CRESCIMENTO E FISIOLÓGIA *IN VITRO* DE BROTAÇÕES DOS PLÁTANOS 'VELLACO' E 'LARGO'.

Para avaliar as concentrações de sacarose associada com o sistema de vedação dos frascos durante a fase de enraizamento, transferiu-se as brotações das cultivares Velhaco e Largo para meio de cultura MS suplementado com as seguintes concentrações de sacarose: 0, 15, 30 e 45 g L⁻¹.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 4, constituídos por dois sistemas de vedação dos frascos (MC: tecido de máscara cirúrgica tripla e tampa de polipropileno) (Figura 4), e quatro concentrações de sacarose, em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. As demais características do meio de cultura, bem como as condições da sala de cultivo, foram semelhantes às descritas no item 3.2.

Figura 4 - Sistemas de vedação avaliados para o cultivo *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Tampa de polipropileno modificada com tecido de máscara cirúrgica tripla (A) e Tampa de polipropileno (B).



O sistema de vedação alternativo proposto no presente estudo, foi constituído pela modificação da tampa de polipropileno comumente usada na micropropagação de plantas. Cada tampa teve adição de dois furos, com diâmetro de 1 cm, cobertos com tecido obtido de máscara cirúrgica tripla (MC), portanto com três camadas (Figura 4). O processo de autoclavaram seguiu item 3.2, e as tampas foram dispostas nos frascos sob condições de câmara de fluxo laminar.

Ao final do período de cultivo, de 30 dias, foram avaliadas variáveis para mensurar a perda de vapor d'água, bem como de crescimento e fisiológicas nas plantas produzidas.

3.4.1 Taxa de perda de vapor d'água

Para a avaliação de taxa de perda de vapor d'água utilizou-se o método gravimétrico. Para tal, foram pesados os frascos vedados com ambos os tipos de fechamento, tecido de máscara e tampa normal. Essa medição foi realizada durante os 30 dias, com ajuda de uma balança analítica (0,0001 g). Em ambos os tratamentos os frascos continham inicialmente 40 mL do meio cultura.

3.4.2 Conteúdo relativo de água (CRA) em tecido foliar

Para tanto, fragmentos da região mediana do limbo foliar foram retirados e pesados para obtenção da massa fresca (MF). Em seguida, esses fragmentos foram imersos em 20 mL de água de osmose reversa por 24 horas sob 4 °C e escuro. Após esse período, os fragmentos foram novamente pesados para obtenção da massa túrgida (MT). Depois, foram secos em estufa a 65 °C, com circulação de ar forçada,

até obtenção de massa constante, para aquisição da massa seca (MS). O CRA foi obtido utilizando a fórmula $CRA = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$ (CAIRO, 1995).

3.4.3 Determinação dos teores de pigmentos

Foram determinados os teores de clorofilas *a* e *b*, bem como de carotenóides. Para isso, foram retiradas amostras de 50 mg do terço mediado de folhas completamente expandidas. Em seguida, esses fragmentos foram picotados e inseridos em 5 mL de acetona 80 % (v/v), onde permaneceram por 48 horas no escuro sob refrigeração constante. As absorbâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas de 664 nm, 646 nm e 470 nm, e os teores de pigmentos fotossintetizantes (clorofilas *a* e *b*; e carotenóides), conforme Lichtenthaler (1987).

3.4.4 Características de crescimento

As variáveis respostas concernentes ao crescimento foram: número de folhas expandidas (NF), altura (cm) e diâmetro de pseudocaule (mm).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos às verificações da presença de dados discrepantes pelo teste de GRUBBS (1969), normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk (1965) e homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett (1937). Posteriormente, efetuou-se a análise de variância pelo teste F. E quando o valor F indicou existir diferença entre os tratamentos, realizou-se a comparação de suas médias pelo teste de Tukey (1949). Para os dados quantitativos foi realizada análise de regressão polinomial. As análises foram realizadas com a SAS University (SAS, 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1: REGULAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DOS PLÁTANOS 'VELLACO' E 'LARGO' PELO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA

De acordo com a análise de variância (Anova), apenas o tipo, ou a concentração de citocinina teve efeito significativo sobre as variáveis respostas avaliadas, com exceção do número de gemas/explante na variedade Vellaco, e do número de brotos/explante para 'Largo'. Não houve interação entre os fatores (tipo x concentração de citocinina) (Apêndice A).

Para ambas as variedades, Vellaco e Largo, a utilização de meta-topolina (*mT*) promoveu maior número de brotações/explante (média de 2,18 e 1,30 brotos) e menor formação de calo ($p < 0,01$) (Tabela 1), independente de qual subcultivo e concentração.

Tabela 1 - Efeito do tipo de citocinina na formação de brotos, gemas e tecido de calo em duas variedades de plátano (Vellaco e Largo) propagadas *in vitro*.

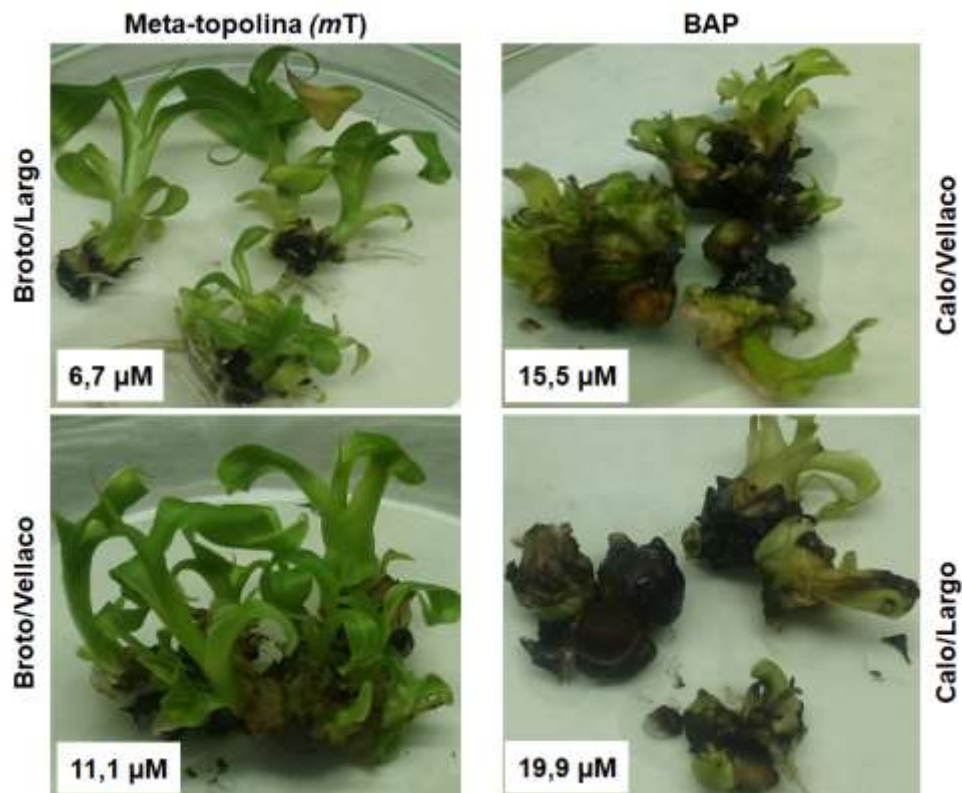
Citocinina	Velhaco		Largo	
	Broto	Calo	Gema	Calo
BAP	1,24 b	0,54 a	0,63 b	0,55 a
<i>mT</i>	2,18 a	0,15 b	1,30 a	0,12 b
CV (%)	17,98	27,49	29,15	26,11

Nota: BAP: 6- Benzilaminopurina; *mT*: *Meta*-topolina. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Além da qualidade das brotações formadas, a taxa de multiplicação/explante constitui o principal fator considerado para o aprimoramento e recomendação de um protocolo de micropropagação. Efeitos positivos da utilização de *mT* são reportados por Bairu et al. (2008), que observaram maior número de brotos para as cultivares de banana Willians (AAA) e Grande Naine (AAA), média de 5,3 brotos/explante comparado ao BAP (1,5 broto/explante inicial). De modo semelhante, Souza et al. (2019) tiveram maior formação e melhor qualidade morfofisiológica de brotos de *Oputia stricta* Haw quando utilizaram meta-topolina.

O aspecto geral da qualidade dos brotos e plantas obtidas no presente estudo está representado na Figura 5. Como pode ser observado, maior formação de calos ocorreu em explantes cultivados em meio de cultivo suplementado com BAP, em ambos cultivares (Figura 5).

