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

VIABILIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Musa acuminata*

ELIANE DA SILVA BRAULIO

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA- BRASIL
Agosto, 2024

VIABILIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Musa acuminata*

ELIANE DA SILVA BRAULIO
Bacharela em Biologia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2021

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

Orientadora: Dra. Janay Almeida do Santos Serejo
Coorientadoras: Dra. Maria Inês de Souza Mendes

CRUZ DAS ALMAS - BA
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

B825v

Braulio, Eliane da Silva.
Viabilidade e criopreservação de sementes de *Musa acuminata* / Eliane da Silva Braulio._ Cruz das Almas, BA, 2024.
57f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof. Dra. Janay Almeida dos Santos Serejo.
Coorientadora: Dra. Maria Inês de Souza Mendes.

1.Banana – Criopreservação. 2.Banana – Melhoramento genético – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.772

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

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

VIABILIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Musa acuminata*

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação
Eliane da Silva Braulio

Aprovada em: 30 de agosto 2024

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

Profa. Dra. Hellen Cristina da Paixão Moura
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Membro Externo)

Profa. Dra. Lucymeire Souza Morais Lino
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Membro Interno)

Dedico este trabalho a DEUS e à minha família, em especial, a meu pequenino Henrique que através dos seus sorrisos e abraços me fortalece e motiva a cada dia.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, por ter me dado saúde e forças para superar todos os momentos difíceis em que me deparei ao longo da minha pós-graduação e pela força e coragem, fé que tive disponível durante toda caminhada que foi vencida com muito esforço, e que agora com muita felicidade posso dizer valeu a pena.

Ao meu noivo Jorge Luiz pela compreensão e apoio, sendo um grande companheiro, e incentivando a não desistir quando o cansaço e o desânimo insistiram em me fazer desanimar.

Ao meu filho Henrique Gabriel que é a razão do meu viver, maior presente que Deus me presenteou, e ao meu sobrinho Miguel Braulio, que é minha preciosidade.

Aos meus pais Maria da Conceição Braulio e Roque Braulio e minhas irmãs Caroline Braulio e Caliane Braulio, por todo o incentivo e apoio que me deram nessa jornada de estudo, dando-me força para não desistir.

A minha sogra por seu apoio em se comprometer de ficar com meu filho Henrique enquanto eu estava em minha jornada de estudo.

À Dra Janay Almeida dos Santos Serejo por aceitar ser minha orientadora, pela atenção, suporte e dedicação em ajudar.

À Dra. Maria Inês de Souza Mendes por aceitar ser minha co-orientadora, por me passar seu conhecimento e experiência com tanta dedicação e paciência, me incentivando a não desistir quando o desânimo persistiu e se tornando assim uma grande amiga.

A todos do laboratório de Cultura de Tecidos em especial, Wagner Alves, por ser e principalmente se tornar um grande amigo, que me passou todo seu conhecimento com tanta dedicação e paciência, e a Mariana Menezes que está sempre disposta a ajudar, me ensinando com paciência e dedicação e sendo amiga, a Mirelli dos Santos por sua energia contagiante e Danilo Andrade por seus conselhos.

Agradeço a Caroline dos Santos, mas uma amiga que a universidade me deu, a quem eu recorro também quando o desespero vem, e assim, compartilhamos as dificuldades e nós apoiamos sempre quando necessário.

A todos os professores do curso RGV, que foram importantes na minha vida acadêmica, no meu desenvolvimento, sendo pacientes, verdadeiros mestres, me mostrando que o conhecimento é tudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) por me acolher novamente e a EMBRAPA por abrir a portas me mostrando novas experiências, me proporcionando conhecimentos valiosos, que irão ser a base da minha vida profissional. O local que se tornou minha segunda residência.

Meus sinceros agradecimentos!

EPÍGRAFE

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota" (Madre Teresa de Calcutá).

SUMÁRIO

RESUMO..... 9

ABSTRACT.....10

INTRODUÇÃO
.....11

REFERENCIAL TEÓRICO
.....12

CAPÍTULO 1. FLUTUABILIDADE E VIABILIDADE DE SEMENTES DE *Musa acuminata* 20

1. Introdução 26

2. Material e métodos 29

3. Resultados 32

4. Discussão 36

4. Conclusão 37

5. Referências 38

CAPÍTULO 2. CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE BANANEIRA 40

1. Introdução.....42

2. Material e métodos 44

3. Resultados 47

4. Discussão 52

5. Conclusão 54

6. Referências 54

VIABILIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Musa acuminata*

Autora: Eliane da Silva Braulio

Orientadora: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientadora: Maria Inês de Souza Mendes

RESUMO:

Uma das estratégias do programa de melhoramento da bananeira é gerar híbridos diploides que reúnam características de interesse relacionadas à resistência a doenças, qualidade do cacho e do fruto, tamanho da planta, entre outras. Assim, anualmente é obtido um elevado número de sementes, cada uma representando um híbrido com potencial para utilização em cruzamentos visando a geração de novas cultivares. Dado que, por limitações de espaço e capacidade de avaliação, não é possível cultivar todos os híbridos obtidos no campo, é importante estabelecer condições para a conservação a longo prazo. Nesse sentido, a criopreservação pode fornecer condições ideais para a conservação a longo prazo das sementes de bananeira. O presente trabalho tem como objetivos validar a flutuabilidade como técnica para identificação de sementes viáveis, caracterizar sementes e embriões de híbridos diploides de bananeira, e estabelecer um protocolo para a criopreservação de sementes de híbridos diploides de bananeira. A viabilidade das sementes foi testada com base na flutuabilidade, as sementes e o embrião foram classificados com base na presença ou ausência de anormalidades. Verificou-se que a capacidade de flutuação pode ser considerada um teste válido para indicar a viabilidade das sementes, sendo as sementes não flutuantes viáveis e a maioria das sementes flutuantes inviáveis. Calcutta e o híbrido CNPMF0542 apresentaram, respectivamente, 96,67% e 92,67% de sementes viáveis, e o híbrido CNPMF0731 apresentou o menor percentual de sementes viáveis (65%). Embora anomalias no embrião possam interferir na sua germinação, percentagens consideráveis de germinação podem ser encontradas em diferentes classes de embriões. Para a criopreservação, amostras de sementes do diplóide selvagem (Calcutta) e dos dois híbridos diplóides melhorados foram dessecadas em bancada e em sílica gel (1, 3, 5 e 7 dias), bem como em nitrato de magnésio, nitrato de sódio e sais de cloreto de sódio (7 dias). As sementes foram então armazenadas em nitrogênio líquido por 24 horas, seguido de excisão embrionária e cultivo in vitro. Em geral, a criopreservação estimulou a germinação dos embriões, resultando em maiores taxas de germinação em comparação com sementes não criopreservadas. As sementes dos três diplóides estudados foram tolerantes à dessecação e exibiram taxas de germinação embrionária acima de 65% após o congelamento. Portanto, a criopreservação poderá se tornar uma importante ferramenta para a conservação das sementes de bananeira, apoiando o programa de melhoramento genético.

Palavras-chaves: Banana, diploides, conservação, flutuação

VIABILITY AND CRYOPRESERVATION OF *Musa acuminata* SEEDS

ABSTRACT:

One of the strategies of the banana breeding program is to generate diploid hybrids that combine desirable traits such as disease resistance, bunch and fruit quality, and plant size, among others. Each year, a large number of seeds are produced, with each seed representing a hybrid with potential for use in further crossings aimed at developing new cultivars. Due to space and evaluation limitations, it is not feasible to grow all the hybrids obtained in the field, making it essential to establish long-term conservation conditions. In this regard, cryopreservation can provide ideal conditions for the long-term conservation of banana seeds. The present study aims to validate buoyancy as a technique for identifying viable seeds, to characterize seeds and embryos of diploid banana hybrids, and to establish a protocol for cryopreservation of diploid hybrid banana seeds. Seed viability was tested based on buoyancy, and seeds and embryos were classified according to the presence or absence of abnormalities. It was found that the buoyancy test can be considered a valid predictor of seed viability, with non-floating seeds being viable and most floating seeds being non-viable. Calcutta and hybrid CNPMF0542 showed 96.67% and 92.67% viable seeds, respectively, while hybrid CNPMF0731 had the lowest percentage of viable seeds (65%). Although abnormalities in the embryo can interfere with its germination, significant germination rates can still be achieved in different embryo classes. For cryopreservation, seed samples from the wild diploid (Calcutta) and two improved diploid hybrids were desiccated using bench drying and silica gel (1, 3, 5, and 7 days), as well as magnesium nitrate, sodium nitrate, and sodium chloride salts (7 days). The seeds were then stored in liquid nitrogen for 24 hours, followed by embryo excision and in vitro culture. Overall, cryopreservation stimulated embryo germination, resulting in higher germination rates compared to non-cryopreserved seeds. The seeds of the three diploids showed desiccation tolerance and exhibited embryo germination rates above 65% after freezing. Therefore, cryopreservation may become an important tool for the conservation of banana seeds, supporting the genetic improvement program.

Key-words: Banana, diploids, conservation, floatage

INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* sp.) é uma fruta tropical de máximo consumo *in natura* no Brasil e no mundo (AGRIANUAL, 2019), se destacando como fonte de energia e de potássio, e por seus usos tradicionais e comerciais (MASEKO et al., 2024). No Brasil, a produção estimada de banana em 2023 foi de 6.840.817 toneladas (IBGE, 2024).

Originárias do Sudeste Asiático, a evolução das cultivares de banana se deu com base em cruzamentos naturais envolvendo espécies diploides de *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B) (SIMMONDS, 1955), constituindo, dessa forma, uma grande base de diversidade genética. Essa diversidade confere valiosa fonte de variabilidade a serem utilizadas nos programas de melhoramento genético de bananeira para criação de variedades. Em contexto mundial, estima-se que existem cerca de 1.200 variedades sendo tanto cultivares comerciais (Cavendish), quanto outras variedades que podem ser menos conhecidas ou utilizadas em contextos locais (THIERRY, 2020). Algumas bananas silvestres apresentam sementes com pouco ou nenhum endosperma, além de anomalias causadas pela ausência e/ou deformação do embrião (Silva et al., 2019). Essas sementes podem ser classificadas em quatro categorias: presença de embrião e endosperma (PP), presença de embrião e ausência de endosperma (PA), ausência de embrião e presença de endosperma (AP), e ausência de ambos (AA). Silva et al. (2019) também propõem uma classificação detalhada dos embriões presentes nas sementes, utilizando a seguinte escala: (1) embrião normal; (2) embrião com base deformada; (3) base do embrião ausente; (4) embrião com ápice deformado; (5) ápice do embrião ausente; (6) embrião com base e ápice deformados; (7) embrião com sinais de oxidação; e (8) embrião normal, porém de tamanho reduzido.

Considerando essas diferentes categorias de sementes e embriões de bananeira, é fundamental avaliar a viabilidade das sementes, com o objetivo de otimizar o protocolo de germinação in vitro de embriões, aumentando sua eficiência. Conforme relatado por Uma et al. (2011), sementes que flutuam geralmente apresentam algum tipo de anormalidade, como a ausência de embrião e/ou endosperma, quando submersas em água. Assim, o teste de flutuabilidade tem sido utilizado como uma técnica prática para inferir a viabilidade das sementes. A conservação do germoplasma de *Musa* é fundamental para a preservação da variabilidade genética e para o melhoramento genético da cultura. A criopreservação (conservação em temperaturas ultrabaixas de -150 a -196°C) tem sido um dos métodos eficazes de armazenamento a longo prazo de material vegetal,

especialmente p ela manutenção da integridade genética de materiais criopreservados, uma vez que, sob condições criogênicas todos os processos metabólicos nos sistemas biológicos são momentaneamente interrompidos (BI et al., 2017; REED, 2017; SINGH et al., 2019).

Embora a propagação da bananeira seja preferencialmente por propagação vegetativa, alguns genótipos produzem sementes naturalmente (polinização aberta) ou mediante cruzamentos controlados. Na Embrapa Mandioca e Fruticultura, o programa de melhoramento da bananeira vem adotando estratégias que têm proporcionado a obtenção de um elevado número de sementes. Dada a impossibilidade de testar toda a progênie em um mesmo período, devido à limitação de espaço nos campos experimentais e de mão de obra, uma alternativa é criopreservar as sementes para posterior uso. A criopreservação apresenta vantagens por ser um método de baixo custo e por manter as características genéticas, físicas e fisiológicas das sementes durante longo prazo (PANIS et al., 2020), dispensando o controle periódico da viabilidade dessas sementes, e exigindo pouca mão de obra, além de permitir a utilização desse germoplasma de forma planejada e a longo prazo.

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivos, a caracterização de sementes e embriões de híbridos diploides de bananeira e estabelecimento de um protocolo para a criopreservação das sementes.

REFERENCIAL TEÓRICO

A cultura da bananeira

A família Musaceae compreende três gêneros, *Musa*, *Ensete* e *Musella*, dos quais o gênero *Musa* é o mais diverso, com mais de 75 espécies e subespécies descritas (HÄKKINEN, 2013; KALLOW et al., 2021; MERTENS et al., 2021). Bananas e plátanos pertencem ao gênero *Musa* e incluem cultivares de suma importância por seu valor comercial, agronômico e nutricional.

Originárias do Sudeste Asiático, a evolução das cultivares de banana se deu com base em cruzamentos naturais envolvendo espécies diploides de *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B) (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955), constituindo, dessa forma, uma grande base de diversidade genética. Essa diversidade confere uma valiosa fonte de variabilidade utilizada nos programas de melhoramento genético para criação de novas variedades. No contexto global, estima-se que existem

cerca de 1.200 variedades, incluindo tanto cultivares comerciais, como a popular 'Cavendish', quanto outras variedades que podem ser menos conhecidas ou utilizadas em contextos locais (AMORIM et al., 2011, 2013; THIERRY, 2020).

