

METHODOLOGY

METODOLOGIA *in vivo* VISANDO INDUÇÃO DE MUTAÇÕES NO MELHORAMENTO DA BANANEIRA "MAÇÃ" (*In vivo* Methods for the Induction of Mutations in "Maçã" Banana Improvement Programs)

A. Tulmann Neto, E.T. Domingues, B.M.J. Mendes e A. Ando

ABSTRACT

In the Radiation Genetics Section of CENA/USP a rapid method of banana propagation was adapted for use in mutation breeding through gamma radiation of the cultivar "Maçã". Rhizomes with diameters of approximately 20 cm were taken from field grown adult plants which had not reached the flowering stage. These rhizomes, free from roots and containing the apical and lateral shoots, were put into receptacles containing autoclaved vermiculite, covered with plastic and maintained in the greenhouse. The apical meristem was eliminated to stimulate lateral bud development. When these lateral buds reached 4-7 cm in diameter, their meristems were also eliminated. New buds were obtained from the callus which developed subsequently. The other aspect of the research was the analysis of sensitivity to gamma rays after elimination of the meristems of lateral shoots. Based on the average number of new buds formed the LD₅₀ was calculated to be between 30 and 40 Gy. This level of radiation and the adapted methodology described are suitable for use in mutation breeding with this cultivar.

INTRODUÇÃO

A banana é uma das frutas tropicais de maior importância no Brasil, que é o maior produtor mundial e responsável por cerca de 16% do total produzido (Moura, 1986).

São vários os problemas da bananicultura brasileira, mas dentre as prioridades de pesquisa, os técnicos têm apontado a resistência a uma série de doenças tais como “Moko”, “Mal de Sigatoka” e “Mal do Panamá” (Alves, 1984). Dentro dos subgrupos em que foram classificados os cultivares, não existem fontes de resistência para algumas destas doenças. Os métodos de melhoramento através de cruzamentos, que poderiam ser aplicados para obtenção de cultivares resistentes, são dificultados devido ao alto grau de esterilidade das bananas triplóides (Sheperd *et al.*, 1986). Em situações como esta, onde existem limitações na variabilidade genética natural, ou dificuldades relacionadas às aplicações de métodos de melhoramento, uma ferramenta de trabalho que pode resultar de interesse, refere-se à indução de mutações por agentes físicos ou químicos. Na verdade, tem sido relatado que as mutações somáticas naturais têm resultado em fator de importância na diversificação dos clones de bananeira. Daí a sugestão de, através de aumento da frequência destas mutações pelo uso de mutagênicos, fazer-se a seleção para uma série de mutantes de interesse agrônomo, tais como resistência àquelas doenças (Shepherd *et al.*, 1986).

Ao analisar-se esta alternativa, os autores reconhecem que uma das dificuldades seria o isolamento das mutações somáticas induzidas, de acordo com o tipo de material da bananeira que fosse utilizado para o tratamento mutagênico. Se uma estrutura multicelular como o rizoma por exemplo, for tratada com o mutagênico, sendo a mutação um evento unicelular, automaticamente haveria a ocorrência de quimerismo de vários tipos. Se células isoladas fossem tratadas, o mutagênico poderia produzir um mutante sólido. Estas situações foram bem descritas por Broertjes e Van Harten (1978), para o caso de plantas de propagação vegetativa. Nesta revisão, os autores sugerem várias alternativas para o isolamento de mutações somáticas neste grupo de plantas, tais alternativas incluem tratamentos realizados *in vivo* ou *in vitro*.

Gemas adventícias, por exemplo, podem ser de grande importância na indução de mutações em plantas de propagação vegetativa. Isto porque tem sido observado que em muitos casos, tais gemas se originam, em última instância, de uma única célula, permitindo portanto, a obtenção de mutantes sólidos (Broertjes *et al.*, 1968). Em bananeira, Hamilton (1965) propôs um método de reprodução *in vivo* em que estariam envolvidas gemas axilares e adventícias. Este método foi posteriormente usado e adaptado por outros autores, inclusive no Brasil (Dantas *et al.*, 1986; Martinez *et al.*, 1986) para propagação rápida da bananeira. Não se encontraram referências sobre sua utilização para indução de mutações, não se podendo afirmar se as novas plantas originárias de gemas adventícias seriam ou não provenientes de uma ou mais células.

Diante do que foi discutido, resolveu-se realizar pesquisa cujo objetivo foi a adaptação, para as condições da Seção de Radiogenética do CENA/USP, da metodologia de Hamilton. Após isto, objetivou-se também através do seu uso na cultivar “Maçã”, a determinação da sensibilidade a raios gama visando-se trabalho de indução de mutações para resistência a doenças.