Figura 5 - Aspecto geral das brotações e tecido de calo de plátanos propagados *in vitro* em função do tipo e concentração de citocinina. Rio Branco, Acre.



A alta atividade morfogênica *in vitro* atribuída ao uso de topolinas é reportada por Bairu et al. (2008) e Kamínek et al. (1987). Segundo esses autores, a meta-topolina é quase duas vezes mais eficaz que o BAP na indução e crescimento de brotos. A *Meta-topololina* é uma citocinina vantajosa durante a micropropagação e aclimação, em muitas espécies vegetais (WERBROUCK et al., 1996). Ainda, de acordo com Bairu et al. (2008), a topolina pode substituir o BAP na propagação de bananeiras *in vitro*.

Apesar da melhor eficiência com a utilização de *mT* e seus derivados, o BAP ainda representa a citocinina mais utilizada em protocolos de micropropagação vegetal, fato atribuído à sua eficácia e acessibilidade (Werbrouck et al., 1995; Rahman

et al., 2018). No entanto, algumas limitações são associadas ao uso desse fitorregulador (BAP), a exemplo de desordens morfofisiológicas como a ocorrência de hiperhidricidade, caracterizada pelo acúmulo anormal de água dentro das células ou tecidos, formando brotos e plantas com aparência translúcida (Vasconcelos et al., 2012). Dessa forma, a realização de pesquisas é fundamental para a consolidar as topolinas, sobretudo quanto aos aspectos econômicos.

Com relação ao efeito das concentrações de BAP e *mT*, foram observadas diferenças significativas para ambas as variedades de plátano ($p < 0,01$). Apenas o número de gemas na variedade Vellaco não diferiu em função das concentrações testadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito de concentrações de meta-topolina (*mT*) e 6- Benzilaminopurina (BAP) na formação de brotos, gemas e tecido de calo em duas variedades de plátano (Vellaco e Largo) propagadas *in vitro*, Rio Branco, Acre

Citocinina	Concentração (μM)	Variáveis respostas		
		Broto	Gema	Calo
'Vellaco'				
<i>mT</i>	0	0,7 c	-	0 c
	6,7	2,4 b	-	0,07 c
	11,1	3,5 a	-	0,08 c
	15,5	2,5 b	-	0,21 b
	19,9	2,1 b	-	0,41 a
BAP	0	0,3 c	0,1 b	0 c
	6,7	2,1 ab	1 a	0,1 b
	11,1	2,5 a	1,2 a	0,2 b
	15,5	1,9 ab	1 a	0,4 b
	19,9	1,7 b	1 a	0,6 a
'Largo'				
<i>mT</i>	0	0,29 c	0,04 b	0 c
	6,7	2,16 b	0,70 b	0,06 c
	11,1	3,31 a	1,58 a	0,07 c
	15,5	2,38 b	0,64 b	0,21 b
	19,9	1,78 b	0,53 b	0,6 a
BAP	0	0,15 c	0 c	0 b
	6,7	1,95 ab	0,8 a	0,3 b
	11,1	2,7 a	0,9 a	0,3 b
	15,5	1,79 b	0,6 b	0,7 b
	19,9	1,68 b	0,3 c	0,9 a

Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

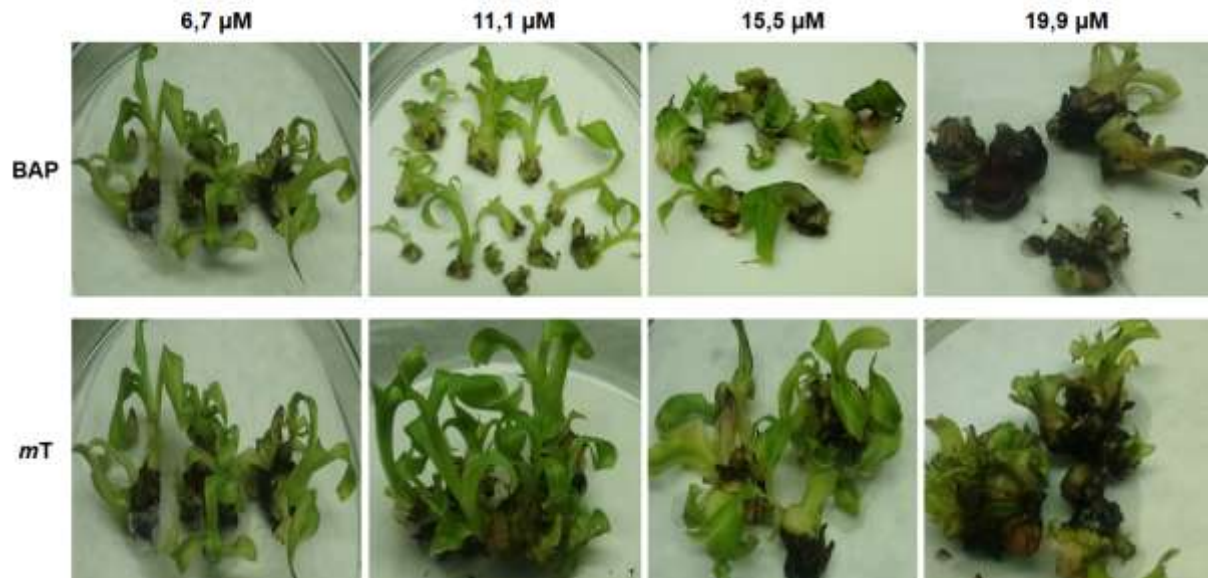
A concentração de 11,1 μM de *mT* promoveu maior número de brotos e reduziu a formação de tecidos de calo, em ambas as variedades Vellaco e Largo ($p < 0,01$), independente do subcultivo. Não houve diferença significativa para o número de gemas no genótipo Vellaco, apenas para Largo, com maior formação de gemas com 11,1 μM de meta-topolina. Para ambas as citocininas (*mT* e BAP), as concentrações de 15,5 μM e 19,9 μM causaram redução no número de novas brotações e gemas, além de aumentar a formação de calos (Tabela 2).

A regeneração de brotos durante a multiplicação por micropropagação é afetada pelas concentrações dos reguladores de crescimento aplicados, principalmente pelas citocininas, devido à sua importância na divisão celular e na organogênese (HOWELL et al., 2003). Werbrourck et al. (1996), usando concentrações equimolares de 10,0 μM de BAP e Meta-topolina (*mT*) no cultivo *in vitro* de *Spathiphyllum floribundum*, observaram aumento do número de brotações e raízes nos tratamentos com *mT*.

Entretanto, em estudos de micropropagação *in vitro* de bananeira utilizando a cv. Velhaco (AAB), se observou, maior número de brotos com concentrações de 11,1 μM BAP (PEREIRA et al., 2018). Outros autores indicam a concentração de 22,2 μM de BAP como mais adequada para as cultivares de bananeira Williams (VENKATACHALAM et al., 2007; BAIRU et al., 2008).

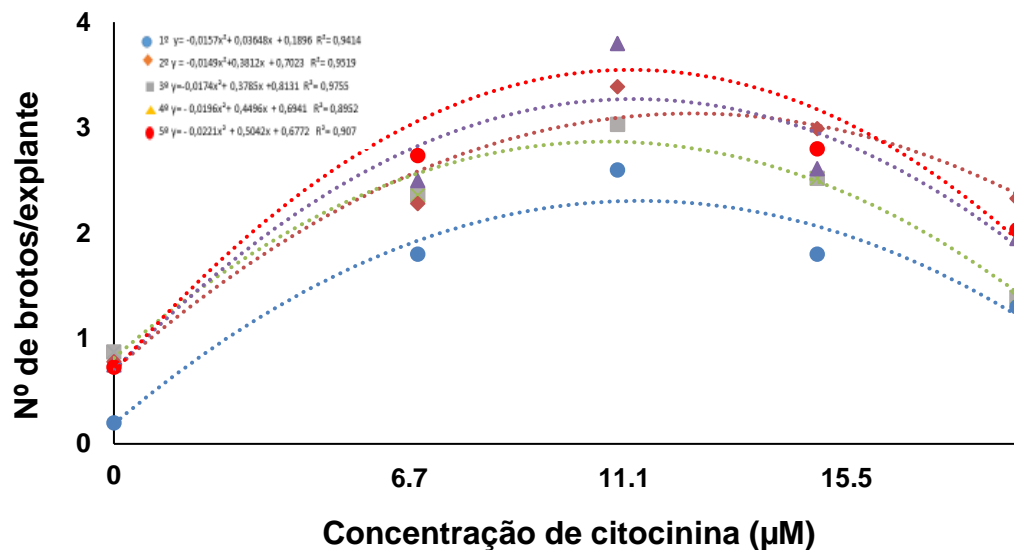
No presente estudo, a concentração de 11,1 μM de BAP e *mT* possibilitou o maior desenvolvimento de brotações e gemas para ambas as variedades (Velhaco e Largo). Já a concentração 19,9 μM , ocasionou maior formação de calos, tendo efeitos inibidores na regeneração de brotações e gemas, presentes na base desses pequenos grupos de estrutura globular (Figura 6E). Concentrações mais altas de citocininas geralmente inibem a formação de brotações (WONG, 1986; VUYLSTEKE, 1998). Na bananeira 'Williams', foi constatado que a concentração de 30,0 μM de BAP causa anormalidade (BAIRU et al., 2008). Nesse aspecto, existem numerosos relatos que mostram as diferenças do uso de altas concentrações de citocininas que produzem efeitos negativos na regeneração das plantas (MARTIN et al., 2006; SHIRANI et al., 2009).