A bananeira é uma planta herbácea, deposta de caule vegetativo aéreo, expondo folhas imbricadas umas nas outras, com caule subterrâneo ou rizoma, sendo está uma estrutura vital da bananeira, a partir da qual ocorre a formação das raízes, folhas, inflorescências e rebentos ou "filhotes" (KLUGE, 1988). As bananeiras possuem flores que estão dispostas em inflorescência, são estruturalmente bissexuais, mas, porém, funcionam como unissexuais. As inflorescências da bananeira encontram-se nas extremidades dos caules e são compostas por brácteas e flores, tanto masculinas quanto femininas. Durante a floração, as flores femininas são mantidas e darão origem aos frutos, enquanto as flores masculinas são descartadas pela planta. Nas flores femininas as anteras são atrofiadas, possuem o filamento mais curto e o pólen é degenerado (DZOYEM et al., 2024), o gineceu é longo, tricarpelar, trilocular tendo vários óvulos por lóculos, estilete único e estigma trilobado (KLUGE, 1988). Opostamente, nas flores masculinas o ovário é atrofiado, o estilete é esguio, as anteras são normais e os sacos polínicos dispostos ao longo do filamento em duas linhas paralelas (INTA et al., 2023). Na inflorescência masculina, chamada "coração", à medida que acontece a antese as brácteas se abrem exibindo as flores, logo em seguida elas secam e caem, formando um eixo denominado de ráquis masculina onde se observam as almofadas, como são denominadas as cicatrizes florais (INTA et al., 2023; SAU et al., 2023).

As flores masculinas da bananeira apresentam cerca de 6 cm de comprimento com cinco estames com anteras, estilete e estigma bem desenvolvidos, tépala livre oposta ao tapete composto, ovário malsucedido muito pequeno, com cerca de um quarto da parte do comprimento da flor de bananeira. As flores masculinas e femininas de bananeira podem produzir néctar abundante e o pólen tem a propriedade de aderir, como adesivo, propondo uma polinização biótica (SUKKAEWMANEE, 2019).

Os frutos são geralmente alongados, cilíndricos e um pouco curvados, podem apresentar de 3 a 40 cm de comprimento e 2 a 8 cm de diâmetro e o ápice apresenta forma cônica, arredondada ou sem corte (PUSHPANEVI et al., 2019).

Embora as bananas comestíveis sejam partenocárpicas e propagadas vegetativamente, algumas espécies silvestres produzem elevado número de sementes (PUTEH et al., 2011). As sementes de banana são capazes de sobreviver com baixo teor de água, mas apresentam um tipo distinto de dormência e podem desenvolver dormência

secundária durante o armazenamento prolongado (Kallow et al., 2020). Com o passar dos meses, a viabilidade das sementes tende a diminuir, assim como o vigor das plântulas resultantes (Bohra et al., 2020). As sementes de bananeira apresentam formato irregular, geralmente achatadas, de cor acinzentada a acastanhada, e possuem um embrião, com endosperma circundado por dois tegumentos (o externo com múltiplas camadas e o interno fino), que protegem a semente durante a maturação, dispersão e dormência (CHIN, 1996). As sementes podem apresentar anormalidades devido à ausência ou deformação do embrião e/ou endosperma, o que pode interferir na capacidade de germinação. Sabe-se que a flutuabilidade das sementes de bananeira tem uma relação direta com a viabilidade das mesmas (PANIS et al., 1997). As sementes que flutuam quando imersas em água, geralmente apresentam algum tipo de anormalidade, na maioria dos casos, ausência do embrião e/ou endosperma (UMA et al., 2011). Uma classificação para as anormalidades nas sementes e embriões de bananeira foi proposta por Silva et al. (2019).

Melhoramento genético da bananeira

No gênero *Musa*, as principais características selecionadas durante a trajetória do estado silvestre para o domesticado são a partenocarpia, que consiste na capacidade de desenvolvimento do fruto sem a necessidade de polinização prévia, e a esterilidade (SIMMONDS, 1962; DENHAM et al., 2020). A maioria das cultivares comerciais de banana são triploides estéreis, sendo os frutos sem sementes desenvolvidos por partenocarpia (SILVA et al., 2013).

O programa de melhoramento genético de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura foi iniciado em 1976, visando a obtenção de cultivares com potencial agronômico, vigorosas e resistentes às principais doenças (causadas por bactérias, vírus e fungos), nematoides e pragas, que apresentem frutos palatáveis e com boas características pós-colheita (AMORIM et al., 2013). A primeira etapa do programa se refere à obtenção de diploides melhorados que reúnam características de interesse como a resistência a doenças, melhor vigor, tamanho dos frutos, número de pencas, entre outras. Os diploides melhorados são selecionados e utilizados para o cruzamento com as cultivares triploides, para geração de cultivares tetraploides (AMORIM et al., 2016). A maioria dos híbridos diploides desenvolvidos pela Embrapa são resistentes à murcha de *Fusarium* e às Sigatokas amarela e negra (GONÇALVES et al., 2019; SANTANA et al.,

2024). Contudo, a segunda etapa do melhoramento genético da bananeira apresenta dificuldades pela baixa produção de sementes em cultivares triploides comerciais quando em cruzamentos com diploides (SILVA et al., 2013).

A terceira etapa no melhoramento convencional constitui no cruzamento das cultivares tetraploides com diploides melhorados visando a obtenção de híbridos triploides (AMORIM et al., 2016) e um grande número de sementes é obtido, em função da regularidade na meiose em ambos os parentais e assim a fertilização ocorre normalmente.

Devido à dificuldade na obtenção de sementes nas hibridações com cultivares triploides, especialmente as do subgrupo Cavendish, estratégias apoiadas pela cultura de tecidos e biologia molecular têm sido utilizadas visando o desenvolvimento de novas cultivares, tais como: duplicação de cromossomos (COSTA et al., 2011; AMARAL et al., 2015; BORGES et al., 2016), variação somaclonal (REBOUÇAS et al., 2021; HOU et al., 2022; FERREIRA et al., 2024); mutagênese (CHEN et al., 2013; HASIM et al., 2021), e mais recentemente CRISPR/Cas9 (TRIPATHI et al., 2021, LEH et al., 2023).

Criopreservação

A criopreservação consiste no armazenamento de material biológico a temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido (NL -196°C). Sendo um método complementar para os tradicionais métodos de conservação de germoplasma em campo e in vitro, permitindo que recursos vegetais sejam preservados de forma segura, em um espaço reduzido e com mínima manutenção (BENSON, 2008a; ENGELMANN, 2011; BETTONI, 2018). A vantagem da criopreservação é que, uma vez que o material tenha sido resfriado com sucesso à temperatura do nitrogênio líquido, ele pode ser conservado, em princípio, indefinidamente, porque nessas temperaturas ultrabaixas não ocorrem processos metabólicos, sendo esta a principal vantagem. Nessa técnica é preferível o uso de tecidos como, por exemplo, meristemas principalmente, quando o objetivo é manter as características da planta matriz (BI et al., 2017; WANG et al., 2014), mas também podem ser criopreservados sementes e grãos de pólen.

A capacidade de tecidos vegetais sobreviverem a criopreservação depende de sua tolerância à desidratação e a temperatura do nitrogênio líquido, sendo necessário o desenvolvimento de protocolos para cada espécie. Uma variedade de protocolos de

criopreservação foi desenvolvida para diferentes tipos de materiais; sementes, embriões, pólen, suspensão celular e ápices caulinares de diferentes espécies vegetais (PANIS, 2019).

Os protocolos de criopreservação de bananeira foram relatados pela primeira vez em culturas de suspensão embriogênica usando um método de congelamento lento (PANIS, WITHERS e DE LANGHE, 1990). Essa técnica consiste na desidratação por congelamento, deixando menos água possível nas células para evitar a formação de cristais de gelo letais, após a exposição a temperaturas extremamente baixas.

A técnica de vitrificação é um método simples e aplicável, com protocolos que envolvem um certo grau de desidratação antes do congelamento, pela exposição das amostras a uma solução altamente concentrada de crioprotetor para retirar a maior parte da água congelável (ENGELMANN, 2000). No protocolo de vitrificação, meristemas de tamanho de 1 mm são excisados sob o microscópio, expostos às soluções crioprotetoras, solução de carregamento e Solução de Vitrificação de Planta 2 (PVS2). Na sequência, são transferidos para um pequeno pedaço de alumínio, o qual é rapidamente mergulhado em nitrogênio líquido para armazenamento. Após o armazenamento, eles são rapidamente reaquecidos e recultivados em meio de crescimento específico. O protocolo de vitrificação de gotículas desenvolvido para meristemas de bananeira pode hoje ser considerado como o primeiro método "genérico" de criopreservação para tecidos vegetais, já que foi aplicado com sucesso a diferentes tecidos (culturas de brotos/embriões) e a uma ampla variedade de plantas, espécies de diferentes ambientes climáticos (PANIS et al. 2011).

Singh et al. (2021) desenvolveram protocolos utilizando sementes/embriões zigóticos de *Ensete glaucum*, um parente silvestre da banana, para conservação de germoplasma de curto (1–2 anos) e longo prazo (>2 anos), investigando morfologia e conteúdo de água das sementes, dessecação e criosensibilidade, e condições ideais para conservação de germoplasma, usando cultura de tecidos e técnicas de criopreservação. O trabalho mostrou que em *E. glaucum*, tanto as sementes quanto os embriões zigóticos excisados são altamente passíveis de criopreservação, por simples desidratação ao ar (~ 5 a 10% MC), proporcionando germinação dos embriões em torno de 75-100% após o tratamento com NL. Além de mostrar no protocolo de conservação combinado, que sementes dessecadas submetidas ao armazenamento em NL e depois descongeladas e mantidas à temperatura ambiente em pacotes selados a vácuo, não perderam viabilidade, mesmo até 1 ano (~ 90% de germinação) (SINGH et al., 2021).

Outro fator a se considerar na criopreservação é a integridade do material conservado. Durante a criopreservação, agentes crioprotetores (ACPs), são fundamentais para o alcance de resultados satisfatórios (SUZUKI et al., 2018), pois evitam a formação de cristais de gelo dentro das células.

Criopreservação de sementes

As sementes são geradas pelo processo de reprodução sexual de plantas, no qual promovem a variabilidade genética da população e manutenção da biodiversidade. Sendo assim a conservação de sementes pode ser uma forma eficiente de conservação *ex situ* de plantas (LIU et al., 2020). Além de estar disponível a qualquer momento que se é desejado.

A produção de sementes oriundas de cruzamentos em *Musa* é variável e dependente da ploidia e dos parentais envolvidos nos cruzamentos, sendo maior em diploides, seguido dos tetraploides e triploides (SILVA et al., 2013). A maioria das bananas domesticadas são triploides, com três conjuntos de cromossomos e são partenocárpicas, os frutos não possuem sementes, porém, existem variedades diploides que são partenocárpicas e possuem frutos comestíveis, a exemplo da 'Ouro'.

Já as bananeiras silvestres são diploides e produzem frutos não comestíveis cheios de sementes viáveis, enquanto, as bananeiras triploides são cultivadas por partenocarpia, o que as tornam parcialmente estéreis, uma vez que há uma fertilidade residual onde é possível obter sementes, mas na maioria das vezes, são incapazes de produzirem sementes viáveis (PUTEH et al., 2011).

Sabe-se da existência de mais de 50 espécies de banana silvestre, mas duas espécies são conhecidas pelo seu papel na domesticação da maioria das bananas comestíveis que são elas *Musa acuminata* e *M. balbisiana*, (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955; PERRIER et al., 2009). Nestas espécies, encontram-se uma variabilidade genética com características importantes para o melhoramento genético, especialmente para fins de obtenção de genótipos com resistência aos principais agentes fitopatógenos (SURYANT et al., 2018). No programa de melhoramento há diferentes estratégias usadas para o desenvolvimento de cultivares: 1) Cruzamento de triploides com diploides silvestre ou melhorados; 2) Cruzamento de tetraploides com diploides silvestre ou melhorados; 3)

Duplicação de cromossomos de diploides superiores; e 4) Indução de mutação (AMORIM et al., 2016).

A variabilidade genética é um dos aspectos presentes em sementes adquiridas a partir de cruzamentos específicos, o que se constitui em uma fase importante para o estabelecimento do programa de melhoramento genético (SURYANT et al., 2018). Como resultado destes cruzamentos um volume elevado de sementes é obtido. Devido à falta de disponibilidade de área experimental para avaliar todos os híbridos obtidos, somente poucas amostras das sementes das diferentes progênies são germinadas e levadas a campo onde são selecionados os melhores genótipos. A criopreservação pode constituir uma eficiente técnica para superar essas limitações, por apresentar longevidade de conservação, além de outras vantagens, como o baixo custo de armazenamento, espaço físico reduzido e baixa probabilidade de contaminação por fungos e bactérias. Essa técnica baseia-se no armazenamento de material genético biológico vegetal ou animal a temperaturas ultrabaixas (-196 °C) por períodos longos, sem perda de viabilidade, para uso futuro no melhoramento genético ou para a conservação de recursos genéticos vegetais (VINEESH et al., 2015).

Nas últimas décadas, estudos de criopreservação apontam evolução em vários gêneros de plantas e, atualmente, vem sendo considerado um método adequado para conservação a longo prazo de material vegetal, especialmente pela manutenção da integridade genética de materiais criopreservados (BI et al., 2017; REED, 2017). O sucesso da criopreservação em sementes depende do baixo teor de água nas sementes, a fim de promover a desidratação e evitar a formação de cristais de gelo, que podem levar a rupturas mecânicas na parede celular, no sistema de membranas, e consequente perda da capacidade germinativa. Em estudo com diferentes espécies de do gênero *Musa*, KAYA et al. (2020) verificaram que o melhor conteúdo de água para tolerância à criopreservação variou de 15,8% (*Musa acuminata* ssp. *zebrina*) a 17,1% (*M. ornata*). Além disso, observaram que há uma correlação positiva entre conteúdo de água e percentagem de germinação.

Contudo, cada método de conservação tem vantagens e desvantagens. Deste modo, são necessárias estratégias complementares para uma conservação máxima da diversidade genética, variando de acordo com cada espécie (MARTIN; PRADEEP, 2003).

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. 24. ed. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2019. 449 p.

AMARAL, C. M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O.; LEDO, C. A. S.; AMORIM, E. P. Agronomic characterization of autotetraploid banana plants derived from 'Pisang Lilin' (AA) obtained through chromosome doubling. **Euphytica**, v. 202, p. 435–443, 2015.