MATERIAIS E MÉTODOS

Plantas de bananeira adultas da cultivar "Maçã" foram obtidas de campo de produção comercial, localizado na região de Piracicaba. Tais plantas ainda não haviam frutificado e apresentavam diâmetros variando de 8 a 20 cm e foram trazidas para o CENA onde sofreram o corte de seus pseudocaulés, aproximadamente 15 cm acima da intersecção das bainhas com o rizoma. Após isso, tiveram uma a uma retiradas destes rizomas, as bainhas que compõe o pseudocaulé deixando-se apenas 5 ou 6 bainhas no centro do rizoma para proteção do ápice meristemático. Além das bainhas, foram retiradas as raízes excedentes e a terra. Uma vez realizado esse trabalho os rizomas passaram por uma rápida desinfecção que foi realizada lavando-se os mesmos com água e em seguida imergindo-os em solução de hipoclorito de sódio (5%) por 10 minutos, repassando-se em água destilada. Em seguida, os rizomas foram colocados em casa de vegetação, em bacias plásticas perfuradas sobre vermiculita estéril, mantendo-se sempre a umidade adequada.

Uma semana após o procedimento descrito, retomaram-se os rizomas para a retirada das bainhas restantes que haviam ficado no centro. Tais bainhas foram retiradas uma a uma com cuidado, utilizando-se um bisturí, até atingir o ápice meristemático com cerca de 2 mm de altura. Neste estágio o meristema foi retirado assepticamente (álcool), com o mesmo bisturí e a seguir com tal instrumento, foi feito um corte em cruz na região ferida. Tal corte teve aproximadamente 2,5 cm de comprimento e costumeiramente é denominado de segamento e foi feito com o objetivo de favorecer o desenvolvimento das gemas laterais dormentes, existentes nos rizomas.

Aproximadamente 30 dias após este procedimento as gemas laterais, situadas entre as bainhas retiradas, começam a se desenvolver. Quando atingiram aproximadamente 4 cm de diâmetro sofreram o mesmo processo de retirada de suas bainhas, extração do meristema e segamento em cruz. Nesse estágio os rizomas foram irradiados um a um com diversas doses de raios gama na fonte de ^{60}Co do CENA, com o objetivo de se determinar a sensibilidade. A abertura dos cilindros da fonte foi de 80 cm utilizando-se a taxa de dose de 33 kR/hora. Para a medida do efeito da irradiação procurou-se observar a capacidade ou o número de brotações obtidas nas gemas laterais segadas, pois, estas novas brotações é que serão utilizadas em trabalho futuro para seleção de mutantes.

Para a determinação da sensibilidade foi realizado um total de 3 experimentos. O primeiro experimento, considerado preliminar consistiu na irradiação de rizomas de bananas Maçã com 3 doses: 40, 80 e 120 Gy, mais a testemunha, sendo que cada tratamento teve 3 repetições. No segundo experimento, foram usadas as doses de 20, 30 e 40 Gy mais a testemunha, com 6 repetições por tratamento. No terceiro experimento, utilizaram-se as doses de 60, 80 e 100 GY mais a testemunha, com 5 repetições para cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de novas plantas de cultivar "Maçã" através do segamento de meristemas apicais e laterais.

Como já se previa, surgiram no início da aplicação do método, uma série de problemas que dificultaram a obtenção de novas plantas através dos dois segamentos realizados para isto. Houve por exemplo a ocorrência do apodrecimento de alguns rizomas mantidos em bacias plásticas. Isto pode ter ocorrido devido à má eliminação da gema apical, quando pode-se ter ferido o rizoma além do que seria necessário. Ou então poderia estar relacionado a temperaturas excessivamente altas na casa de vegetação (superiores a 28°C) associadas ao alto teor de umidade. Observou-se que os rizomas em estágio de apodrecimento parcial, ainda poderiam ser aproveitados. Uma vez que estes tecidos eram retirados, o apodrecimento cessa, possibilitando a emissão de novas brotações.

A alta umidade revelou-se fator de grande importância no método. Houve uma melhora sensível na velocidade de emissão de novas brotações após o segundo segamento, quando os rizomas foram cobertos com plástico.

O diâmetro inicial dos rizomas também foi de importância com relação ao número médio de novas brotações. Rizomas com diâmetros de 8-11 cm produziram um número baixo de novos brotos, enquanto que os diâmetros entre 17-20 cm foram os que originaram o maior número de brotos.