Figura 6 - Efeito das concentrações de BAP e Meta-topolina (*mT*) na formação de brotos, gemas e calos em plátano propagado *in vitro*, Rio Branco, Acre.



Analisando o efeito do número de subcultivos na multiplicação de brotações por explante, observou-se incremento nessa variável à medida que o número de subculturas incrementa (Figura 7).

Figura 7 - Número de novos brotos formados em explantes de bananeiras sob a influência da concentração de citocinina, durante cinco subcultivos, Rio Branco, Acre

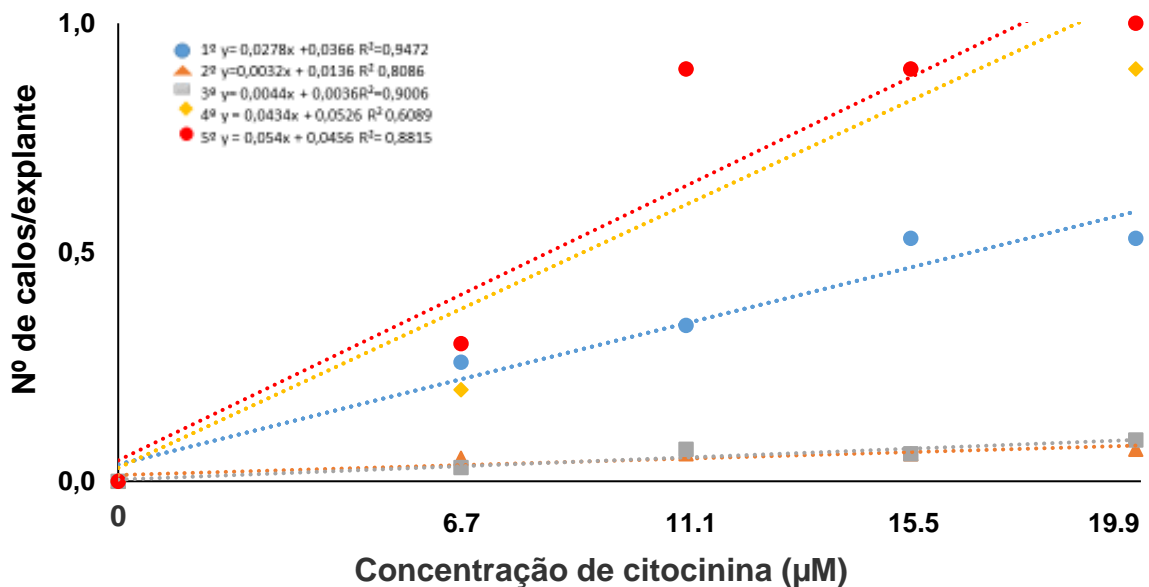


Pode-se observar que do primeiro ao quarto subcultivo o número de brotações/explante aumentou significativamente ocorrendo uma diminuição a partir do quinto subcultivo. Da mesma forma, a concentração de 11,1 μM , independentemente do tipo de citocinina, aumentou o número de brotações/explante durante os cinco subcultivos (Figura 7).

Estudo publicado por Lima e Moraes (2006) afirma que a maior taxa de multiplicação para cultivar FHIA 01 (AAAB) ocorreu com 4,0 mg L^{-1} de BAP, resultado observado até o quarto subcultivo. No presente estudo, a taxa de multiplicação tem uma redução na terceira e quinta subcultura, provavelmente devido ao acúmulo de citocininas que inibe a multiplicação. Segundo Banerjee et al. (1986), taxa de multiplicação mais baixa foi observada do terceiro ao sexto subcultivos.

Ao analisar o efeito do número de subcultivos na formação de calos durante a multiplicação, observa-se que à medida que as subculturas aumentam, a formação de calos / explante aumenta independentemente do tipo de citocinina (Figura 8). Pode-se observar na segunda e terceira subcultura a formação de calos, é a mesma, na primeira, quarta e quinta, aumenta estatisticamente. Da mesma forma, a concentração de 19,9 μM , independentemente do tipo de citocinina, aumenta o número de calos / explante durante as cinco subculturas.

Figura 8 - Número de calos formados em explantes de bananeiras sob a influência da concentração de citocinina, durante cinco subcultivos, Rio Branco, Acre



As altas concentrações de citocininas e regeneração de longo prazo, podem causar variações somaclonais. Assim Duncan (1997) afirma que em condições de cultivo *in vitro* a rápida multiplicação de um tecido afeta a estabilidade genética e aumenta as mutações, o que leva à variação somaclonal. Esse mesmo fenômeno também foi observado nas bananas (EL-DOUGDOUG *et al.*, 2007).

Na presente investigação, maior formação de calos foi obtida com a concentração de 19,9 μM na quarta e quinta subcultura. De acordo com Roux *et al.* (2001) maior formação de calos na cultivar 'Grande Naine' (AAA) foi observada na sexta subcultura e meio contendo 19,9 μM de 6-BAP.

4.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SISTEMA DE VEDAÇÃO DOS FRASCOS SOBRE O CRESCIMENTO E FISIOLOGIA *IN VITRO* DOS PLÁTANOS 'VELLACO' E 'LARGO'.

De acordo com a análise de variância (Anova), não houve efeito significativo da interação entre o sistema de vedação dos frascos e a concentração de sacarose, para todas as variáveis respostas e variedades de plátanos estudadas (Apêndices B, D e E). Também não foi verificado efeito significativo do sistema de vedação para as características de crescimento e conteúdo de clorofila *b*.

O sistema de vedação e a concentração de sacarose influenciaram de forma isolada apenas o conteúdo de clorofila *a* e de carotenoides, bem como o conteúdo relativo de água (CRA), para ambas as cultivares de plátano (Apêndice D e E). Apenas a concentração de sacarose influenciou as variáveis de crescimento ($p < 0,01$) (Apêndice B). A taxa de perda de vapor d'água foi influenciada pelo sistema de vedação ($p < 0,01$) (Apêndice C).