AMORIM, E. P.; AMORIM, VANUSIA B. O.; SILVA, S. O.; PILLAY, M. Quality improvement of cultivated *Musa*. In: Michael Pillay; Abdou Tenkouano. (Org.). Banana Breeding: Progress and Challenges. **New York:** CRC Press, p. 252-280, 2011.

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

AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; SILVA, S. O. Melhoramento genético. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. (1ª Ed.). **O agronegócio da banana**, Brasília, DF: Embrapa, p. 171-200, 2016.

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In Plant Cryopreservation, A Practical Guide, B. M. Reed, ed. (**New York: Springer**), p. 15–32, 2008b.

BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, p. 141-219, 2008a.

BETTONI, J. C.; DALLA COSTA, M.; SOUZA, J. A. VOLK, G. M.; NICKEL, O.; SILVA, F. N. KRETZSCHMAR, A. A. Cryotherapy by encapsulation-dehydration is effective for in vitro eradication of latent viruses from 'Marubakaido' apple rootstock. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 1-7, 2018.

BI, W. L.; PAN, C.; HAO, X. Y.; CUI, Z. H.; KHER, M. M.; MARKOVIĆ, Z. WANG, Q. C.; SILVA, J. A. T. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.): a review. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology: Plant**, v. 53, p. 449-460, 2017.

BORGES, V. P.; MARQUES, T.S.; REIS, A. S.; OLIVEIRA, N. H. C.; JESUS, J. A.; SILVEIRA, D. G.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O.; LEDO, C. A. S.

Desenvolvimento *in vitro* de bananeira 'Ouro' após poliploidização com antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, p.1789-1793, 2016.

Bohra, P., Waman, A. A., & Jerard, B. A. (2020). Seed germination and storage studies in seed-fertile *Musa indandamanensis* and its conservation. ***South African Journal of Botany***, v. 128, p. 161-166, 2020

CHEN, Y. F.; CHEN, W.; HUANG, X.; HU, X.; ZHAO, J. T.; GONG, Q.; LI, X. J.; HUANG, X. L. Fusarium wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-cross-section cultural system. **Plant Pathology**, v.62, p.112–119, 2013.

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

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. O.; SILVA NETO, H. P.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 805- 813, 2011.

DENHAM, T.; BARTON, H.; CASTILLO, C., CROWTHER, A., DOTTE-SAROUT, E., FLORIN, S. A.; PRITCHARD, J.; BARRON, A.; ZHANG, Y.; FULLER, D. Q. The domestication syndrome in vegetatively propagated field crops. **Annals of Botany,** v. 125, p. 581–597, 2020.

DZOYEM, C. U. D., KAPUKU, L. I., NDIANG, Z., TCHABONG, G. R. N., YOUMBI, E., & BAKRY, F. Suppression of female flowers and pollen fertility of male flowers of banana plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 58, n. AA, p. 03376, 2024.

ENGELMANN, F. Importance of Cryopreservation for the Conservation of Plant Genetic Resources. In: Engelmann F, Takagi H (Eds). **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm:** Current Research Progress and Application, IPGRI, Rome. p. 8-20, 2000.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant**, v. 47, p. 5-16, 2011.

FERREIRA, M.S.; REBOUÇAS, T.A.; ROCHA, A.J.; OLIVEIRA, W.D.S.; SANTOS, A.C.L.S.; JESUS, J.P.F.L.; RAMOS, A.P.S.; FERREIRA, C.F.; SANTOS-SEREJO, J.A.; HADDAD, F; AMORIM, E.O. Selection and characterization of somaclonal variants of Prata banana (AAB) resistant to Fusarium wilt. **Agronomy**, v.14, p.1740, 2024.

GONÇALVES, Z, S.; HADDAD, F.; AMORIM. V, B. O.; FERREIRA, C. F.; OLIVEIRA, S. A. S.; AMORIM E, P. Agronomic characterization and identification of banana genotypes resistant to Fusarium wilt race 1. **Eur J Plant Patho**l, v. 155, p. 1093–1103, 2019.

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

HOU, B-H.; TSAI, Y.-H.; CHIANG, M.-H.; TSAO, S.-M.; HUANG, S.-H.; CHAO, C.-P.; CHEN, H.M. Cultivar-specific markers, mutations, and chimerisim of Cavendish banana somaclonal variants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. Genomics, v. 23, p:470, 2022.

HASIM, A. A.; SHAMSIAH, A.; HUSSEIN, S. Induced mutations using gamma ray and multiplication of plantlet through micro cross section culture of banana (*Musa acuminata* cv. Berangan). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.757, p.012007, 2021.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2024. Disponível em < https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=CONSUMO+DE+BANANA Acesso: 16 fevereiro. 2024.

INTA, W.; TRAIPERM, P.; RUCHISANSAKUN, S.; JANSSENS, S. B.; VIBOONJUN, U.; SWANGPOL, S. C. Evolution and Classification of Musaceae Based on Male Floral Morphology. **Plants,** v. 12, n. 8, p. 1602, 2023.

KALLOW, S., MERTENS, A., JANSSENS, S., VANDELOOK, F., DICKIE, J. B., SWENNEN, R., e PANIS, B. Banana seed genetic resources forfood security: Status, constraints, and future priorities. **Food and Energy Security**, v. 11, n. 1, e 345, 2021.

KAYA, E., SOUZA, F. V. D., DOS SANTOS-SEREJO, J. A., e GALATALI. Influence of dehydration on cryopreservation of Musa spp. germplasm. **Acta Botanica Croatica**, v. 79, n. 2, p. 99-104, 2020.

KALLOW, S., LONGIN, K., SLEZIAK, N. F., JANSSENS, S. B., VANDELOOK, F., DICKIE, J., ... E PANIS, B. Challenges for ex situ conservation of wild bananas: seeds collected in Papua New Guinea have variable levels of desiccation tolerance. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1243, 2020.

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

LEH, L.S., MAZUMDAR, P., TAN, B.C.; PUAA, T. L.; HARIKRISHNA, J. A. Establishment of a PEG-assisted protoplast transfection system in *Musa acuminata* cv. Berangan (AAA) using a CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complex. **Biology Bulletin**, v. 50 (Suppl 3), S298–S309, 2023.

LIU, U., COSSU, T. A., DAVIES, R. M., FOREST, F., DICKIE, J. B., e BREMAN, E. Conserving orthodox seeds of globally threatened plants ex situ in the Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK: the status of seed collections. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 9, p. 2901–2949, 2020.

MARTIN, K. P.; PRADEEP, A. K. Simple strategy for the in vitro conservation of *Ipsea malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 197-200, 2003.

MASEKO, K. H., REGNIER, T., MEIRING, B., WOKADALA, O. C., & ANYASI, T. A. Musa species variation, production, and the application of its processed flour: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 325, p. 112688, 2024.

MERTENS, A., BAWIN, Y., ABEELE, S. V., KALLOW, S., VU, D. T., LE, L. T.,VU, T. D., SWENNEN, R., VANDELOOK, F., PANIS, B., e JANSSENS, S. B. Genetic diversity and structure of *Musa balbisiana* populations in Vietnam and its implications for the conservation of banana crop wild relatives. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6, e 0253255, 2021.

PANIS B. Sixty years of plant cryopreservation: from freezing Hardy mulberry branches to establishing reference crop collections for future generations **Acta Horticulturae**, n. 1234, p. 1–8, 2019.

PANIS, B.; PIETTE, B.; ANDRÉ, E.; VAN DEN HOUWE, I.; SWENNEN, R. Droplet vitrifcation: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? **Acta**

Horticulturae. International Society for Horti-cultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp. 157–162, 2011.

PANIS, B.; NAGEL, M.; VAN DEN HOUWE, I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen. **Plants**, v. 9, p. 1634, 2020.

PANIS, B.; VANDENBRANDEN, K.; SCHOOFS, H.; SWENNEN, R.. Conservation of banana germplasm through cryopreservation. In: **International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species** Part 2 461 (pp. 515-521), 1997.

PANIS, B.; WITHERS, L. A.; DE LANGHE, E. A. L. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. **Journal article**, n. 11, p. 337-350, 1990.

PERRIER, X., BAKRY, F., CARREEL, F., JENNY, C., HORRY, J.P., LEBOT, V., e HIPPOLYTE, I. Combining biological approaches to shed light on the evolution of edible bananas. **Ethnobot. Res. Applic**. v. 7, p. 199–216, 2009.

PUTEH, A. B.; ARIS, E. M.; SINNIAH, U. R.; RAHMAN, Md. M.; MOHAMAD, R.B.; ABDULLAH, N. A. P. Seed anatomy, moisture content and scarification influence on imbibitions in wild banana (*Musa acuminata* Colla) ecotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 14373-14379, 2011.

PUSHPANEVI, C.; VESAGAPERUNAL, D. VINEETH, C. A review on banana blossom: the heart of banana **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n.11, 2019.

REBOUÇAS, T.A.; ROCHA, A. J. ; CERQUEIRA, T.S.; ADORNO, P.R. ; BARRETO, R.Q.; FERREIRA, M.S.; MORAIS-LINO, L. S.; AMORIM, V.B.O.; SANTOS-SEREJO, J.A.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P. Pre-selection of banana somaclones resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, subtropical race 4. **Crop Protection**, v. 147, p. 105692, 2021.

REED, B. M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. **In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant**, v. 53, p. 285-288, 2017.

SANTANA, W. S.; ROCHA, A.J.; SILVA, W. B.; AMORIM, V. B. O.; RAMOS, A.P.S.; HADDAD, F.; AMORIM, E.P. Selection of improved banana diploid resistant to

Fusarium oxysporum f. sp. cubense Races 1 and Subtropical 4. **Agronomy-Basel**, v. 14, p. 1277, 2024.

SAU, S.; BHATTACHARJEE, P.; KUNDU, P.; MANDAL, D. Banana. In Tropical and Subtropical Fruit Crops. **Apple Academic Press**, p. 1-62, 2023.

SILVA, M. D. S.; RODRIGUES, T. C.; AUD, F. F.; SANTOS-SEREJO, J. A. D.; E AMORIM, E. P. Illustrated guide to the classification of banana seeds and embryos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, p. e-089, 2019.

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

SIMMONDS, N. W. The evolution of the bananas. In: **The evolution of the bananas** (1962).

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

SINGH, S., THANGJAM, R., HARISH, G. D., SINGH, H., KUMAR, R., MEENA, D. P. S., & Agrawal, A. Conservation protocols for *Ensete glaucum*, a crop wild relative of banana, using plant tissue culture and cryopreservation techniques on seeds and zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 144, 195-209 2021.

SINGH, S.; MALHOTRA, E. V.; MEENA, D. P. S.; TYAGI, R. K. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Clonally Propagated Horticultural Species. In: **Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources**. Rajasekharan, P., RAO, V., EDS.; Springer: New York, NY, USA, 2019; pp. 529–578, 2019.

SURYANT, B.; RASYIDI, M.N.A.; SYAHMAN, M.D.A.; MAIMUN, T.; SHUKRI, M.A.M. In vivo and in vitro germination of *Musa violascens* and *Musa borneensis* seeds. **Plant Physiology**, v. 25, p. 164-170. 2018.

SUZUKI, A. B. P. JUNIOR BERTONCELLI, D., ALVES, G. A. C., de FARIA, R. T. Criopreservação de sementes da orquídea brasileira em extinção *Cattleya granulosa* Lindl. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 2, p. 146-150, 2018.

SUKKAEWMANEE, P. Pollen Morphology of Native Banana Cultivar (*Musa acuminata* Colla) in Surat Thani Province. International **Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 49-52, 2019.

THIERRY, L. Banana genetic diversity. **FruiTrop**, n. 269, p. 98 - 102, 2020.

TRIPATHI, J.N.; NTUI, V.O.; SHAH, T.; TRIPATHI, L. CRISPR/Cas9-mediated editing of DMR6 orthologue in banana (*Musa* spp.) confers enhanced resistance to bacterial disease. **Plant Biotechnology Journal**, v.19, p.1291–1293, 2021.

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

VINEESH, P. S.; SKARIA, R.; MUKUNTHAKUMAR, S.; PADMESH, P.; DECRUSE, S. W. Seed germination and cryostorage of *Musa acuminata* subsp. burmannica from Western Ghats. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 158–163, 2015.

WANG, B.; WANG, R. R.; CUI, Z. H.; BI, W. L.; LI, J. W.; LI, B. Q.; OZUDOGRU, E. A.; VOLK, G. M.; WANG, Q. C. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 583-595, 2014.

CAPÍTULO 1

FLUTUABILIDADE E VIABILIDADE DE SEMENTES DE *Musa acuminata*

RESUMO

As sementes de banana apresentam variação quanto ao tamanho, a forma e a cor, a depender da espécie e cultivar. Além dessas variações, as sementes e os embriões de banana podem apresentar diferentes classificações de acordo com a sua composição e forma, o que pode influenciar diretamente na capacidade germinativa, ocasionando limitações à germinação de embriões obtidos por meio do programa de melhoramento genético da cultura. Os objetivos deste estudo foram validar a flutuabilidade como técnica para determinação da viabilidade das sementes de bananeira e avaliar a germinação in vitro de diferentes classes de embriões de sementes de bananeira. Foram utilizadas sementes de um diploide silvestre (Calcutta) e dois diploides melhorados (CNPMF0542 e CNPMF0731). As sementes foram retiradas da polpa e lavadas em água corrente e, posteriormente, foi realizado o teste de flutuabilidade das sementes em água, separando as sementes que flutuaram daquelas que não flutuaram. Em seguida as sementes foram desinfestadas, procedendo-se ~~a~~ o resgate e classificação dos embriões. Os embriões foram cultivados em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento. Verificou-se que a flutuabilidade pode ser considerada como um teste válido para indicação da viabilidade das sementes, sendo que as não flutuantes são viáveis e flutuantes na sua maioria são inviáveis. Calcutta e o híbrido CNPMF0542 apresentaram, respectivamente, 96,67% e 92,67% de sementes viáveis, e o híbrido CNPMF0731 apresentou a menor porcentagem de sementes viáveis (65%). Embora anormalidades no embrião possam interferir na sua germinação, percentuais germinativos consideráveis podem ser encontrados nas diferentes classes de embriões.