Existiram casos em que os rizomas também produziram muitos brotos laterais, que após serem eliminados pelo segundo segamento para a emissão de novas brotações, não possibilitaram boas brotações. Observou-se que este maior número de brotos eliminados, não significava necessariamente um maior número de novos brotos formados. O que se revelou de importância, foi o diâmetro dos brotos laterais a serem eliminados. Quanto maior este diâmetro, era maior a probabilidade de ocorrência de novas brotações.

A má eliminação da gema apical ou o mau segamento em cruz ocorre quando não se retira totalmente o meristema ou não se realiza o corte em cruz adequadamente. Isto provoca o desenvolvimento das bainhas circundantes ao meristema apical ou então o meristema é reconstituído totalmente. Estes dois processos trazem prejuízo ao método pois retardam ou impossibilitam o desenvolvimento das gemas laterais.

Levando-se em conta os resultados que foram obtidos, reuniram-se as condições ideais para a aplicação desta metodologia pela Seção de Radiogenética do CENA:

1) Obtenção de plantas novas, sem diferenciação floral, corte no pseudocaule 15 cm acima da intersecção das bainhas que compõe o pseudocaule com o rizoma. Corte das raízes junto ao rizoma e lavagem em água. Dar preferência a rizomas com diâmetros maiores (aproximadamente 20 cm).

2) Retirar dos rizomas, uma a uma, as bainhas que compõe o pseudo caule deixando-se apenas 5 a 6 bainhas no centro do rizoma, para proteção do ápice meristemático. Imersão em hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos repassando-se em água destilada.

3) Plantio superficial dos rizomas em vermiculita autoclavada em bacias plásticas perfuradas, em casa de vegetação. Manter sempre a umidade na vermiculita, cobrir as bacias com plástico transparente para manutenção da umidade.

4) Uma semana após a colocação dos rizomas nas bacias plásticas eliminar uma a uma as 5-6 bainhas que haviam ficado, com bisturi mergulhado previamente em álcool, até que se atinja o ápice meristemático, com cerca de 2 mm de altura. Eliminar o meristema com o bisturi estéril, procurando não deixar nenhum vestígio meristemático. Ainda com o bisturi fazer um corte em cruz de cerca de 2,5 cm. Este primeiro segmento deve ser cuidadoso de modo a não se ferir demasiadamente os rizomas, o que poderia causar apodrecimento.

5) Cerca de trinta dias após o primeiro segmento, as gemas laterais, situadas entre as bainhas retiradas, começam a se desenvolver. Aguardar o desenvolvimento destes brotos laterais até que atinjam aproximadamente 4 cm de diâmetro em sua base. Isto deverá ocorrer cerca de 4 meses após o primeiro segmento. Retirar as bainhas dos brotos laterais, extrair o meristema e realizar o segundo segmento em cruz, da mesma maneira anteriormente descrita. Rizomas parcialmente apodrecidos podem ser recuperados retirando-se assepticamente as partes lesadas. No caso dos rizomas serem irradiados, deve-se fazer a irradiação, imediatamente após este segundo segmento.

6) Depois do segundo segmento, ao redor dos brotos laterais eliminados, ocorrerá a formação de calos, iniciando-se a formação de brotos laterais de 17 a 30 dias após o segmento.

7) Dois a três meses após o segundo segmento, os novos rebentos estão prontos para serem transplantados para sacos plásticos, originando novas mudas; sendo que logo após seu enraizamento podem ser inoculados com o patógeno.

8) Em média, de cada rizoma foi possível a obtenção de 4 novas plantas. Este número é baixo, quando se compara com resultados de outros pesquisadores. Porém, deve-se lembrar que para o presente caso, o método foi modificado, não interessando somente o número de brotações mas também a sua origem de formação.

9) Portanto, utilizando-se o procedimento descrito anteriormente, o período total é de cerca de 8 meses para a obtenção de novas mudas, se os rebentos laterais já apresentarem raízes quando ainda ligados ao rizoma, ou cerca de 9 meses se tais rebentos necessitarem do enraizamento. No caso de ter havido a irradiação dos rizomas após o segundo segmento, este período será maior devido ao atraso no desenvolvimento das novas brotações laterais.