Maior crescimento das brotações foi observado em meio de cultura suplementado com 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. As menores médias para número de folhas, altura e diâmetro do pseudocaule foram constatadas na ausência de carboidrato, independente da cultivar avaliada (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito de concentrações de sacarose sobre o crescimento de brotações de bananeira cultivares Velhaco e Largo, na fase de enraizamento *in vitro*, Rio Branco, Acre

	Sacarose (g L ⁻¹)	Variáveis respostas		
		NFE	ALT (cm)	DPC (mm)
Velhaco	0	1,5 b	1,1 c	1,6 c
	15	4,1 a	5,1 a	5,1 a
	30	3,3 ab	4,8 b	4,2 b
	45	2,9 b	4,6 b	4,0 b
Largo	0	1,0 c	2,1 c	1,2 b
	15	3,5 a	4,6 a	4,0 a
	30	3,1 ab	4,1 ab	3,9 a
	45	2,2 b	3,7 b	1,3 b

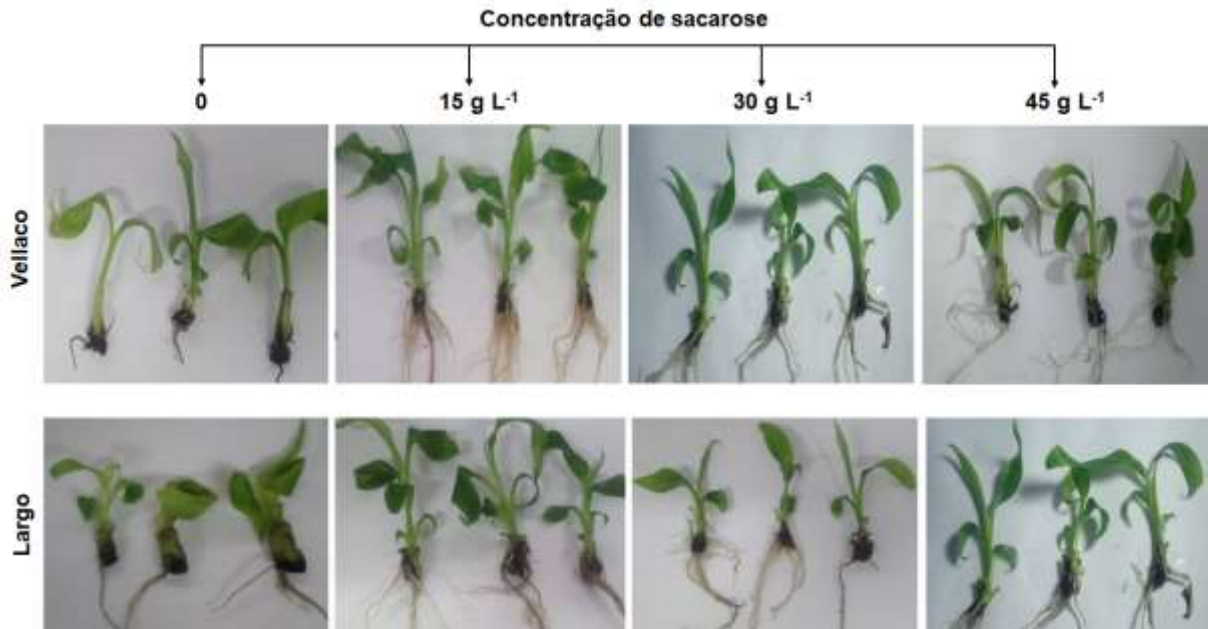
Nota: número de folhas expandidas (NFE), altura (cm) e diâmetro (DPC) do pseudocaule.

A sacarose é o carboidrato mais utilizado no cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, bem como para a micropropagação de bananeiras (HUSSEIN, 2012). Segundo Marchat et al. (2007), a suplementação do meio de cultura com 10 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹ de sacarose proporciona maior crescimento dos explantes na fase de enraizamento. Da mesma forma, Rocha et al. (2007) enfatizam que a utilização de 15 g L⁻¹ de sacarose e de luz natural favorecem o crescimento de bananeiras na etapa de enraizamento.

A sacarose é uma fonte de carboidrato e, em alguns casos, atua como agente osmótico e energético para sustentar processos metabólicos importantes ao crescimento dos tecidos vegetais (LIPAVSKA; KONRADOVA, 2004). Na cultura de tecidos, a concentração de sacarose varia de 1,5 % a 5 % (BRIDGEN, 1994). Já a alta concentração de sacarose afeta o crescimento, e pode causar estresse osmótico, promovendo a deterioração da cultura *in vitro*; enquanto baixas concentrações podem produzir clorose nas folhas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LEMES et al., 2016).

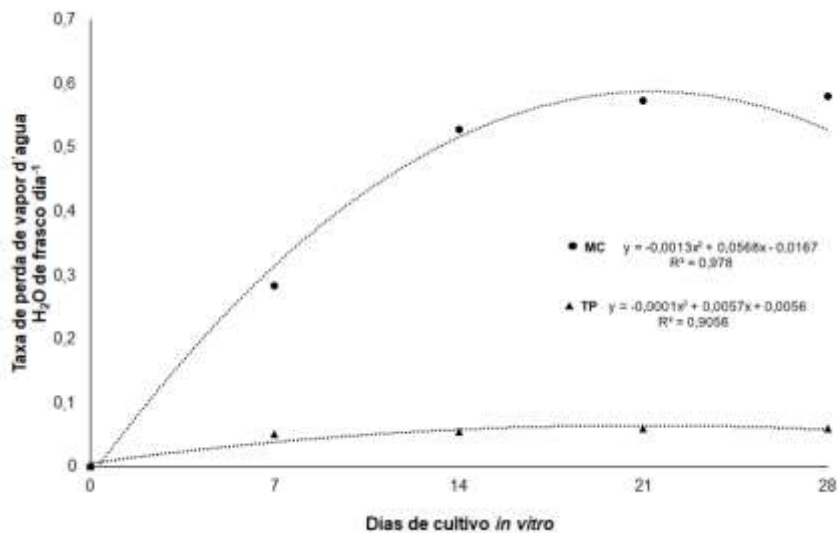
Na presente pesquisa, a redução da sacarose para 15 g L⁻¹ promoveu maior crescimento das brotações, sem comprometer a qualidade do sistema radicular (Figura 9) e a sobrevivência das plantas, corroborando outras pesquisas (FERNANDES et al., 2011; MALDANER et al., 2007).

Figura 9 – Aspecto das plantas de bananeira, cultivares Vellaco e Largo, sob a influência da concentração de sacarose na etapa de enraizamento das brotações, Rio Branco, Acre



Com relação à influência do tipo de vedação sobre a perda de vapor de água, houve diferença significativa entre os sistemas avaliados, observando-se comportamento quadrático em função do tempo de cultivo *in vitro* (Figura 10).

Figura 10 - Taxa de perda de vapor d'água nos frascos em função do sistema de vedação, durante 28 dias de cultivo *in vitro*. Tampa de polipropileno (TP) e Tampa com tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), Rio Branco, Acre



Maior PVDA ocorreu em frascos fechados com o sistema alternativo (MC), que proporcionou maior permeabilidade aos gases, evidenciada pela máxima taxa de perda de vapor d'água (0,58). No sistema de tampa convencional (tampa de polipropileno sem tecido de máscara), a taxa de perda de vapor d'água foi de 0,06 (Figura 10).

Saldanha et al. (2012) afirmam que o número de camadas e a qualidade do material utilizado como sistema de vedação influenciam significativamente a taxa de perda de vapor de água e a troca de CO₂ por hora, com maior desidratação do meio de cultura em sistemas com maior porosidade. Na presente investigação, observou-se que o sistema alternativo proposto apresentou maior troca gasosa por estar associado à porosidade do tecido que constitui o material utilizado.

Quanto à concentração de pigmentos, a vedação dos frascos de cultivo com tampa contendo tecido de máscara cirúrgica formou plantas com maior teor de clorofilas *a* e *b*, e carotenóides ($p < 0,01$), para ambas as variedades de plátano (Tabela 4). Nos sistemas convencionais de micropropagação de plantas, os recipientes utilizados são geralmente fechados com tampas de polipropileno, fato que impõe limitações às trocas gasosas entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* (NGUYEN; KOZAI 2005; ALVAREZ et al., 2012). Adicionalmente, Zobayed et al. (1999) mencionam que a baixa eficiência dos sistemas de vedação em promover as trocas gasosas acarreta acúmulo de etileno no interior dos frascos e redução dos pigmentos vegetais.

Tabela 4 – Concentração de clorofilas *a* e *b*, e carotenóide de plantas propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação (MC: máscara cirúrgica e TP: Tampa de polipropileno), Rio Branco, Acre

Sistema de Vedação	'Velhaco'			'Largo'		
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Carotenoide	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Carotenoide
MC	1,1 a	0,5 a	0,1 a	1,1 a	0,5a	0,93 a
TP	0,8 b	0,3 b	0,7 b	0,8 b	0,3 b	0,70 b

Nota: MC: sistema com tecido de máscara cirúrgica; TP: tampa de polipropileno. Médias seguidas de mesma letra não diferem ente si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No presente estudo, foi observado um menor teor de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* e caretenóides) no sistema TP, provavelmente decorrente do acúmulo de etileno no interior dois frascos relacionado às condições de estresse. Nesse contexto,

a utilização de tampas modificadas (associadas a membranas), ou ainda a completa substituição por sistemas porosos, permitem maior permeabilidade e aumento das trocas gasosas entre a atmosfera externa e a interna, aumentando a ventilação natural e melhorando a fotossíntese líquida das plantas micropropagadas, desde que a concentração de CO₂ seja adequada (KOZAI, 2010).