Palavras-chave: Banana, embrião, germinação in vitro.

FLOATION CAPACITY AND VIABILITY OF *Musa acuminata* SEEDS

ABSTRACT:

Seeds of bananas exhibit variation in size, shape and color, depending on the species and cultivar. In addition to these variations, banana seeds and embryos can be classified differently based on their composition and morphology, which may directly influence germination capacity, thus imposing limitations on the germination of embryos obtained through genetic improvement programs. The objectives of this study were to validate the flotation capacity as a technique for determining the viability of banana seeds and to evaluate the in vitro germination of different classes of banana seed embryos. Fruits from one wild diploid (Calcutta) and two improved diploids (CNPMF0542 and CNPMF0731) were used. Seeds were extracted from the pulp and washed in running water, followed by a flotation test in water to separate floating seeds from those that sank. Subsequently, the seeds were disinfected, and embryo rescue and classification were performed. The embryos were cultured in MS medium without growth regulators. It was determined that flotation can be considered a valid test for indicating seed viability, as non-floating seeds are mostly viable, while floating seeds are predominantly non-viable. Calcutta and hybrid CNPMF0542 exhibited viability rates of 96.67% and 92.67%, respectively, whereas hybrid CNPMF0731 showed the lowest percentage of viable seeds at 65%. Although abnormalities in the embryo may interfere with germination, considerable germination percentages can be observed across different embryo classes.

Keywords: Banana, embryo, in vitro germination.

1. INTRODUÇÃO

As sementes de banana podem variar quanto ao tamanho, a forma e a cor, a depender da espécie e cultivar, exibindo forma irregular, geralmente achatada, coloração de acinzentada até amarronzada, e casca envolvida por uma membrana escariosa que proporciona rigidez (CHIN 1996; VINEESH et al., 2015). Em um corte longitudinal da semente podemos observar que a mesma possui tegumento externo e interno, embrião, endosperma, massa calazal, capa da micrópila e cana. As camadas de tegumento protegem a semente durante a maturação, dispersão e dormência (SILVA et al. 2019). A dormência nas sementes de bananeira pode ser atribuída as suas características que conferem algumas barreiras físicas, incluindo impermeabilidade e rigidez do tegumento, e barreiras fisiológicas relacionadas ao desequilíbrio ou inibição por substâncias de crescimento e caracterizadas pela carência ou crescimento impróprio do tegumento do embrião e do endosperma. Essas barreiras dificultam a germinação das sementes de bananeira em condições de cultivo in vivo (BASKIN e BASKIN, 2004; DAYARANI et al., 2011). O resgate de embrião vem se tornando a melhor forma de superar esse obstáculo, o que melhorou significativamente a germinação em comparação à semeadura convencional de sementes (WILSON e TENKOUANO, 2019). A técnica de resgate de embriões consiste no cultivo in vitro do embrião, promovendo a superação da dormência de sementes e regeneração de plântulas (UMA et al., 2011).

De acordo com a presença ou ausência do endosperma e do embrião as sementes de banana podem ser classificadas em: embrião e endosperma presentes (PP); embrião presente e endosperma ausente (PA); embrião ausente e endosperma presente (AP) e embrião e endosperma ausentes (AA). Os mesmos autores classificam os embriões presentes nas sementes utilizando a seguinte escala proposta: 1. Embrião normal; 2. Embrião com base deformada; 3. Base do embrião ausente; 4. Embrião com ápice deformado; 5. Ápice do embrião ausente; 6. Embrião com base e ápice deformados; 7. Embrião com oxidação; e 8. Embrião normal, mas pequeno (SILVA et al. 2019).

Diante das diferentes categorias apresentadas pelas sementes e embriões da bananeira, é importante a determinação da viabilidade das mesmas, no sentido de adequação do protocolo in vitro de germinação de embriões de forma a aumentar a sua eficiência. Uma técnica que vem sendo empregada para deduzir se as sementes estão viáveis é a imersão dessas em água, observando-se a flutuabilidade das sementes, sendo descartadas as que flutuam, pois podem não apresentar embrião ou endosperma (UMA et

al., 2011). Entretanto, na literatura não há registro de estudos que comprovem se embriões com deformidades estão aptos a germinar. Diante disso, o objetivo deste estudo foi caracterizar as sementes e embriões de diploides de bananeira e avaliar a capacidade de germinação in vitro dos diferentes tipos de embriões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do trabalho ocorreu no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Foram coletados frutos muito maduros, e retiradas as sementes de um diploide silvestre, Calcutta, e dois diploides melhorados gerados pelo programa de melhoramento genético da Embrapa, CNPMF0542 e CNPMF0731, não foi registrado a quantidade de frutos.

2.1 Coleta das sementes e teste de flutuabilidade

As sementes de banana foram retiradas da polpa de frutos maduros e lavadas em água para a remoção de restos de polpa aderidos à superfície das sementes. Posteriormente foi feito o teste com ajuda de um béquer de 250 ml com água, sendo agitada por alguns minutos com ajuda de uma espátula, onde foram separadas as sementes flutuantes das não flutuantes (Figura 1), sendo posteriormente colocadas em papel toalha para retirar o excesso de umidade.

2.2 Desinfestação superficial das sementes

Após a separação das sementes flutuantes e não flutuantes e a retirada do excesso de água, as sementes de banana foram transferidas para câmara de fluxo laminar, onde as mesmas foram desinfestadas com álcool 70% durante cinco minutos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), sendo metade de agua destilada estéril e outra metade hipoclorito de sódio 1%, acrescido de algumas gotas L^{-1} de Tween 20® por 30 minutos, , finalizando-se o processo a partir de uma tríplice lavagem com água destilada estéril, a desinfestação das sementes flutuantes e não flutuantes foram feitos separadamente.

.

Figura 1. Teste de flutuabilidade de sementes de bananeira. A. Retirada das sementes do fruto; B. lavagem em água corrente para retirar polpa aderida à superfície da semente; C. Imersão em água para separação de sementes que flutuam e sementes não flutuantes.

2.3 Resgate dos embriões

Após o processo de desinfestação das sementes, realizou-se o resgate de embriões para classificar as sementes e os embriões de banana. Os embriões são excisados das sementes sobre um papel estéril com o auxílio de um estereoscópio, utilizando pinça e bisturi em câmara de fluxo laminar. Ao romper a semente, foi possível visualizar sua estrutura interna e realizar a classificação da mesma quanto a presença e ausência de embrião e endosperma. Quando o embrião se fez presente, procedeu-se a sua classificação.

2.4 Classificação das sementes

Os embriões resgatados foram classificados de acordo com as categorias estabelecidas por Silva et al. (2019). Quatro classes foram propostas para as sementes: A) PP: Embrião e endosperma presentes; B) PA: Embrião presente e endosperma ausente; C) AP: Embrião ausente e endosperma presente; D) AA: Embrião e endosperma ausentes.

Somente foram selecionadas para o resgate de embriões as sementes das classes PP e PA. Esse critério assegura que apenas as sementes com embriões viáveis, essenciais para o desenvolvimento das plântulas, sejam utilizadas, maximizando as chances de sucesso no cultivo e no melhoramento genético. Os embriões foram classificados em: 1. Embrião normal; 2. Embrião com a base deformada; 3. Embrião com a base ausente; 4. Embrião com o ápice deformado; 5. Embrião com ápice ausente; 6. Embrião com base e ápice deformados; 7. Embrião oxidado; e 8. Embrião normal de tamanho reduzido (Figura 2).

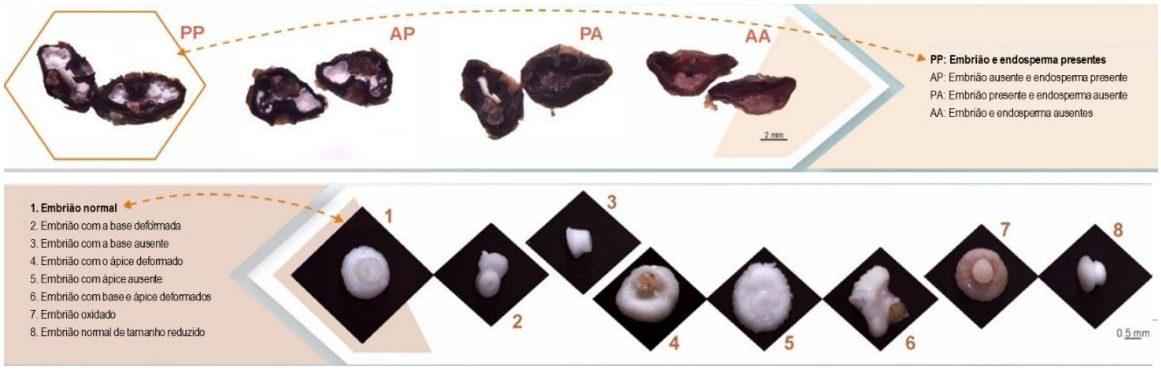


Figura 2. Classificação de sementes e embriões de bananeira. (Adaptado de Silva et al., 2019).

2.5 Cultivo in vitro dos embriões

Os embriões depois de excisados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962). Os embriões foram incubados em câmaras BOD com alternância de temperatura com fotoperíodo de 16h de luz a 30ºC e 8h escuro a 20ºC, onde foram avaliados por 20 dias quanto à germinação. Após esse período as plântulas foram fotografadas e avaliadas quanto ao peso da massa fresca (mg) e o número de raízes.

2.6. Delineamento experimental e análises estatísticas

Os delineamentos experimentais foram inteiramente casualizados, em esquema fatorial 2 x 4 x 3 (2 classificações de flutuabilidade, 4 classes de sementes e 3 diploides) para caracterização de sementes, com 3 repetições contendo 100 sementes cada. A caracterização dos embriões foi analisada em esquema fatorial 2 x 8 x 3 (2 classificações de flutuabilidade, 8 classes de embriões e 3 diploides), com número de embriões variável de acordo com a sua ausência ou presença na semente, em 3 amostras de 100 sementes.

Os dados de porcentagem de cada classe de semente flutuantes e não flutuantes, de cada classe de embrião oriundos de sementes flutuantes e não flutuantes e de germinação dos embriões de diferentes classes foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias dos fatores flutuabilidade e classes de sementes comparadas pelos testes F da ANAVA e Tukey, respectivamente, e as médias do fator classe de embriões, agrupadas pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R.

3. RESULTADOS

Sementes não flutuantes (NF) dos três genótipos diploides de bananeira avaliados, Calcutta, CNPMF0542 e CNPMF0731, apresentaram maior porcentagem de sementes na classificação embrião e endosperma presente (PP), indicando que estas sementes têm maior viabilidade e potencial para germinação. Os resultados mostram que, nesses genótipos diploides, a maioria das sementes não flutuantes contém tanto embrião quanto endosperma, essenciais para o desenvolvimento inicial da planta. As demais classes não revelaram diferenças estatísticas entre os percentuais de sementes obtidos (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de porcentagens de classes de sementes em diploides de *M. acuminata* de acordo com a flutuabilidade.

Classificação	Calcutta		CNPMF 0542		CNPMF 0731	
	NF	F	NF	F	NF	F
PP	96,67 aA	3,67 cB	92,67 aA	13,67 bB	65,00 aA	0,67 bB
PA	0,00 Bb	16,67 bA	0,67 bA	6,00 bA	2,67 bA	2,00a bA
AP	3,33 Ba	1,00 cA	3,00 bA	1,33 bA	3,33 bA	33,33 aA
AA	0,00 Bb	78,67 aA	3,67 bB	79,00 aA	29,00 bA	64,00 aA

PP: Embrião e endosperma presentes; PA: Embrião presente e endosperma ausente; AP: Embrião ausente e endosperma presente; AA: Embrião e endosperma ausentes; NF: Não flutuante; F: Flutuante. Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As sementes flutuantes (F), por sua vez, apresentaram maiores médias na classificação de sementes , embrião e endosperma ausentes (AA) em todos os genótipos estudados. Este resultado indica que as sementes que flutuam tendem a ser inviáveis, já

que a ausência do embrião e do endosperma impossibilita a germinação e o desenvolvimento da planta. Portanto, flutuação pode ser um indicador de sementes defeituosas ou menos densas, provavelmente devido à falta de conteúdo interno necessário para o crescimento.

Sementes de Calcutta classificadas como PP foram encontradas em maior percentual nas não flutuantes (96,67%) indicando uma alta viabilidade, pois essas sementes contêm embrião e endosperma. Enquanto que, neste diploide sementes classificadas como PA e AA foram encontradas em maior número nas sementes flutuantes (16,67% e 78,67%, respectivamente), sugerindo uma menor viabilidade, especialmente para as sementes classificadas como AA, que são consideradas inviáveis devido à ausência tanto do embrião quanto do endosperma. A média de sementes classificadas como AA encontradas não diferiram de acordo com a flutuabilidade das mesmas, o que indica que a viabilidade dessas sementes é consistentemente baixa, independentemente da sua capacidade de flutuação.

Para o diploide melhorado CNPMF0542 um percentual elevado de sementes classificadas como PP foi obtido nas sementes não flutuantes (92,67%), reforçando a tendência de que sementes não flutuantes são geralmente mais viáveis. Já as sementes classificadas como AA foram mais frequentes em sementes flutuantes (79%), confirmando a relação negativa entre a flutuabilidade e a viabilidade. Para as sementes classificadas como PA e AP, não houve variação estatística nas médias de acordo com a flutuabilidade.

O diploide melhorado CNPMF0731 apresentou menor percentagem de sementes não flutuantes com classificação PP (65,00%) e maior frequência de sementes classificadas como AA (29%), em comparação aos demais diploides avaliados. Com relação às sementes flutuantes, este diploide apresentou 97,33 % de sementes sem embrião (classes AP e AA) (Tabela 1).

A classificação do embrião em sementes não flutuantes e flutuantes é apresentada na Tabela 2. A classe 8 (embriões de formato normal mas pequeno) não foi observada em nenhum dos genótipos. As sementes não flutuantes (NF) dos três diploides avaliados (Calcutta, CNPMF0542 e CNPMF0731) com classificação 1 (normal) apresentaram maior média (93,08%, 91,29% e 44,56%, respectivamente), isso sugere que a maioria das sementes viáveis e de alta qualidade está entre as sementes não flutuantes.