Aplicando-se o método como foi descrito, eliminando-se as bainhas e o meristema, existe a possibilidade de que a nova muda formada, passando pelo estágio de

calo (tecido indiferenciado) seja de origem adventícia. Como cita Hamilton (1965) as novas plantas podem ter origem axilar ou adventícia. Pelo formato da nova muda, é possível identificar no estágio inicial estes dois tipos pois, as de origem axilar são mais globulares na base e apresentam um maior crescimento inicial pois as de origem adventícia terão que se desenvolver antes do calo para se formarem.

Já se discutiu no início deste trabalho, o sucesso que autores têm tido na obtenção de mutantes sólidos através do uso de gemas adventícias (Broertjes *et al.*, 1968). Portanto, é preferível a utilização de método que favoreça o aparecimento de novas plantas através de gemas adventícias, pois se as mudas se originassem de gemas axilares, seguramente haveria a formação de quimeras. Deve-se entretanto, ressaltar que há casos em que mais de uma célula faz parte da gema adventícia e neste caso, resultaria também em quimerismo.

Determinação da sensibilidade a raios gama

Como descrito na metodologia foram realizados três experimentos. O primeiro, foi considerado um ensaio preliminar irradiando-se rizomas de banana Maçã após o segundo segmento, com 40, 80, 120 Gy, comparando-se com o controle. Para o controle houve a emissão de 0,6 novos brotos em média por rizoma, enquanto que para a dose de 40 Gy, tal número caiu para 0,3. Doses maiores não resultaram na emissão de novas brotações.

Baseando-se no ensaio preliminar, realizaram-se dois outros experimentos e para a discussão dos resultados, resolveu-se agrupar os dados destes dois experimentos. Após a irradiação, a partir de 12 dias iniciou-se o processo de emissão de novas brotações laterais, que estendeu-se até dois meses após a irradiação. Observou-se que quanto maior a dose, maior a demora para a emissão destes brotos, o que era de se esperar devido ao efeito fisiológico produzido pelas radiações na geração M_1V_1 . A maior parte dos brotos surgiu entre 18 a 28 dias após a irradiação.

Foi feita uma contagem de número de brotos nos rizomas bem como anotou-se a altura das novas brotações. Os valores médios encontrados são relatados na Tabela I.

Pode-se observar por estes dados, que doses ao redor de 80 Gy inibiram totalmente a emissão de novas brotações. Conclui-se também, como era de se esperar, que doses crescentes de radiação produziram um decréscimo no número de brotos. Notou-se também uma tendência para os brotos apresentarem um menor crescimento, com exceção da dose de 20 Gy. Isto pode ser explicado pois, como se observa pelo número de brotos, tal dose foi relativamente baixa, permitindo que em determinados rizomas, houvesse um grande número de novas brotações. Esta grande competição entre estes novos brotos, acarretou um decréscimo na altura média. Já para os tratamentos seguintes, tal competição não existiu, observando-se um decréscimo na altura em relação ao controle.

Tabela I - Sensitividade a raios gama de rizomas do cultivar "Maçã", após o segamento de gemas laterais.

Doses (Gy)	N ^o de brotos por rizoma*		Altura dos brotos*	
	Média	Controle = 100,0	Média	Controle = 100,0
0	4,1	100	9,99	100
20	4,1	100	6,29	63
30	2,5	61	8,20	82
40	1,8	44	2,67	27
60	0,7	16	1,18	12
80	0,0	0	0,00	0
100	0,0	0	0,00	0

* Dados obtidos 3 meses após a irradiação.

Como se sabe, tanto a letalidade como a redução de crescimento podem servir de parâmetros para a escolha da dose a ser utilizada em trabalhos de indução de mutações. No presente trabalho, a LD₅₀, ou seja, a dose que produz 50% de mortalidade, está entre 30 e 40 Gy e esta é a faixa de dose que será utilizada em trabalho empregando-se esta metodologia. Neste caso, o que se propõe é a irradiação, de um grande número de rizomas após o segundo segamento. As novas mudas adventícias devem ser destacadas dos rizomas e utilizadas na triagem em busca de mutantes. Se o objetivo for resistência ao Mal-do-Panamá, plantas jovens podem ser inoculadas segundo procedimento descrito por Sun e Su (1984) e Mendes *et al.* (1989), permitindo de uma maneira rápida e eficiente, em casa de vegetação, a triagem de um grande número de plantas. Este método foi testado, utilizando-se plantas com 7 a 10 cm de altura, retiradas das gemas laterais segadas. Tais plantas foram colocadas em copos plásticos contendo terra autoclavada, para o enraizamento, até que atingissem de 15 a 20 cm de altura. A inoculação foi feita através de rega do solo com a concentração de 5×10^4 esporos/ml do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, ferindo-se as raízes para facilitar o acesso do fungo. Os sintomas apareceram cerca de 3 semanas após, observando-se o necrosamento do colo da planta, amarelecimento das folhas (das mais velhas para as mais novas) e em certos casos, a rachadura do pseudo caule junto ao solo. Interiormente, através de corte pode-se notar o escurecimento dos tecidos do rizoma e dos vasos condutores. Em geral a planta inoculada não sobreviveu, mas em certos casos, houve sobrevivência devido a brotações laterais.