O aumento das trocas gasosas pelo uso de membranas porosas e a maior concentração de pigmentos fotossintéticos e carotenóides também são reportados para outras espécies vegetais propagadas *in vitro* (IVANOVA; VAN STADEN, 2010; MOHAMED; ALDASON, 2010; SALDANHA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2018). No presente estudo, o uso do sistema MC permitiu maior troca gasosa, permitindo a estimulação de mais pigmentação fotossintética em ambas as variedades Velhaco e Largo.

A modificação do microambiente *in vitro*, causada pelas trocas gasosas, mantém as concentrações de CO₂ adequadas para estimular a fotossíntese e reduzir a concentração de etileno e a umidade relativa no interior do recipiente de cultivo (KOZAI; e KUBOTA., 2001). Estudos em outras espécies mencionam que o aumento da umidade relativa *in vitro* pode reduzir o conteúdo de pigmentos (CHANEMOUGASOUNDHARAM et al., 2004; CHA-UM., et al. 2010).

Uma das possíveis consequências associadas à menor biossíntese de pigmentos fotossintéticos em plantas micropropagadas diz respeito a limitações durante a aclimatização às condições *ex vitro* (CHANEMOUGASOUNDHARAM et al., 2004).

Com relação ao fator carboidrato, o teor de pigmentos também foi influenciado pelo efeito isolado das concentrações de sacarose ($p < 0,01$) (Tabela 5, Apêndice D). Maior concentração de Chl *a* e carotenóides foi observado em plantas cultivadas com 15 g/L de sacarose, independentemente do tipo de sistema de vedação e variedade utilizada.

Tabela 5 - Concentração de clorofila *a* e carotenóide de plantas propagadas *in vitro* em função da concentração de sacarose, Rio Branco, Acre

	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	Pigmentos	
		Chl <i>a</i>	Carotenoide
Velhaco	0	0,4 c	0,10 c
	15	1,3 a	0,27 a
	30	1,0 b	0,24 b
	45	0,9 b	0,24 b
Largo	0	0,1 c	0,18 c
	15	1,6 a	0,35 a
	30	1,2 b	0,25 b
	45	0,8 b	0,24 b

Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A suplementação do meio de cultura com elevadas concentrações de sacarose aumenta a pressão osmótica, o que pode causar estresse hídrico celular. Sob tal condição, o ajuste osmótico é uma resposta importante às condições de dano, que ocorre através do acúmulo de solutos compatíveis (HOEKSTRA et al., 2001; EVERS et al., 2010). Além disso, altas concentrações de sacarose utilizadas no meio de crescimento afetam negativamente a capacidade fotossintética, conforme constatado em plantas de coco (SANTAMARÍA et al., 1999).

No presente trabalho, as altas concentrações de sacarose, ou sua ausência, promoveram menor teor de pigmentos. De acordo com La Rosa et al. (1984), a sacarose pode inibir direta ou indiretamente o acúmulo de clorofila, permitindo que a divisão e o crescimento das células se desenvolvam mais rapidamente do que o acúmulo de clorofila: "crescimento desequilibrado". Alguns autores afirmam que o acúmulo de carboidratos pode inibir a fotossíntese, a exemplo, da diminuição das enzimas do ciclo de Calvin-Benson-Bassham e da clorofila (KRAPP et al. 1991).

Por fim, ainda quanto à fisiologia das plantas produzidas, foi verificada diferença significativa no conteúdo relativo de água das folhas em função do sistema de vedação dos frascos e da concentração de sacarose (Tabela 6, Apêndice E). Para ambas as variedades estudadas, houve apenas efeito isolado dos fatores (sistema de vedação, concentração de sacarose).

Tabela 6 - Conteúdo relativo de água de plantas de bananeira, variedade Vellaco e Largo, propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação (MC: máscara cirúrgica e TP: Tampa de polipropileno), Rio Branco, Acre

Sistema de vedação	Conteúdo relativo de água (CRA)	
	Velhaco	Largo
TP	90.01 a	91,36 a
MC	86,85 b	88.84 b

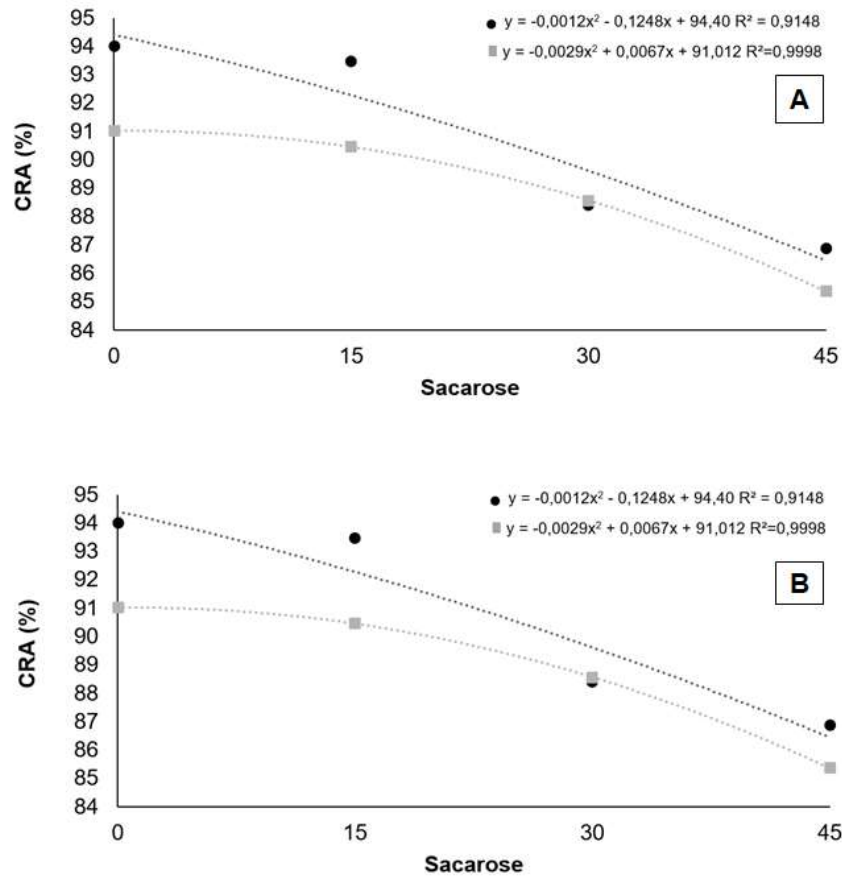
Nota: MC: sistema com tecido de máscara cirúrgica; TP: tampa de polipropileno. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Ducam a 5% de probabilidade.

O sistema convencional de propagação *in vitro* limita as trocas gasosas causadas por baixas taxas de transpiração e fotossíntese, reduzindo também a deposição de ceras epicuticulares, limitando o desenvolvimento de estômatos funcionais (KOZAI et al., 1997). Martin e Juniper (1970), mencionam que a escassa cera protetora epicuticular nas plantas cultivadas *in vitro* causa perda excessiva de água o que prejudica a transição para o ambiente *ex vitro*.

Na presente pesquisa, o maior conteúdo de água ocorreu em plantas formadas no sistema convencional, no qual os frascos foram vedados com tampa de polipropileno (TP) (Tabela 6). Esse resultado confirma a hipótese de que a utilização de sistemas de vedação alternativos, pela inclusão de membranas microporosas, aumenta a taxa de trocas gasosas com impactos positivos sobre a fisiologia das plantas micropropagadas, sobretudo na regulação estomática.

Com relação ao efeito da sacarose exógena, houve uma tendência de redução do CRA com o aumento da concentração do carboidrato, resultado observado para ambas as variedades de plátano (Figura 11). Maior média para CRA foi observado na ausência e 15 g L⁻¹ de sacarose. Menor conteúdo relativo de água foi constatado em folhas de plantas formadas com 45 g L⁻¹ de sacarose. Esse resultado corrobora o efeito do aumento na concentração de sacarose exógena sobre o acúmulo de água em tecidos foliares de plantas propagadas *in vitro*.

Figura 11 - Conteúdo relativo de água (CRA) de plantas de bananeira, variedade Vellaco (A) e Largo (B), propagadas *in vitro* em função da concentração de sacarose, Rio Branco, AC



Zobayed et al. (2000) observaram que o conteúdo de água não variou na ausência de sacarose, enquanto o aumento da concentração para 45 g L⁻¹ de diminuiu 15 e 20% o conteúdo de água para ambos os sistemas de vedação. Calvete et al. (2002), afirmam que plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* por três semanas, tiveram diminuição do conteúdo água da parte aérea, de 90 a 82%, quando a concentração de sacarose aumentou de 0 para 175 mM.