Tabela 2. Médias de porcentagens de classes de embriões de diploides de bananeira de *M. acuminata* de acordo com a flutuabilidade.

Classificação do embrião	Calcutta		CNPMF 0542		CNPMF 0731	
	NF	F	NF	F	NF	F
1	93,08 aA	0,00 cA	91,29 aA	23,80 aB	12 44,56 aA	0,00 Bb
2	1,06 bB	,75 bA	2,08 bA	16,67 aA	4,25 bA	0,00 Ba
3	0,00 bA	0,00 cA	1,42 bB	0,96 bA	3,32 bA	0,00 bA
4	4,11 bA	1,96 cA	2,65 bA	7,62 bA	6,64 bA	16,66 bA
5	0,00 bA	0,00 cA	0,69 bA	0,00 bA	15,24 bB	66,68 aA
6	1,75 bB	60,98 aA	1,87 bB	26,19 aA	18,94 bA	0,00 bB
7	0,00 bB	15,31 bA	0,00 bB	24,76 aA	7,05 bA	16,66 bA
8	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA

1. Embrião normal; 2. Embrião com base deformada; 3. Base do embrião ausente; 4. Embrião com ápice deformado; 5. Ápice do embrião ausente; 6. Embrião com base e ápice deformados; 7. Embrião com oxidação; e 8. Embrião normal, mas pequeno. Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Já nas sementes flutuantes (F) os diploides Calcutta e CNPMF0542 apresentaram em maior percentual (60,98% e 26,19%, respectivamente) embriões de classe 6 (base e ápice deformado), enquanto que o diploide melhorado CNPMF0731 a maioria das sementes apresentaram embrião da classe 5 (ápice do embrião ausente).

Os embriões das sementes flutuantes só apresentaram germinação para o acesso CNPMF0542 nas classes 2 e 3 (16 e 100%, respectivamente) e para o acesso CNPMF0731 no tipo de embrião 4 (100%) (dados não tabelados), embora a germinação das sementes flutuantes seja geralmente baixa, apresentam embriões deformados, mas que germinam.

A germinação in vitro de diferentes classes de embriões oriundos de sementes não flutuantes é apresentada na Tabela 3. As sementes não flutuantes tendem a ser mais viáveis e possuem um maior potencial para germinação. Nota-se que mesmo embriões com deformidades podem germinar, como ocorreu com embriões de classe 3 (base do embrião ausente) observados nos híbridos CNPMF0542 (83,33%) e CNPMF 0731 (25%). Apenas embriões das classes 7 e 8 não germinaram.

Os embriões normais (classe 1) não flutuantes do diploide Calcutta e CNPMF0542 apresentaram elevada taxa de germinação (70,00% e 73,33%, respectivamente), o que indica, que ambos os diploides têm uma alta capacidade de germinação, refletindo sua viabilidade. Já o genótipo CNPMF0731 que mostrou menor porcentagem de sementes com embrião (Tabela 1) e maioria das sementes com

anormalidades no embrião (Tabela 2), também apresentou baixa taxa de germinação in vitro do embrião normal ou com deformidades (Tabela 3).

Tabela 3. Médias de porcentagem de germinação de diferentes classes de embriões oriundos de sementes de diploides de *M. acuminata* que não flutuaram.

Classe do embrião	Calcutta	CNPMF 0542	CNPMF 0731
1	70,00 aA	73,33 aA	30,00 aB
2	0,00 cB	66,67 aA	0,00 bB
3	0,00 cB	83,33 aA	25,00 aB
4	11,11 bA	27,77 bA	15,00 aA
5	0,00 cA	0,00 cA	8,33 bA
6	33,33 bB	100,00 aA	0,00 bB

1. Embrião normal; 2. Embrião com base deformada; 3. Base do embrião ausente; 4. Embrião com ápice deformado; 5. Ápice do embrião ausente; 6. Embrião com base e ápice deformados. Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Os dados mostram uma superioridade para embrião do tipo 1 e 4, e a C alcutta. Mas não houve diferença estatística para o número de raízes e peso fresco nas diferentes classes de embriões e os diferentes diploides estudados (Tabela 4). Isso sugere que, embora a capacidade de germinação varie entre as classes de embriões e entre os genótipos, o desenvolvimento subsequente das plântulas, medido pelo número de raízes e pelo peso fresco, não é afetado por esses fatores. Portanto, uma vez que os embriões germinam, o crescimento inicial das plântulas tende a ser uniforme, independentemente da classificação do embrião ou do genótipo de origem.

Tabela 4. Médias de número de raízes e peso fresco (mg) de plântulas oriundas de diferentes classes de embriões de bananeira de *M. acuminata*.

Classe do embrião	Número de raízes	Peso fresco (mg)
1	3,74 a	0,0278 a
2	0,00 a	0,0030 a
3	0,25 a	0,0048 a
4	4,30 a	0,0112 a
5	1,00 a	0,0192 a
6	1,87 a	0,0137 a
Genótipo	Número de raízes	Peso fresco (mg)
Calcutta	2,85 a	0,0207 a
CNPMF0542	2,08 a	0,0119 a
CNPMF0731	2,33 a	0,0166 a

1. Embrião normal; 2. Embrião com base deformada; 3. Base do embrião ausente; 4. Embrião com ápice deformado; 5. Ápice do embrião ausente; 6. Embrião com base e ápice deformados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F da ANAVA, a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

A capacidade de flutuação e a presença de embrião e endosperma são critérios importantes para avaliar a qualidade e a viabilidade das sementes de bananeira (SILVA et al., 2019).

Estudos realizados por Buregyeya et al. (2023) confirmam que a flutuação das sementes está diretamente relacionada à sua densidade e viabilidade, sendo que as sementes não flutuantes geralmente apresentam maior qualidade fisiológica. Esses autores demonstraram que o teste de gravidade da água, utilizado para diferenciar sementes submersas (viáveis) de flutuantes (não viáveis), revelou que uma quantidade substancial de sementes flutuava. Entre as sementes submersas, que externamente apresentavam tegumentos duros e pretos, apenas 39% continham embriões, com uma variação de 24% a 60%. Destas, 22% germinaram, com uma faixa de 0% a 37%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Kurniajati et al. (2024) em frutos de bananeiras silvestre, os mesmos destacaram a importância da presença de endosperma para o sucesso da germinação em sementes.

Foi possível verificar no presente estudo a influência negativa da deformidade dos embriões na germinação de sementes de bananeira diploides. Resultados semelhantes foram observados por Ongagna et al (2020).

Em estudos sobre a qualidade de sementes em *Juniperus polycarpos* (DANESHVAR et al., 2017) e *Schinus molle* L. (Demelash et al., 2003), a flutuação foi utilizada como um indicador de viabilidade de sementes.

Embora a maioria das sementes de banana que não flutuam seja viável, uma proporção considerável de embriões apresenta deformidades. Isso sugere a presença de variação genética ou de fatores ambientais que podem afetar a qualidade das sementes (SINGH et al., 2021).

O presente estudo mostrou que embriões com deformidades também podem germinar, independente da classe do embrião ou do genótipo. Esses achados podem guiar a seleção de sementes viáveis em bananeira, o que é de grande importância para o programa de melhoramento.

A correlação entre a qualidade do embrião e a viabilidade das sementes foi também abordada por Burgos-Hernández et al. (2014), que enfatizaram a importância de características morfológicas dos embriões na determinação do sucesso germinativo.

Esses resultados são relevantes para práticas de cultivo e seleção de sementes, pois indicam que, apesar das diferenças na capacidade de germinação, todas as plântulas têm potencial para desenvolver-se de maneira semelhante após a germinação. Isso pode simplificar o processo de seleção de sementes, permitindo que se priorize a germinação inicial sem a necessidade de preocupação com o desempenho subsequente das plântulas em termos de número de raízes e peso fresco.

4. CONCLUSÃO

A flutuabilidade das sementes pode ser considerada um teste válido para separação de sementes de bananeira viáveis (não flutuantes) e não viáveis (flutuantes), podendo as sementes flutuantes ser descartadas, pois raramente possuem embrião normal, mas são capazes de germinar. As sementes não flutuantes deste estudo, especialmente aquelas com embriões classificados como classe 1, mostraram maior capacidade de germinação.

5. REFERÊNCIAS

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

BUREGYEYA, H.; OYESIGYE, N.; AMUMPAIRE, D.; NAMANYA, P. B.; NOWAKUNDA, K.; TUSHEMEREIRWE, W. K.; KAMURA, E.; RUBAIHAYO, P. Female Reproductive Potential and 3x by 2x Breeding Approach for Hybrid Seeds Development in *Sukali Ndizi* Genotype (Musa genome AAB). **European Journal of Agriculture and Food Sciences**, v. 5, n. 3, p. 5-11, 2023.

BURGOS-HERNÁNDEZ, M.; CASTILLO-CAMPOS, G.; MATA-ROSAS, M.; GONZÁLEZ, D.; VOVIDES, A. P.; MURGUÍA-GONZÁLEZ, J. Seed germination of the wild banana *Musa ornata* (Musaceae). **Seed Science and Technology**, v. 42, n. 1, p.

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

DAYARANI, M.; DHANARAJAN, M. S.; UMA, S.; GOMATHI, M. **Conservation of wild bananas (*Musa* spp.) through seeds and improved regeneration through seed treatments.** International Conference on Green Technology and Environmental Conservation (GTEC, 2011), p. 188-190.

DANESHVAR, A.; TIGABU, M.; KARIMIDOOST, A.; ODÉN, P. C. Flotation techniques to improve viability of Juniperus polycarpos seed lots. **Journal of Forestry Research,** v. 28, n. 231-239, 2017.

DEMELASH, L.; TIGABU, M.; ODÉN, P. C. Enhancing germinability of *Schinus molle* L. seed lot from Ethiopia with specific gravity and IDS techniques. **New Forests**, v. 26, 33-41, 2003.

KURNIAJATI, W. S.; AHMAD, F., MARTANTI, D.; HERLINA, H.; WITJAKSONO, W.; POERBA, Y. S. Hybridization compatibility of wild and cultivated bananas (*Musa* spp.). **In AIP Conference Proceedings** (Vol. 2957, No. 1). AIP Publishing, 2024.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497, 1962.

ONGAGNA, A.; DZOKOUODZOYEM, C. U.; YOUMBI, E.; BAKRY, F. Positive effect of in vitro embryo rescue on breaking the dormancy of wild banana seeds compared to direct sowing in the greenhouse. **Fruits,** v. 75, n. 5, p. 194-203, 2020.

SILVA, M. D. S.; RODRIGUES, T. C.; AUD, F. F.; SANTOS-SEREJO, J. A. D.; AMORIM, E. P. Illustrated guide to the classification of banana seeds and embryos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, e-089, 2019.

SINGH, S.; AGRAWAL, A.; KUMAR, R.; THANGJAM, R.; JOHN, K. J. Seed storage behavior of *Musa balbisiana* Colla, a wild progenitor of bananas and plantains-implications for *ex situ* germplasm conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 280, 109926, 2021.

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

VINEESH, P. S., SKARIA, R., MUKUNTHAKUMAR, S., PADMESH, P., & DECRUSE, S. W. Seed germination and cryostorage of *Musa acuminata* subsp. burmannica from Western Ghats. **South African Journal of Botany**, *100*, 158-163, 2015.

WILSON, V; TENKOUANO. Effects of storage and priming on seed emergence in soil and embryo culture of *Musa acuminata* Calcutta 4. **Asian Plant Research Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2019.

CAPÍTULO 2

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE BANANEIRA

RESUMO

A criopreservação de sementes de híbridos de bananeira é importante para o programa de melhoramento, uma vez que cruzamentos entre diploides para desenvolvimento de genótipos melhorados que reúnam características de interesse pode gerar um elevado número de sementes. A impossibilidade de avaliação simultânea de toda a progênie, seja por limitação de espaço, recursos ou mão de obra, exige que as sementes sejam armazenadas por um período de tempo. A criopreservação é uma técnica indicada para conservação de material vegetal a longo prazo. Assim, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo para a criopreservação de sementes de híbridos de diploides de bananeira. Foram utilizadas sementes um diploide silvestre, Calcutta, e dois híbridos melhorados desenvolvidos no programa de melhoramento da bananeira da Embrapa, CNPMF0542 e CNPMF0731. As sementes foram submetidas aos tratamentos: controle (sementes recém colhidas, sem dessecar); dessecação sobre bancada e em sílica gel por períodos de 1, 3, 5 e 7 dias; e em sais de nitrato de magnésio, nitrato de sódio e cloreto de sódio por 7 dias. Após a dessecação, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido por 24 horas, procedendo-se o resgate e cultivo do embrião. A comparação entre os períodos de dessecação em bancada e em sílica evidencia que a sílica reduziu o conteúdo de água mais rapidamente do que na condição de bancada para todos os diploides. A criopreservação aumentou a percentagem de germinação de embriões in vitro de sementes controle (não dessecadas) dos dois híbridos avaliados. Entretanto, após a dessecação, a porcentagem de germinação de embriões de sementes não congeladas e as que passaram pelo processo de crio não diferiu significativamente, com exceção da dessecação em bancada do híbrido CNPMF0731 que apresentou uma maior germinação após a crio. As sementes submetidas à dessecação em sais por 7 dias não apresentaram perda de conteúdo de água elevado, mas os embriões germinaram após o congelamento em nitrogênio líquido. O tempo médio de germinação dos embriões não variou significativamente entre os tratamentos nem entre os genótipos com uma média de 9 a 12 dias. As plântulas de Calcutta se apresentaram mais vigorosas, com maior número de raízes e peso fresco da plântula, quando comparado com os híbridos melhorados. As sementes de bananeira diploide toleram a dessecação até níveis inferiores a 5% de conteúdo de água antes da criopreservação, sem afetar a capacidade de germinação in vitro dos embriões, podendo até estimular a germinação após a criopreservação. O tratamento de dessecação em sílica gel por 7 dias forneceu os melhores resultados para as variáveis de germinação e desenvolvimento dos embriões.