CONCLUSÕES

Foi feita a adaptação de método de multiplicação rápida da bananeira utilizando-se a cultivar "Maçã", para trabalhos de indução de mutações, visando-se especialmente resistência a doenças.

Rizomas com cerca de 20 cm de diâmetro, retirados de plantas adultas no campo, que não haviam frutificado, submetidos a dois segmentos, cerca de 8 a 9 meses depois, permitem a obtenção de novas mudas de origem axilar ou adventícia.

Ensaio com sensibilidade a raios gama, demonstraram que usando-se este sistema, podem ser utilizadas doses entre 30 e 40 Gy para a obtenção de um número médio de 50% de novas mudas, em relação ao controle. Estas novas plantas podem ser utilizadas para a triagem em busca de resistência a doenças, utilizando-se inoculação do solo, através de um método rápido e eficiente, que permite a seleção cerca de 3 semanas após a inoculação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento da FAPESP durante 1987 e o CNPq, durante 1988, que tornaram possível a realização desta pesquisa e ao CNPq pelo fornecimento de Bolsas.

RESUMO

Na Seção de Radiogenética do CENA foi feita a adaptação do método de propagação rápida da bananeira, para trabalho de indução de mutações através de radiação gama na cultivar "Maçã".

Rizomas com cerca de 20 cm de diâmetro foram retirados de plantas adultas do campo, que ainda não haviam frutificado. Estes rizomas, livres de raízes e contendo a gema apical e as laterais, foram colocados em recipientes contendo vermiculita autoclavada, cobertos com plástico e mantidos em casa de vegetação. Efetuou-se a eliminação do meristema apical, estimulando-se assim o desenvolvimento das gemas laterais. Quando estes brotos laterais atingiram 4 a 7 cm de diâmetro, seus meristemas também foram eliminados e a partir do calo formado, novas mudas foram obtidas.

A outra parte da pesquisa consistiu na determinação da sensibilidade à radiação gama, após a eliminação dos meristemas dos brotos laterais. Baseando-se no número médio de novas mudas formadas, determinou-se que a dose para 50% de letalidade está entre 30 e 40 Gy. Doses dentro desta faixa e a metodologia descrita podem ser usadas para trabalhos de indução de mutações com este cultivar.

REFERÊNCIAS

Alves, E.J. (1984). Principais problemas da bananicultura brasileira e esforços da pesquisa para sua solução. In: *I Simpósio Brasileiro sobre Bananicultura*. Jaboticabal (SP): 3-18.

- Broertjes, C., Haccius, B. and Weidlich, S. (1968). Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding. *Euphytica* 17: 321-344.
- Broertjes, C. and Van Harten, A.M. (1978). *Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops*. Amsterdam, The Netherlands.
- Dantas, J.L.L., Sheperd, K. e Alves, E.J. (1986). Propagação rápida da bananeira. *Inf. Agropec.* 12:33-44.
- Hamilton, K.S. (1965). Reproduction of banana from adventitious buds. *Trop. Agriculture* 42: 69-73.
- Martinez, J.A., Yamashiro, T. and Ferreira, F.R. (1986). Avaliação de mudas de bananeira visando sua comercialização. In: *Anais do VII Congresso Brasileiro de Fruticultura*, Brasília, DF, pp. 77-81.
- Mendes, B.M.J., Rodrigues, B.I.F.P., Domingues, E.T. e Tulmann Neto, A. (1989). Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em plantas jovens de bananeira. *Summa Phytopathologica* 15:31.
- Moura, P.A.M. (1986). Aspectos econômicos da cultura da bananeira. *Inf. Agropec.* 12:3-7.
- Sheperd, K., Dantas, J.L.L. e Alves, E.J. (1986). Melhoramento genético da bananeira. *Inf. Agropec.* 12:11-19.
- Sun, E.J. and Su, H.H. (1984). Rapid method for determining differential pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using banana plantlets. *Tropic Agric.* 61:7-8.

(Recebido em 21 de Julho de 1989)