5 CONCLUSÕES

A utilização de 11,1 μM de *meta*-topolina (*mT*) promove maior indução de gemas e formação de brotos para os plátanos 'Vellaco' e 'Largo'.

O cultivo de brotos axilares em meio com 19,9 μM das citocininas *mT* e BAP promove maior formação de tecido de calo.

A redução para 15 g L⁻¹ na concentração de sacarose promove melhor resultado no crescimento das brotações e formação das plantas.

A utilização de tampas associadas ao tecido de máscara cirúrgica tripla (MC) promove a formação de plantas com maior conteúdo de pigmentos e conteúdo relativo de água.

O sistema alternativo proposto para o fechamento dos frascos de cultivo, associado à redução da concentração de sacarose, é uma estratégia promissora para micropropagação das variedades de plátanos estudadas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N.; STRNAD, M. Meta-topolin a Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture. **Springer**, v.1, n. 2, p. 352. May. 2021.
- ALBANY, N. R.; VILCHEZ, J. A.; GARCIA, L.; JIMENEZ, E. Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. **Plant Cell Tissue and Organ culture**, Dordrecht, v. 83, n. 10, p. 357-361, Apr. 2005.
- ALDEBERG, J.; NAYLOR, A, J. Effects of cytokinin on multiplication and rooting of *Aloe barbadensis* during micro propagation on agar and liquid medium. **Journal of Medicinally Active Plants**, v. 1, n. 1, p. 1-5, Jun. 2012.
- ALIYU, M. O. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale L.*) breeding: An appraisal. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13, p. 85-89, Dec. 2005.
- ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 10, n. 1, p. 1-9, Feb. 2012.
- ALVES, E. J. Propagação. In: BORGES, A.L; SOUZA, A.L.S (Ed.). **O cultivo da bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2004.
- AQUIL, B.; ARIF, T. J.; SARIN, N. B.; HAQ, Q. M. R. Micropropagation and genetic transformation of banana for crop improvement and sustainable agriculture. **Jornal of Crop Science and technology**, India, v. 3, n. 2, p. 64 -77, April. 2012.
- AREMUN, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEZAL, K.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 108, n. 1, p.1-16, Jan. 2012.
- BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HARRY. J. P: Genetic improvement of bananas. In: Jain SM, Priyadarshan PM (Ed.) **Tree plantation cultivation: tropical species**. Springer Science Business Media, 2009.
- BAIRU, M. W.; STRIK, W. A.; DOLEZAL, K.; STADEN, N. The role of topolins in micro propagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grand Naine' (*Musa* spp. AAA), **Plant Cell Tissue Organ Culture**. South Africa, v. 10, n. 95, p. 373-379, Sep. 2008.
- BANERJEE. N.; VUYLSTEKE, D.; DE-LANGHE, E. Meristem tip culture of *Musa*: histomorphological studies of shoot bud proliferation. In: Withers, L. A. y P.G. Alderson (Ed.). **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications**. Dordrecht: Kluwer Academic.1986.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**. Series A, Mathematical and Physical Sciences, JSTOR, p. 268-282, Jan. 1937.

BORGES, A. L.; SILVA, T. O. da; CALDAS, R. C.; ALMEIDA, I. E. de. Adubação nitrogenada para bananeira-'Terra' (*Musa* sp. AAB, subgrupo Terra). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 24, n. 1, p. 189-193, nov. 2002.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **Condições edafoclimáticas**. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Eds) O cultivo da bananeira. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 279 p. 2004.

BRIDGEN, M. P. A review of plant embryo culture. **Horticultural Science**, v. 29, n. 11, p. 1243-1245, Nov.1994.

BUAH, J. N.; DANSO, E.; TAAH, K. J.; ABOLE, E. A.; BEDIAKO, E. A.; ASIEDU, J.; BAIDOO, R. The effects of diferente concentration cytokinins on the *in vitro* multiplication of plantain (*Musa* sp.). **Biotechnology**, v. 9, n.3, p. 343- 347, Feb. 2010.

CAIRO, P. A. R; **Curso básico de relações hídricas de plantas**. Vitória da Conquista. UESB, 1995. 32p.

CARVALHO, J. M.; ALVES, A. M.; CASTRO,N.; SANTO,J.; SOARES,T. C. Multiplicação in *in vitro* de pinhão manso. **Embrapa**, Campina Grande, PB: v. 1, n. 2, p.19, Nov. 2014.

CALVETE, O.; NORMAN, A.; SUZIN, S. Concentração de sacarose no enraizamento in vitro de morangueiro **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 2, p. 7, dic. 2002.

CORPOICA. **Cooperación agropecuaria de investigación colombiana**. manejo sostenible del plátano cooperación colombiana de investigación agropecuaria Bogotá Colombia. Bucaramanga, 2006.

CEDEÑO, C. G.; SOPLÍN, V. H.; HELFGOTT, L. S.; CEDEÑO, G. G.; SOTOMAYOR, H. I.; Aplicación de biorreguladores para la Macro propagación del banano cv. Williams en cámara térmica. **Agronomia Mesoamericana**, v. 27, n, 2, p. 397- 408, jul. 2016.

COSTA, F. H. S.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J.E.S; OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micro propagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, v. 39, p. 386-392, mar. /abr. 2009.

CHANEMOUGASOUNDHARAM A.; SARKAR, D.; PANDEY, S.K.; AL-BISKI, F.; HELALI, O.; MINHAS, J. S. Culture tube closure-type affects potato plantlets growth and chlorophyll contents. **Biologia Plantarum**, India, v. 48, n.1, p. 7-11, Jan. 2004.

CSABAL, J.; NAGY, Z.; MANDY, A. T.; In *in vitro* shoot proliferation of speciosa (schreb) Baumg.Indced by diffent cytokinins. **Acta biologica hungarica**, v. 62, n. 4, p. 453-462, Jun. 2011.

CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 9, p.750-756, Feb. 2010.

DEBERCH, P.; READ, P. E. Micropropagation technology and application. Kluwer **Academic Publisher**, Netherlands, v. 2, p. 484, Jan.1991.

DECCETTI, S.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; MIYATA, L. Y.; MELO, L.A; BRAGA, F. T. Luz natural na micro propagação do abacaxizeiro. **Interciência**, Caracas, v. 33, n. 11, p. 839-843, nov. 2008.

DUNCAN, R. Tissue culture-induced variation and Crop improvement. **Advanced Agronomy**, v. 3, n. 58, p. 201-240, 1997.

EL-DOUGDOUG, K. A.; EL-HARTHI, H. M. S.; KORKAR, H. M. Y TAHA, R. M. Detection of somaclonal variations in banana tissue culture using isozyme and DNA fingerprint analysis. **Journal of Applied Sciences Research**, Egypt, v. 3, n. p. 60-72, Nov. 2007.

ESCALONA. M.; CEJAS, I.; GONZALEZ, O. J.; CAPOTE, I.; ROLES, S.; CAÑA, L. J.; RODRIGUES, S. J.; DEBERCH, P.The effect of meta-topolin on plantain using a temporary immersion biorreactor. **Info Musa**, v.12, n. 1, p. 28-30, Dic. 2003.

EVERS, D.; LEFÈVRE, I.; LEGAY, S.; LAMOUREUX, D.; HAUSMAN, J.-F.; ROSALES, R.; MARCA, L. Hoffmann, L., Bonierbale, M. and Schaffleitner, R. Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 9, p. 2327-2343, May. 2010.

FAO. (2019). (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Cultivos. Recuperado. em: < <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Acesso em Acesso em 15 de mai. 2020.

FAO. (2018). (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Cultivos. Recuperado. em: < <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Acesso em 18 de mai. 2020.

FERNANDES, D. A.; SOUZA, R. S.; COSTA, R. B. Cultivo *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.). **Revista de Agricultura**, v. 86, n.1, p. 32- 46, Jun. 2011.

GAO, H.; XU, P.; LI, J.; JI, H.; NA, L.; XIA, X. AgNO₃ prevents the occurrence of hyperhydricity in *Dianthus chinensis* L. by enhancing water loss and antioxidant capacity. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, p. 561-570, 2017.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: The technology**. 2. ed. England: Exegetics, 1993. v.1. 575p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A: Micro propagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998.