Palavras-chave: dessecação, conteúdo de água, congelamento em nitrogênio líquido

ABSTRACT:

The cryopreservation of seeds from banana hybrids is crucial for genetic improvement programs, as crossings between diploid species to develop enhanced genotypes with desirable traits can result in a large number of seeds. The simultaneous evaluation of the entire progeny is often limited by factors such as space, resources, or labor, making it necessary to store the seeds for extended periods. Cryopreservation is a suitable technique for the long-term conservation of plant material. Thus, this study aims to establish a protocol for the cryopreservation of seeds from diploid banana hybrids. Seeds from one wild diploid, Calcutta, and two improved hybrids developed in the Embrapa banana breeding program, CNPMF0542 and CNPMF0731, were used. The seeds underwent the following treatments: control (freshly harvested seeds, not desiccated); desiccation on a bench and in silica gel for periods of 1, 3, 5, and 7 days; and in salts of magnesium nitrate, sodium nitrate, and sodium chloride for 7 days. After desiccation, the samples were stored in liquid nitrogen for 24 hours, followed by embryo rescue and cultivation. The comparison between the desiccation periods on the bench and in silica showed that silica reduced the water content more quickly than the bench condition for all diploids. Cryopreservation increased the percentage of in vitro germination of embryos from control seeds (non-desiccated) for both evaluated hybrids. However, after desiccation, the percentage of germination of embryos from non-frozen seeds and those subjected to cryopreservation did not differ significantly, except for the bench desiccation of the hybrid CNPMF0731, which showed a higher germination rate after cryopreservation. Seeds subjected to desiccation in salts for 7 days did not exhibit significant loss of water content, but the embryos did germinate after freezing in liquid nitrogen. The average germination time of the embryos did not vary significantly between treatments or between genotypes, averaging 9 to 12 days. The Calcutta seedlings were more vigorous, showing a greater number of roots and fresh weight compared to the improved hybrids. Diploid banana seeds tolerate desiccation to levels below 5% water content before cryopreservation without affecting the in vitro germination capacity of the embryos, which may even stimulate germination after cryopreservation. The silica gel desiccation treatment for 7 days provided the best results for germination and embryo development variables.

Keywords: desiccation, water content, freezing in liquid nitrogen

1. INTRODUÇÃO

As bananas de consumo alimentício são partenocárpicas e estéreis, características que dificultam o melhoramento genético da cultura, contudo as espécies silvestres, apesar de não serem comestíveis, produzem sementes e são empregadas nos programas de melhoramento para obtenção de híbridos com características desejáveis (SILVA et al., 2013).

A produção de sementes é essencial para o melhoramento genético convencional da bananeira, que envolve a hibridação de genótipos diploides, tanto silvestres quanto melhorados, com variedades comerciais triploides e tetraploides (SILVA et al., 2013). No entanto, a qualidade e a preservação dessas sementes enfrentam desafios, como a limitação em quantidade e o tempo de armazenamento. A criopreservação se apresenta como uma tecnologia eficaz, garantindo a viabilidade das sementes a longo prazo e mantendo a diversidade genética necessária para o desenvolvimento de novas cultivares (BI et al., 2017.; KAYA et al., 2020). Essa técnica é vital diante de ameaças como pragas e mudanças climáticas, permitindo o armazenamento seguro de germoplasma e contribuindo para a segurança alimentar e a sustentabilidade na produção de bananas. Em bananeira, o cultivo in vitro de embriões consiste em uma técnica de cultura de tecidos que promove a superação da dormência de sementes e regeneração de plântulas a partir da excisão do embrião e introdução do mesmo em meio de cultura (UMA et al., 2011).

A forma mais comum de preservação de sementes é a conservação ex situ, sendo que elas são a unidade de propagação da maioria das espécies de plantas. Em meio as técnicas de conservação, a criopreservação se destaca por manter a viabilidade das sementes por um longo prazo (PANIS e LOMBARDI, 2005). Além de uma longa conservação, a criopreservação em nitrogênio líquido (NL, -196°C) apresenta como vantagens baixos custo de armazenamento, espaço físico reduzido e baixa possibilidade de contaminação (REIS e CUNHA, 1997; CAMILLO et al., 2009).

Pesquisas em criopreservação de sementes vem avançando e vários protocolos de conservação de sementes ortodoxas e recalcitrantes têm sido desenvolvidos (WETZEL et al., 2003; PRITCHARD e NADARAJAN, 2008; WALTERS et al., 2008). Por serem classificadas como ortodoxas, as sementes de bananeira podem ser desidratadas a um teor baixo de umidade, inferior a 7% e armazenadas por longos períodos a temperaturas abaixo de zero (ROBERTS, 1973). Kallow et al. (2020) relatam que *Musa balbisiana* é amplamente considerada como possuindo um comportamento de armazenamento

ortodoxo, o que permite que suas sementes sejam dessecadas e armazenadas a baixas temperaturas sem comprometer a viabilidade. Por outro lado, o comportamento de armazenamento de subespécies de *Musa acuminata* mostrou-se mais heterogêneo, frequentemente oscilando entre as categorias ortodoxa e intermediária. Isso significa que algumas sementes de *M. acuminata* são capazes de sobreviver à dessecação e ao congelamento, enquanto outras apresentam maior sensibilidade, perdendo viabilidade em condições similares.

A dessecação das sementes é um fator importante já que interagem na extensão da viabilidade da semente. Assim, no armazenamento de semente a dessecação é crucial, uma vez que elas necessitam alcançar um nível de umidade ideal para manter a viabilidade (WETZEL et al., 2003). Por tanto a água precisa ser retirada antes do congelamento, para que o conteúdo de água seja baixo o suficiente para evitar danos causados pelos cristais de gelo, mas não tão reduzido a ponto de causar danos fisiológicos, tornando inviável a semente e ao congelamento. Durante o congelamento, se a água nas sementes não for removida adequadamente, cristais de gelo podem se formar e romper as membranas celulares, causando danos irreversíveis. Entretanto, uma dessecação excessiva também pode ser prejudicial, levando à desidratação extrema, perda da função enzimática e comprometimento da atividade metabólica essencial para a germinação. O equilíbrio é fundamental, a semente deve ter pouca água para evitar a formação de gelo, mas não tão pouca a ponto de comprometer as funções vitais das células e inviabilizar o processo de reidratação e germinação. No entanto, faz-se necessário adaptar um protocolo em relação a sua resistência ao congelamento (PANIS 2009).

Por tanto, diante do exposto, o objetivo do trabalho é estabelecer um protocolo com condições determinadas de período e ambiente de desidratação de sementes de bananeira de forma a viabilizar o processo de criopreservação, o que auxiliará no programa de melhoramento da cultura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Foram utilizadas sementes de um diploide silvestre Calcutta e dois diploides (CNPMF0542 e CNPMF0731).

As sementes foram extraídas manualmente da polpa de frutos muito maduros não foi contabilizado a quantidade de fruto, mas cada diploide foi colhido no mesmo dia (abril de 2024) e lavadas em água corrente para remover a polpa aderida ao revestimento da semente. Em seguida, as sementes foram secas ao ar, em temperatura ambiente, em folhas de papel de toalha para retirada do excesso de água. Posteriormente, as sementes foram submetidas ao teste rápido de viabilidade por meio da flutuabilidade das mesmas, sendo consideradas inviáveis as sementes flutuantes. As sementes classificadas como viáveis foram posteriormente usadas para estudos de conteúdo de água, dessecação, criopreservação e germinação in vitro.

2.2 Dessecação de sementes de banana

O conteúdo de água das sementes antes e depois da dessecação foi determinado com base no peso úmido (ISTA, 2016), no qual, dez sementes foram pesadas com exatidão em balança analítica e secas a 103 °C por 16 h em estufa de ar quente. O teor de umidade foi calculado em 10 amostras em triplicata, usando a fórmula:

$$Conteúdo\ de\ água = \frac{Peso\ fresco - Peso\ seco}{Peso\ fresco}\ X\ 100$$

As sementes foram pesadas antes e depois da dessecação e submetidas aos seguintes tratamentos: controle sem dessecar, secagem sobre bancada por períodos de 1, 3, 5 e 7 dias; secagem em sílica gel por períodos de 1, 3, 5 e 7 dias e secagem em sais de nitrato de magnésio (Umidade Relativa da Atmosfera, URA = 53%), nitrato de sódio (URA 64%) e cloreto de sódio (URA 75%) por 7 dias (Figura 1).

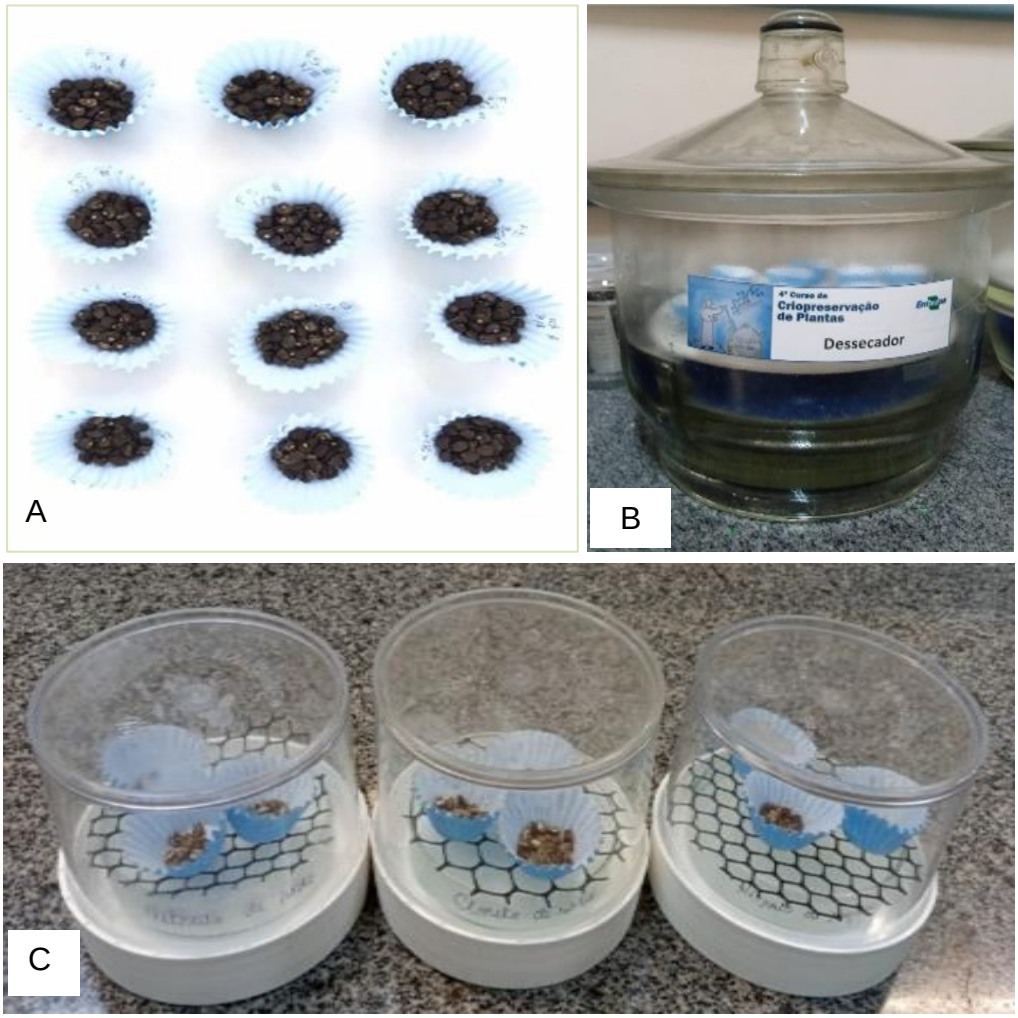


Figura 1. Tratamentos de dessecação das sementes do diploide de *Musa acuminata*: A) Secagem das sementes em bancada; B) Secagem das sementes em sílica gel; C) Secagem das sementes em sais de nitrato de magnésio, nitrato de sódio e cloreto de sódio.

Para o preparo da solução salina saturada, adicionou-se uma quantidade de sal suficiente para ocupar ¾ da altura da placa de Petri de 9 cm de diâmetro (150 g), e em seguida adicionou-se água até que o sal se tornasse úmido, sendo a solução acondicionada em recipientes hermeticamente fechados por 48 horas, procedendo-se a retirada do excesso de água com uma pipeta descartável durante esse período.

2.3 Criopreservação de sementes de banana

Após a dessecação, amostras de cada tratamento (3 repetições contendo 10 sementes cada) foram acondicionadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido por 24 horas. Em seguida, as sementes foram submetidas ao descongelamento em água esterilizada a temperatura ambiente por 2 min, com agitação constante. Posteriormente,

foram desinfestadas mediante imersão em álcool 70% durante cinco minutos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), acrescido de algumas gotas L^{-1} de Tween 20® por 30 minutos, sendo metade de água destilada estéril e outra metade hipoclorito de sódio1%, finalizando-se o processo a partir de um tríplice lavagem com água destilada estéril, e uma tríplice lavagem com água destilada estéril.

Como controle, foram utilizadas amostras de cada tratamento, porém sem ser submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido.

2.4 Excisão e cultivo in vitro do embrião

Os embriões de cada controle e tratamento (embrião das sementes dessecadas sem passar no nitrogênio líquido e as sementes criopreservadas) foram excisados e cultivados em placas de Petri (15 x 60 mm) contendo 10 ml do meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 2,4 g L^{-1} de Phytagel®. As placas contendo os embriões foram transferidos para câmaras BOD em regimes de fotoperíodo com alternância de temperatura, 16h claro a 30 ºC e 8h escuro a 20ºC. A porcentagem de germinação dos embriões foi registrada diariamente, durante 20 dias e o desenvolvimento das plântulas ao final desse período foi determinado mediante o peso fresco e o número de raízes.

2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Foram analisadas as variáveis: conteúdo de água, taxa média de germinação, tempo médio de germinação e coeficiente de velocidade de germinação de acordo com método adotado por Ranal et al. (2006), e o número de raízes e peso da plântula (mg). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 12 x 2 x 3 (12 tratamentos, 2 condições de conservação (com criopreservação e sem criopreservação) e 3 genótipos), com três repetições (cada uma composta por uma placa de Petri, contendo 10 embriões), totalizando em 72 unidades experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), no programa estatístico R, sendo as médias dos fatores tratamentos e condições de criopreservação comparados pelo teste de Skott-Knott e Tukey, respectivamente a 5% de significância.