GROUT, M.; GROUT, S. M. Photosynthetic development of micro propagated strawberry plantlets following transplanting **Annals of Botany**, v. 1, n. 55, p. 129-131, 1985.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, Princeton, v. 11, n. 1, p. 1-21, Feb. 1969.

HOWELL, S. H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends Plant Science** v. 8, n. 3, p. 453-459, 2003.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A. AND BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431- 438, Sep, 2001.

HUSSEIN, N. Affects of nutrient media constituents on growth and development of banana (*Musa* spp.) shoot tips cultured in *in vitro*. **African Journal of Biotechnol** v. 11, p. 9001-9006, 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo agropecuário de 2006. Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA). 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo agropecuário. Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA). 2020.

IAREMA, L.; CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; VIEIRA, R. F.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 110, p. 227- 238, Mar. 2012.

ISRAELI, Y.; LAHAV, E. Tropical agriculture. Encyclopedia of Applied **Plantion Sciences**, v. 3, n. 1, p. 363-381, 2017.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Scho"nland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, v. 60, n. 2, p.143-150. 2010.

JHA, S.; DAS, S. Tissue culture of cashewnut. In: Plant biotechnology and molecular markers. srivastava, P; Srivastava, P; Narula, A; **Srivastava, S. Anamaya, Publishers**, New Delhi, India, v. 2, n. 3, p. 244-260, Nov. 2004.

KAMÍNEK, M.; VANÉK, T.; KALEDOVA, A.; PILAR, J. Efecto de dos citoquininas en la producción de esquejes de tallo por plantas de *Euphorbia pulcherrima* Wild. y *Gerbera jamesonii* Hook. **Scientia Horticulturae**, v. 33, n. 4, p. 281–289. 1987.

KRAPP, A.; QUICK, W. P.; AND STITT, M. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is

supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. **The Plant Journal**, v. 2, n. 6, p. 58-69, 1991.

KOZAI, T.; FUJIWARA, M.; HAYASHI, M.; AITKEN, C. J. The *in vitro* environments and its control in micro propagation, **Kluwer Academic Publisher**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 188-204, Dec. 2010.

KOZAI, T.; JEONG, B. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 5, n.1, p. 49-56, Mar. 1997.

KOZAI, T. Photoautotrophic micro propagation environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamentals Plants**, v. 10, n. 4, p.188-204, Dec. 2010.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micro propagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v.114, n. 5, p.525-537, Jun. 2001.

KOZAI T, XIAO Y. A commercialized photoautotrophic micropropagation system. In: Gupta S, Ibaraki Y (eds) *Plant tissue culture engineering*. Berlin, Springer, p 355-371, 2005.

LA ROSA, P. C.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Photoautotrophic potato cells: Transition from heterotrophic to autotrophic growth. **Physiologia Plantarum**, v. 61, n. 2, p. 279–286. Jun.1984.

LEIFERT, C.; KENNETH. P.; LUMSDEN, P. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 2, p.83-109, April.1995.

LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. J. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v.46, n.3, p. 499-505, May. 2016.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio membranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. 3, p.350-382, Jan. 1987.

LIPAVSKA, H.; KONRADOVA, H. Somatic embryogenesis in conifers. The role of carbohydrate metabolism. In *in vitro* Cell. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 2, p.23-30, Aug. 2004.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Concentration of bap and evaluation of *in vitro* multiplication protocol for banana genotypes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 1, p. 13-19, Feb. 2006.

LI, L. F.; WANG, H. Y.; ZHANG, C.; WANG, X. F.; SHI, F. X.; CHEN, W. N.; Y GE, X. J. Origins and domestication of cultivated banana inferred from chloroplast and nuclear genes. **Public Library of Science**, v. 8, n. 11, p. 1-11, Nov. 2013.

MACHADO, M. P.; DA SILVA, A. L. L.; BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK, J. C.; ZANETTE, F. Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot-tip necrosis of *in vitro* regenerated shoots of *lavandula angustifolia* mill. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 636-643, Sept./Oct. 2011.

MAFIA, R. G.; MARCHESI, H. P.; AUN, C. P. Avaliação de clones de eucalipto para resistência à ferrugem em condições de micropropagação. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 36, n. 5, p. 843-849, set./out. 2012.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FAGUNDES, C. K.; FLORES, R.; JUCOSKI, G. O. Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro* sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. **Ciência Rural**, v. 3, n. 1, p.133-140. 2007.

MARTÍN, J. T.; JUNIPER, B. E. The cuticles of the plants. London, Edward Arnold. **London and New York**, v. 2, n. 4, p. 347. Nov.1970.

MARTIN, K.; PACHATHUNDIKANDI, S.; ZHANG, C.; SLATER, A.; MADASSERY, J. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp.*) cv. 'Grande naine' and its propagation via shoot tip culture. **In vitro Cell and Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 1, p.188-192, Oct. 2006.

MARCHAL, J.; TEISSON, C.; ESCALANT, J. V.; NAVARRO-MASTACHE, L. C. Echanges d'éléments minéraux et carbonés en culture *in vitro* p.cas du bananier. **Fruits**, Paris, v. 43, n. 9, p. 485-490, Sep. 2007.

MACEDO, A. F.; LEAL-COSTA, M. V.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, v. 7, n. 1, p. 43-50, May. 2011.

MÉNDEZ, M. M. Efecto de cinco dosis de quitosano para el establecimiento *in vitro* del plátano dominico hartón (musa AAB Simmonds) en la zona de Daule. 2014. 111f Tesis (Licenciatura) - Universidad de Guayaquil, 2014.

MOHAMED, M. A. H.; ALDASON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micro propagated potato plantlets. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 123, n. 2, p. 295-300, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow than bioassays with Tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497,1962.

MÜLLER, D.; LEYSER, O. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, v. 10, n. 7, p. 1203-1212, May. 2011.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 33, n. 3, p. 481-490, may. /june. 2009.

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (Ed.) **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer, Dodrecht, 2005.

NICOLOSO, F.; ERIG, C. A.; RUSSOWSK, D.; MATINS, F. C. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, jan./feb. 2003.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E.. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal: II Capítulo Micro propagación. **INTA**, v. 7, n. 2, p. 353-362, 2010.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. B. Aspectos anatômicos e fisiológicos de *croton lechleri* muell. arg. cultivado *in vitro*: sistemas de vedação, tipos de explantes e hiperidricidade. 2019. 68 f. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Acre. 2019.

OLIVEIRA, M. L. de; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R. M.; ATONI, W. C.; TEIXEIRA, J. B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, nov./dez. 2011.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVA, S. O.; SILVA, K. M. da; SILVEIRA, D. G. In *in vitro* conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 245-249, abr./jun. 2001.

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogenese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Arvore**, Viçosa, Brasil, v. 37, n. 1, p. 19-29, feb. 2013.

PEREIRA, A. G.; SANTAELLA, B. M.; ALVES, M. S.; SILVA, C. E.; FLENGA, S. I.; SANTOS, A. M. Concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) in micropropagation of banana 'Farta Velhaco' (AAB). **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 1, p. 58-63, febr. 2018.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHE, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C. F.; LIMA, C. de; GONÇALVES, V. D.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOBAYASHI, M. K. Acclimatização de mudas micro propagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240, ago. 2005.

PERRIERA, X.; LANGHE, E.; DONOHUE, M.; LENTFERD, C.; VRYDAGHSE, L.; BAKRYA, F.; TIM, DENHAM. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. Proceedings of the National **Academy of Science**, v.108, n.28, p. 311-318, Jul. 2011.

PIATTI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, maio/jun. 2011.

POLTRONIERI, L. S.; FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T.; VERZIGNASSI, J. R.; CARDOSO, S. S. Constatação do Banana streak Uganda B virus em bananeiras no Estado do Pará, **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 74, jan./feb.2009.

RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. DE M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L. C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Concentrações de Sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 843-845, jul. 2007.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, R. L. D.; CORRÊA, R. M. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, maio. 2009.

RAHMAN, Z.A.; ALI, M. S.; GHAZALLI, M. N.; AWANG, K. Optimization of Culture Media Formulations for Micropropagation of *Lepisanthes fruticosa*. **Biosciences Biotechnology Research**. Asia, v.15, n.1, p. 51-58. Octu. 2018.