3. RESULTADOS

Os tratamentos de diferentes ambientes e períodos de dessecação forneceram respostas variadas de germinação e desenvolvimento de embriões nos diploides estudados. A comparação entre os períodos de dessecação em bancada e em sílica evidencia que a sílica reduziu o conteúdo de água mais rapidamente do que na condição de bancada (Tabela 1). Para o diploide silvestre (Calcutta), o conteúdo de água inicial de 23,44% foi reduzido a 8,59% e 6,10% após um dia em bancada e sílica, respectivamente. No diploide melhorado CNPMF0542, o conteúdo de água se manteve praticamente invariável, mesmo após 7 dias em bancada, mas em sílica reduziu quase à metade (de 12,94% para 6,69%) com um dia de dessecação, chegando a 4,8% após 7 dias de dessecação. Comportamento semelhante foi observado no diploide melhorado CNPMF0731, em que o conteúdo de água foi reduzido significativamente de 12,94% (controle) para 10, 995 e 6,15% após um dia em bancada e em sílica, respectivamente.

A percentagem de germinação de embriões in vitro sem passar pelo congelamento em nitrogênio líquido na Calcutta foi menor quando as sementes foram dissecadas em sílica, pois estas apresentaram conteúdos de água mais baixos do que nas sementes dessecadas em bancada. Na dessecação em bancada as condições de ambiente são menos controladas, podendo haver reidratação parcial a depender da umidade relativa do ambiente, como observado aos 5 dias de dessecação em bancada para os diploides Calcutta e CNPMF0542. Por outro lado, nos diploides melhorados, observou-se um aumento na taxa de germinação quando as sementes foram dessecadas em bancada ou sílica, com raras exceções (Tabela 1). Após o congelamento em nitrogênio líquido, a percentagem máxima de germinação de embriões (96,67%) foi obtida em sementes da Calcutta dessecadas por 7 dias em bancada, (conteúdo de água de 7,4%). Não houve germinação de embrião nas sementes controle da Calcutta criopreservadas, possivelmente pelo conteúdo de água mais elevado (23,44%).

A criopreservação aumentou a percentagem de germinação in vitro dos embriões de sementes controle (não dessecadas) dos dois híbridos avaliados. Entretanto, após a dessecação, a porcentagem de germinação de embriões de sementes não congeladas e as que passaram pelo processo de criopreservação não diferiu significativamente, com exceção da dessecação em bancada do diploide melhorado CNPMF0731 que apresentou uma tendência a maior germinação de embrião após a criopreservação (Figura 2).

Tabela 1. Conteúdo de água e porcentagem de germinação in vitro de embriões do diploide (Calcutta) e diploides melhorados (CNPMF0542 e CNPMF0731), após dessecação em bancada e sílica gel e criopreservação, cultivados em meio MS por 20 dias.

Tratamento	Conteúdo de água (%)	Porcentagem de germinação in vitro	
		Sem crio	Crio
Calcutta			
Controle	23,44 A	93,33 Aa	0,00 Cb
Bancada - 1 dia	8,59 B	83,33 Aa	60,00 Ba
Bancada - 3 dias	8,1 B	70,00 Ba	76,67 Aa
Bancada - 5 dias	10,03 B	80,00 Aa	83,33 Aa
Bancada - 7 dias	7,04 C	86,67 Aa	96,67 Aa
Sílica gel- 1 dia	6,10 C	63,33 Ba	60,00 Ba
Sílica gel- 3 dias	2,69 D	73,33 Ba	70,00 Ba
Sílica gel - 5 dias	6,27 C	66,67 Ba	56,67 Ba
Sílica gel - 7 dias	2,42 D	66,67 Ba	80,00 Aa
CNPMF0542			
Controle	12,94 A	40,00 Ba	66,67 Aa
Bancada - 1 dia	12,61 A	36,67 Ba	16,67 Bb
Bancada - 3 dias	14,56 A	70,00 Aa	50,00 Aa
Bancada - 5 dias	16,72 A	60,00 Aa	46,67 Aa
Bancada - 7 dias	12,76 A	30,00 Ba	46,67 Aa
Sílica gel- 1 dia	6,69 B	63,33 Aa	56,67 Aa
Sílica gel- 3 dias	5,11 B	53,33 Aa	53,33 Aa
Sílica gel - 5 dias	4,91 B	66,67 Aa	56,67 Aa
Sílica gel - 7 dias	4,80 B	53,33 Aa	56,67 Aa
CNPMF0731			
Controle	14,32 A	30,00 Ba	43,33 Ba
Bancada - 1 dia	10,99 B	30,00 Bb	60,00 Aa
Bancada - 3 dias	10,77 B	60,00 Aa	70,00 Aa
Bancada - 5 dias	10,41 C	33,33 Ba	56,67 Aa
Bancada - 7 dias	10,27 C	63,33 Aa	63,33 Aa
Sílica gel- 1 dia	6,15 D	60,00 Aa	53,33 Aa
Sílica gel- 3 dias	3,73 E	66,67 Aa	33,33 Bb
Sílica gel - 5 dias	3,93 E	46,67 Ab	80,00 Aa
Sílica gel - 7 dias	3,88 E	66,67 Aa	56,67 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna e minúscula em cada linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade.

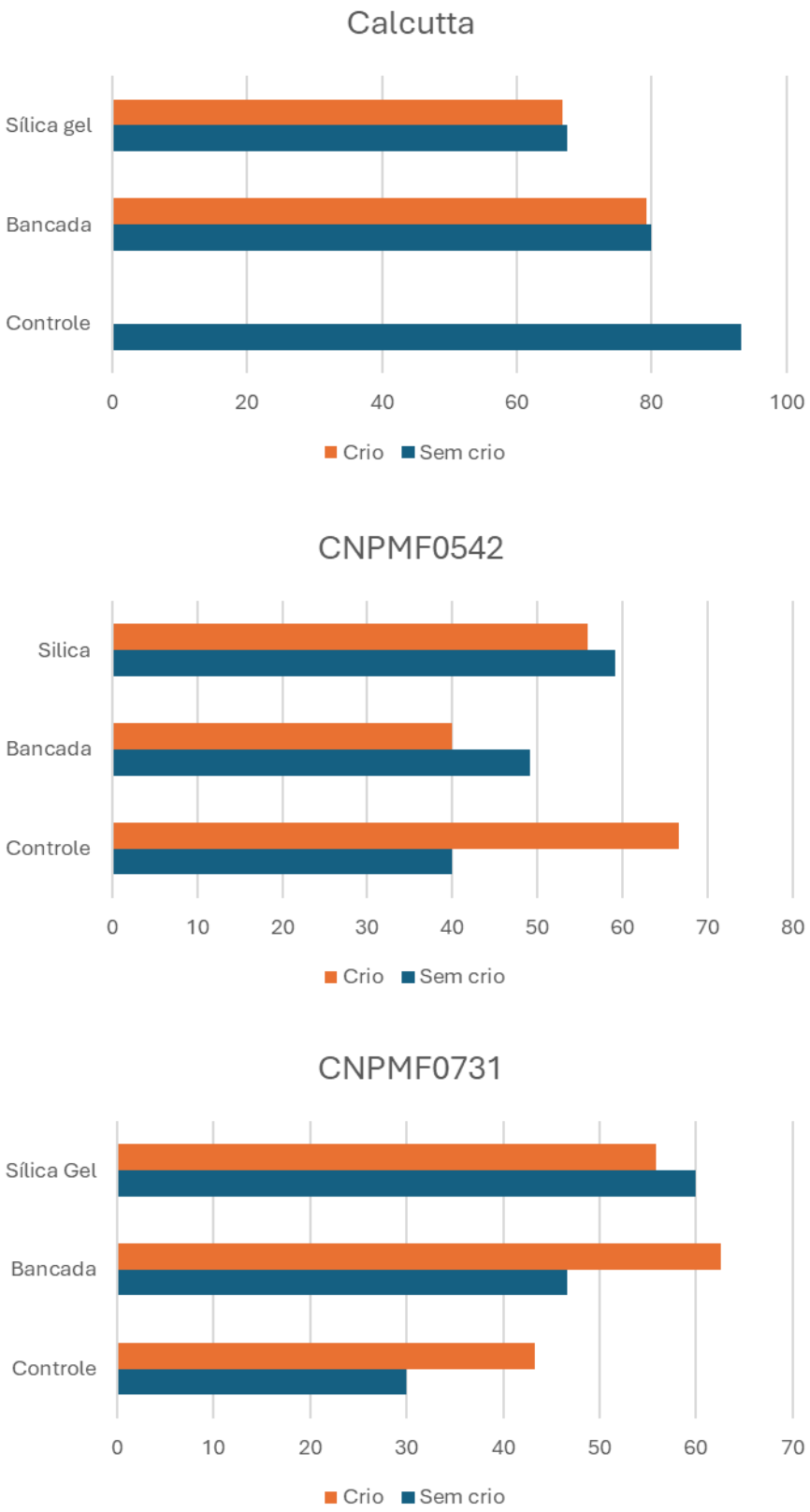


Figura 2. Porcentagem germinação in vitro de embriões oriundos de sementes dessecadas em bancada e sílica gel dos genótipos diploides de bananeira Calcutta, CNPMF0542 e CNPMF0731.

A dessecação em sais também pode ser utilizada para reduzir o conteúdo de água das sementes. As sementes submetidas à dessecação em sais por 7 dias não apresentaram perda de conteúdo de água, com exceção do nitrato de magnésio em sementes de Calcutta onde houve uma redução de 23,44% para 9,37% (Tabela 2). Para as sementes dessecadas em sais e que não foram submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido, a maior percentagem de germinação de embriões foi observada nas sementes dessecadas com nitrato de sódio: 70% para o diploide Calcutta, 50% para o CNPMF0542 e 46,67% para o CNPMF0731. Após a criopreservação, as sementes do diploide silvestre Calcutta e do diploide melhorado CNPMF0731, dessecadas em cloreto de sódio, apresentaram as maiores percentagens de germinação de embriões, com 56,67% e 66,67%, respectivamente. Já para o híbrido CNPMF0542, o melhor resultado foi obtido com nitrato de sódio, alcançando 56,67%.

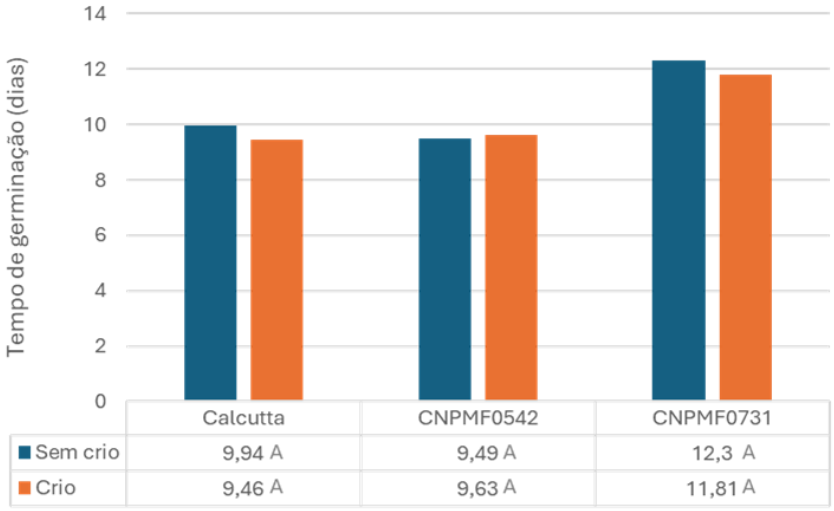
Tabela 2. Conteúdo de água e germinação in vitro de embriões de Calcutta, CNPMF0542 e CNPMF0731, após dessecação em sais por 7 dias e criopreservação, cultivados em meio MS por 20 dias.

Tratamento	Conteúdo de água (%)	Porcentagem de germinação	
		Sem crio	Crio
Calcutta			
Controle	23,44 A	93,33 Aa	0,00 Bb
Nitrato de magnésio	9,37 C	53,33 Ba	53,33 Aa
Nitrato de sódio	13,29 B	70,00 Ba	53,33 Aa
Cloreto de sódio	12,09 B	46,67 Ba	56,67 Aa
CNPMF0542			
Controle	12,94 A	40,00 Ba	66,67 Aa
Nitrato de magnésio	13,52 A	36,67 Ba	46,67 Aa
Nitrato de sódio	14,69 A	50,00 Aa	56,67 Aa
Cloreto de sódio	15,62 A	26,67 Ba	43,33 Aa
CNPMF0731			
Controle	14,32 A	30,00 Ba	43,33 Ba
Nitrato de magnésio	11,30 C	33,33 Ba	56,67 Aa
Nitrato de sódio	13,45 B	46,67 Aa	26,67 Ba
Cloreto de sódio	13,85 B	26,67 Bb	66,67 Aa

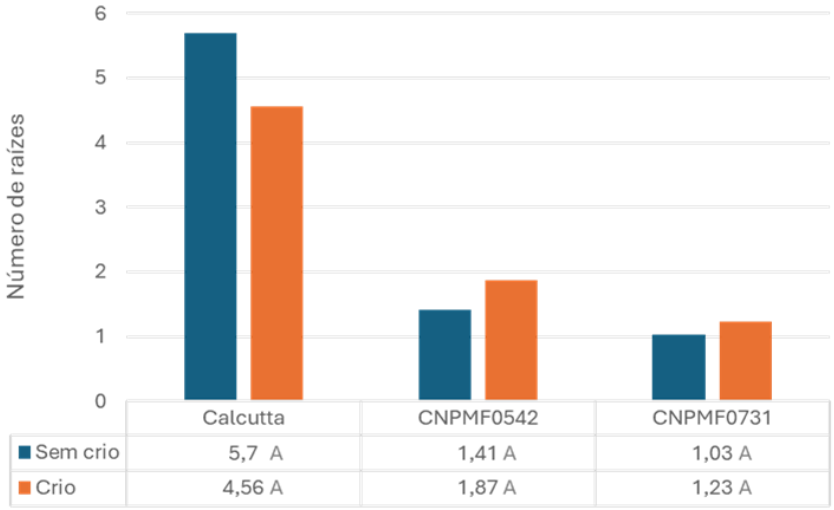
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna e minúscula em cada linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade.