ROCHA, H. S.; SILVA, C. R. R.; ARAUJO, A. G.; SILVA, A. B. Propagação *in vitro* de bananeira Prata Anã (AAB): intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 4, p.10-16, mar. 2007.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F. FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Minas Gerais, v. 48, n. 8, p.1-6, Sep. 2012.

ROUX, N.; DOLEZEL, J.; SWENNEN, R.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Effectiveness of three micro propagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, n. 2, p.189-197, April. 2001.

SÁ, M. E. L.; BRAGA, M. F. Avaliação de protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata-Anã (subgrupo AAB). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 24, n. 1, p. 236-239, April. 2002.

SAS - Institute Inc. SAS / STAT Guia do usuário, SAS Institute Inc., Cary, NC Versão 9, quarta edição. 2019.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F. de; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. do; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, Sep. 2012.

SANTAMARÍA, J. M.; TALAVERA, C. T.; LAVARGNE, D.; TRABELSI, S.; VERDEIL, J. L.; HUET, C.; RIVAL, A.; HAMON, S.; NATO, A.: Effect of medium sucrose on the photosynthetic capacity of coconut plants formed from zygotic embryos. - In: OROPEZA, C.; VERDEIL, J. L.; ASHBURNER, G. R.; CARDEÑA, R.; SANTAMARÍA,

J.M. (Ed.): **Current Advances in Coconut Biotechnology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.

SEGRETÍN, M. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). **Argentino Biotecnología**, v. 1, n. 1, p. 1-6, Feb. 2006.

SEDICI. (2017). Cultivo *in vitro*. Disponible en <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstre>. Acesso em 5 de abri. 2020.

SERVCIKOVA, H.; LHOTAKOVA, Z.; HAMET, J.; LIPAVASKA, H. Mixotrophic *in vitro* cultivations: the way to go astray in plant physiology. **Physiologia Plantarum**, v. 167, n. 10, p.1111-12893, Dec. 2018.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; MIYATA, L. Y.; MELO, L.A; BRAGA, F. T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 11, p. 839-843, nov. 2008.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Boston, v. 52, n. 4, p. 591-611, Dec. 1965.

SHIRANI, S.; MAHDAVI, F.; MAZIAH, M. Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa spp.*) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p.5755-5761, Nov. 2009.

SHIN, K. S.; PARK, S.Y.; PAEK, K.Y. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of *in vitro* plantlets of *Doritaenopsis* under controlled micro environmental conditions. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 49, n. 4, p. 445-454, jun. 2013.

SOUZA, D. de S. e; SIQUEIRA, D. L. de; CECON, P. R.; SANTOS, D. dos. Micro propagação das bananeiras Prata Anã e FHIA 01 a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 561-570, jun. 2010.

SOUZA, A. S. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. 1. ed. Cruz das Almas, BA: Em-brapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, 152 p.

SOUZA, L.; RIBERIRO, B. M.; ZARATE, S. R.; LOZANDO, I. F. Use of meta –Topolin, an unconventional cytokinin in the *in vitro* multiplication of *Opuntia stricta* Haw, **Biotecnologia Vegetal**, v. 19, n. 2, p. 85-96, abril./junio. 2019.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 5, n. 2, p. 99-114, jun. 1949.

THOMSON, M.; THORPE, T, A. Metabolic y papeles no metabólicas de carbohidratos. In: BONG, J.M. DURZAN, D. J. (Ed.) **Cultivo de células y tejidos en el sector forestal**. Martinus Nijhoff, 1987.

VASCONCELOS, A. G.; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p.837-844. mai. 2012.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R.V.; BHAGYALAKSHMI, N. Micro propagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. **Plant Growth Regulation**. India, v. 51, n. 1, p.193-205, Feb. 2007.

VUYLSTEKE, D.R. Shoot-tip culture for the propagation, conservation, and distribution of Musa Germplasm. **International Institute of Tropical Agriculture**, Ibadan, Nigeria, v. 82, n. 4, p. 46-47, 1998.

WERBROUCK, S. P.; VANDERJEUGT, B.; DEWITTE, W.; PRINSEN, E.; VAN ONCKELEN, H.; DEBERGH, P.C. The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* Schott 'Petite' in relation to acclimatization problems. **Plant Cell Rep**, v. 1, n. 14, p. 662-665. April.1995.

WONG, W. C. In *vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): initiation, proliferation and development of shoot tip cultures on defined media. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, New York, v. 6, n. 2, p. 159-166, Sept. 1986.

ZOBAYED, S. M .A.; ARMSTRONG, J; ARMSTRONG W. Evaluation of a closed system, diffuse and humidity-induced convective throughflow ventilation on the growth and physiology of cauliflower in *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, New York, v. 59, n. 1, p.113-123, Feb. 1999.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Micro propagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. **Annals of Botany**, v. 87, n. 1, p. 53-59, 2001.

ZUZARTE, M. R.; DINIS, A. M.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. R.; CANHOTO, J. M. Trichomaes, essential oils and in *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and products**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 580-58, Nov. 2010.

APÉNDICES

APÊNDICE A - Quadrado médio (QM) do número de brotos, gemas e calo em explantes de bananeiras, variedades Velhaco e Largo, propagados *in vitro* em função do tipo e concentração de citocinina (Experimento 1). Média de cinco subcultivos sucessivos.

Fonte de variação	Quadrado médio					
	'Velhaco'			'Largo'		
	Brotos	Gema	Calo	Brotos	Gema	Calo
Citocinina	3,21**	0,07 ^{ns}	1,66**	0,07 ^{ns}	2,45**	2,05**
Concentração	5,07*	2,3 ^{ns}	1,04**	6,46**	3,14**	0,89**
Citocinina * Concentração	0,06 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,37 ^{ns}
CV (%)	17,98	20,24	27,49	22,97	29,15	26,11

Notas: ^{ns} não significativo ($p>0,01$); * significativo a 5% ($p<0,05$); ** significativo a 1% ($p<0,01$).

APÊNDICE B - Quadrado médio (QM) do número de folhas expandidas (NFE), altura (ALT, cm) e diâmetro do pseudocaule (DPC, cm) de plantas de bananeiras, variedades Velhaco e Largo, formadas *in vitro* a partir de brotações cultivadas em função do tipo de vedação do recipiente e concentração de sacarose (Experimento 2 – etapa de enraizamento/crescimento).

Fonte de variação	Quadrado médio					
	'Velhaco'			'Largo'		
	NFE	ALT	DPC	NFE	ALT	DPC
Sistema de Vedação	0,14 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,68 ^{ns}
C. sacarose	2,34**	2,06**	2,07**	1,56**	2,62**	2,09*
S. vedação * C. sacarose	0,31 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,60 ^{ns}
CV (%)	27,77	22,28	22,53	24,11	23,29	23,23

Notas: ^{ns} não significativo ($p>0,01$); * significativo a 5% ($p<0,05$); ** significativo a 1% ($p<0,01$).

APÊNDICE C - Resumo da análise de variância (Anova) para a taxa de perda de vapor d'água (PVDA) em função do sistema de vedação do recipiente, medida aos 30 dias do cultivo *in vitro* (Experimento 2).

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (QM)
Sistema de vedação	1	2,88**
Erro	98	0,02
Total	99	-
CV (%)		24,95

Notas: ^{ns} não significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

APÊNDICE D - Quadrado médio (QM) para conteúdo de clorofila *a* e *b*, e de carotenóides (mg g^{-1} de massa fresca) em folhas de bananeiras propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação do recipiente e concentração de sacarose (Experimento 2).

Fonte de variação	Quadrado médio					
	'Velhaco'			'Largo'		
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car
Sistema de vedação	0,46*	0,06 ^{ns}	0,05*	0,58**	0,13 ^{ns}	0,01*
C. sacarose	0,64**	0,08 ^{ns}	0,36*	0,49**	0,11 ^{ns}	0,02**
S. vedação * C. sacarose	0,08 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,008 ^{ns}
CV (%)	28,54	25,14	28,19	11,00	14,01	13,53

Notas: ^{ns} não significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

APÊNDICE E – Quadrado médio (QM) para o conteúdo relativo de água (CRA) em folhas de bananeiras propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação do recipiente e concentração de sacarose (Experimento 2)

Fonte de variação (FV)	Quadrado médio	
	'Velhaco'	'Largo'
Sistema de vedação	11,02*	8,83**
C. sacarose	22,39**	29,35**
S. vedação * C. sacarose	7,07 ^{ns}	7,09 ^{ns}
CV (%)	22,22%	20,51%