O tempo médio de germinação dos embriões não variou significativamente entre os tratamentos nem entre os genótipos com uma média de 9 a 12 dias (Figura 3a). As

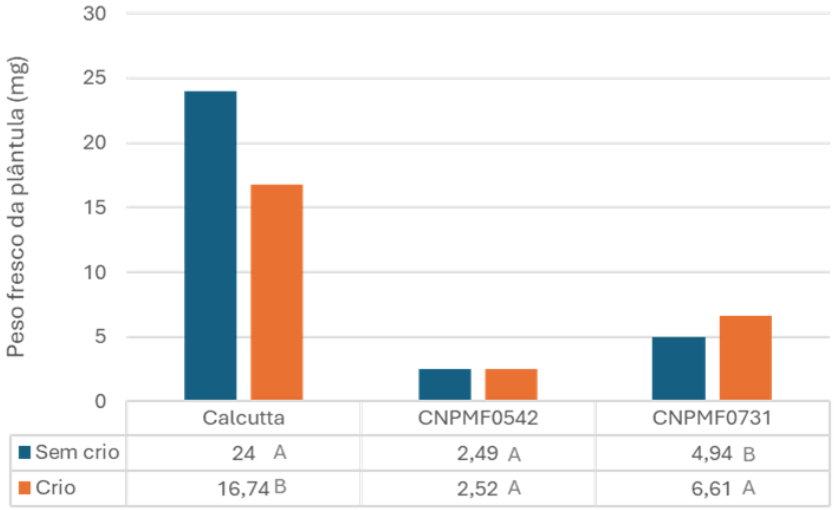
plântulas de Calcutta se apresentaram mais vigorosas, com maior número de raízes (Figura 3b) e peso fresco da plântula (Figura 3c), quando comparado com os diploides melhorados.



	Calcutta	CNPMF0542	CNPMF0731
Sem crio	9,94 A	9,49 A	12,3 A
Crio	9,46 A	9,63 A	11,81 A



	Calcutta	CNPMF0542	CNPMF0731
Sem crio	5,7 A	1,41 A	1,03 A
Crio	4,56 A	1,87 A	1,23 A



	Calcutta	CNPMF0542	CNPMF0731
Sem crio	24 A	2,49 A	4,94 B
Crio	16,74 B	2,52 A	6,61 A

Figura 3. Médias das variáveis de desenvolvimento de plântulas obtidas de embriões de genótipos diploides de bananeira, excisados após submetidos a diferentes tratamentos de dessecação e a criopreservação, e cultivados em meio MS por 20 dias. a) Tempo de germinação; b) Número de raízes; c) Preso fresco da plântula. Médias seguidas pela mesma letra não difere estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

4. DISCUSSÃO

Estudos recentes mostram que o processo de criopreservação pode impactar significativamente a taxa de germinação devido ao estresse térmico e osmótico. Singh et al. (2021) demonstraram que a otimização do protocolo de criopreservação pode aumentar a viabilidade e a taxa de germinação de embriões em plantas. Uma condição essencial para o sucesso da criopreservação de sementes é a eficiência do processo de dessecação que permita reduzir o conteúdo de água de forma a evitar a formação de cristais de gelo. A pré-dessecação pode reduzir a atividade metabólica e preservar a integridade celular, permitindo um rápido reinício do crescimento após a reidratação e germinação (PENG et al., 2023; ANJU et al., 2024).

A influência do congelamento em nitrogênio líquido na germinação dos embriões pode ser atribuída ao efeito direto do congelamento rápido e do subsequente descongelamento na viabilidade dos embriões, uma vez, que, a taxa de sucesso da criopreservação varia com a taxa de resfriamento e aquecimento (WALTERS et al., 2021; KAVIANI e, 2022).

Em um estudo envolvendo diferentes espécies do gênero Musa, incluindo *M. acuminata*, foi observado que sementes de bananeira com conteúdo de água de 20% ou mais não germinam após o congelamento em nitrogênio líquido (KAYA et al., 2020). Nossos dados mostram que em Calcutta não houve germinação in vitro das sementes que apresentavam 24% de conteúdo de água, e quando o conteúdo de água foi reduzido a 7,04% por 7 dias em bancada, 96,67% dos embriões germinaram in vitro.

As sementes de *Ensete glaucum* podem tolerar dessecação até atingir 5–10% de conteúdo de água sem perda significativa no potencial de germinação (83–84%) e armazenadas com segurança por até 1 ano em temperatura ambiente (RT), sem perda de viabilidade (SINGH et al., 2021). De acordo com esses autores, as sementes desidratadas ao ar (10 ± 2% de conteúdo de água) foram criopreservados (em fase líquida e vapor de nitrogênio líquido) e a alta recuperação pós-descongelamento foi alcançada (80,2 ± 2,2%)

mediante cultivo in vitro dos embriões. Entretanto, as condições de desidratação ao ar não podem ser controladas com precisão devido à sua dependência da temperatura e umidade do ambiente e, portanto, não são necessariamente reprodutíveis (ENGELMANN, 2011).

O teor de água em média de 14% é considerado ideal para a criopreservação de embriões de banana (PANIS, 2009). No presente estudo, a germinação de sementes que foram submetidas a dessecação a níveis de conteúdo de água inferiores a 5% corroborando com classificação das sementes de bananeira como ortodoxas, pois podem ser desidratadas e conservadas por longos períodos de tempo a baixas temperaturas. (VINEESH, et al, 2015; KAYA et al, 2020).

A alta taxa de germinação no controle sem dessecação indica que a manutenção da umidade natural das sementes favorece a viabilidade e a germinação. A dessecação pode levar à perda de viabilidade em sementes ortodoxas, como as de bananeira, devido à sensibilidade à secagem (KALLOW et al., 2020; KALLOW et al., 2022).

No entanto, a dessecação controlada antes da criopreservação é crucial para reduzir o conteúdo de água das sementes e minimizar a formação de cristais de gelo, que podem danificar as células durante o congelamento, causando danos celulares irreversíveis e, consequentemente, à perda de viabilidade (BALLESTEROS et al., 2021; SURANTHRAN et al., 2023). Entretanto, a dessecação excessiva ou inadequada pode levar à deterioração celular, afetando negativamente a viabilidade e o tempo de germinação (MATILLA, 2021).

A dessecação em bancada por períodos mais longos (até 7 dias) mostrou resultados promissores, indicando que a redução gradual da umidade permite uma adaptação das sementes ao estresse da criopreservação. A dessecação gradual permite a adaptação das sementes, reduzindo o estresse osmótic, melhorando a eficiência da germinação, favorecendo a robustez e o desenvolvimento radicular dos embriões (SMOLICOVA et al., 2020).

A ausência de diferenças significativas nas variáveis número de raízes e peso fresco observados no presente estudo, sugere que os tratamentos de dessecação e criopreservação aplicados não afetaram de maneira substancial a capacidade geral de germinação de embrião e o desenvolvimento inicial das raízes. Segundo Parihar et al. (2023), a eficácia da criopreservação depende fortemente de protocolos padronizados que minimizem o impacto sobre a viabilidade das sementes e a integridade celular. Considerando que, a uniformidade nos resultados para estes parâmetros pode indicar que os protocolos utilizados foram eficazes em manter essas variáveis estáveis.

A criopreservação pode afetar a viabilidade e o vigor das plântulas devido ao estresse térmico e osmótico causado pelo processo de congelamento e descongelamento (ENGELMANN, 2011). Diferentes genótipos possuem variações na capacidade de tolerância ao estresse criogênico (Engelmann e Takagi, 2000). A maior média de peso fresco para plântulas criopreservadas do diploide CNPMF0731 pode ser atribuída a mecanismos de resistência intrínsecos que permitem uma recuperação mais eficaz após o descongelamento. Para o acesso CNPMF0542 não houve diferença estatística entre as médias obtidas antes e após a criopreservação. Isso pode indicar que o genótipo CNPMF0542 possui uma resiliência natural ao processo de criopreservação, mantendo o peso fresco das plântulas estável independentemente do tratamento aplicado. A estabilidade do peso fresco sugere uma robustez genética que poderia ser explorada em programas de conservação genética e reintrodução de espécies.

A criopreservação permitiu, no presente estudo, preservar sementes de bananeira, sem perder sua viabilidade, característica fundamental para garantir um banco de sementes.

5. CONCLUSÃO

As sementes de bananeira diploide toleram a dessecação até níveis inferiores a 5% de conteúdo de água antes da criopreservação, sem afetar a capacidade de germinação in vitro dos embriões, podendo até estimular a germinação após a criopreservação. O tratamento de dessecação em sílica gel por 7 dias forneceu os melhores resultados para as variáveis de germinação e desenvolvimento dos embriões.

6. REFERÊNCIAS

ANJU, T. R.; THERESA, M.; MOHANLAL, J. Conservation Approaches of Plant Genetic Resources. In: **Sustainable Utilization and Conservation of Plant Genetic Diversity**. Singapore: Springer Nature Singapore, p. 643-681, 2024.

BALLESTEROS, D.; FANEGA-SLEZIAK, N.; DAVIES, R. M. Cryopreservation of seeds and seed embryos in orthodox-, intermediate-, and recalcitrant-seeded species. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, p. 663-682, 2021, 2021.

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

ENGELMANN, F. Cryopreservation of Embryos: An Overview. **Methods in Molecular Biololy**, v.710, p.155–184, 2011

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

HILL, J. P.; EDWARDS, W.; FRANKS, P. J. How long does it take for different seeds to dry. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 575-583, 2010.

ISTA Rules. International seed testing association. **ISTA Germination Sec**. Chapter, v.19, p. 41, 2016.

KALLOW, S.; GARCIA ZULUAGA, M.; FANEGA SLEZIAK, N.; NUGRAHA, B.; MERTENS, A.; JANSSENS, SB, ... & PANIS, B. Drying banana seeds for *ex situ* conservation. **Conservation physiology**, v. 10, n. 1, coab099, 2022.

KALLOW, S.; LONGIN, K.; SLEZIAK, N. F.; JANSSENS, S. B.; VANDELOOK, F.; DICKIE, J…; PANIS, B. Challenges for ex situ conservation of wild bananas: seeds collected in Papua New Guinea have variable levels of desiccation tolerance. **Plants**, v.9, n.9, p.1243, 2020.

KAVIANI, B.; KULUS, D. Cryopreservation of endangered ornamental plants and fruit crops from tropical and subtropical regions. **Biology,** v. 11, n. 6, p. 847, 2022.

KAYA, E., SOUZA, F. V. D., DOS SANTOS-SEREJO, J. A., e GALATALI. Influence of dehydration on cryopreservation of Musa spp. germplasm. **Acta Botanica Croatica**, v. 79, n. 2, p. 99-104, 2020.

KEBREAB, E.; MURDOCH, A.J. A model of the effects of a wide range of constant and alternating temperatures on seed germination of four Orobanche species. **Annals of Botany**, v.84, p.549–557, 1999.

KRZYSZTON, M.; YATUSEVICH, R.; WRONA, M.; SACHAROWSKI, S. P.; ADAMSKA, D.; SWIEZEWSKI, S. Single seeds exhibit transcriptional heterogeneity during secondary dormancy induction. **Plant Physiology**, v. 190, n. 1, p. 211-225, 2022.

MATILLA, A. J. The orthodox dry seeds are alive: A clear example of desiccation tolerance. **Plants**, v. 11, n. 1, p. 20, 2021.

MURASHIGE T; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.

NADARAJAN, J., WALTERS, C., PRITCHARD, H. W., BALLESTEROS, D., & COLVILLE, L. Seed longevity—The evolution of knowledge and a conceptual framework. **Plants**, v. 12, n. 3, 471, 2023.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, v.10, p.301-306, 2000.

PANIS, B. Cryopreservation of Musa germplasm. 2nd ed. Montpellier: **Bioversity International**, (INIBAP Technical Guideline, 9). 2009. 48 p.

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

PARIHAR, A.; KUMAR, A.; PANDA, U.; KHAN, R.; PARIHAR, D. S.; KHAN, R. Cryopreservation: a comprehensive overview, challenges, and future perspectives. **Advanced Biology**, v. 7, n. 6, 2200285, 2023.

PENG, C.; WANG, M.; WU, Y.; HUA, Q.; SHEN, Y. Study on Desiccation Tolerance and Biochemical Changes of *Sassafras tzumu* (Hemsl.) Hemsl. Seeds. **Forests**, v. 14, n. 11, 2183, 2023.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

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

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499–514, 1973.

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

SIMMONDS, N. W., e SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 55, n. 359, p. 302-312, 1955.

SING, S.; THANGJAM, R.; HARISH, G. D.; SINGH, H.; KUMAR, R.; MEENA, D.P.S.; AGRAWAL, A. Conservation protocols for *Ensete glaucum*, a crop wild relative of banana, using plant tissue culture and cryopreservation techniques on seeds and zygotic embryos. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 144, p. 195–209, 2021.

SMOLIKOVA, G., LEONOVA, T., VASHURINA, N., FROLOV, A., & MEDVEDEV, S. Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.1, p.101, 2020.

SMOLIKOVA, G.; STRYGINA, K.; KRYLOVA, E.; LEONOVA, T.; FROLOV, A.; KHLESTKINA, E.; MEDVEDEV, S. Transition from seeds to seedlings: Hormonal and epigenetic aspects. **Plants**, v. 10, n. 9, 1884, 2021.

SURANTHRAN, P.; GANTAIT, S.; SINNIAH, U. R. Water content significantly, influences post-cryopreservation survival of air-desiccated oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) zygotic embryos: A thermal and ultrastructural study. **Industrial Crops and Products**, v. 204, 117343, 2023.

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

WALTERS, C., WESLEY-SMITH, J., CRANE, J., HILL, L. M., CHMIELARZ, P., PAMMENTER, N. W., & BERJAK, P. Cryopreservation of recalcitrant (desiccation-sensitive) seeds. **Plant cryopreservation: a practical guide**, p. 465-484, 2008.

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

YOUNG, James Francis. Humidity control in the laboratory using salt solutions - a review. **Journal of Applied Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 241-245, 1967.