



ESTADO DE MATO GROSSO
SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE TANGARÁ DA SERRA “EUGÊNIO CARLOS
STIELER”



ALEXSSANDRO RODRIGUES DE SOUZA

**Otimização de protocolo para micropropagação de bananeira *Musa spp.* cv.
BRS Terra-Anã**

TANGARÁ DA SERRA – MT
MATO GROSSO – BRASIL
FEVEREIRO – 2026

ALEXSSANDRO RODRIGUES DE SOUZA

**Otimização de protocolo para micropropagação de bananeira *Musa spp.* cv.
BRS Terra-Anã**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso Campus Universitário de Tangará da Serra "Eugênio Carlos Stieler", como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho

TANGARÁ DA SERRA – MT
MATO GROSSO – BRASIL
FEVEREIRO – 2026

Walter Clayton De Oliveira CRB 1/2049

S729o Souza, Alexssandro Rodrigues de.

Otimização de protocolo para micropropagação de bananeira Musa spp. cv. BRS Terra-Anã / Alexssandro Rodrigues de Souza. - Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2026.
87f.: il.

Universidade do Estado de Mato Grosso "Carlos Alberto Reyes Maldonado", Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Genética e Melhoramento de Plantas - Multicampus, Programa De Pós-graduação Stricto Sensu Em Genética E Melhoramento De Plantas - Multicampus.

Orientador: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientador: Ilio Fealho de Carvalho.

1. Micropropagação de Bananeira. 2. Multiplicação in vitro.
3. Camadas Finas de Tecido (TCL). 4. Organogênese. 5. Mixoploidia. 6. Variação Somaclonal. I. Carvalho, Maurecilne Lemes da Silva. II. Carvalho, Ilio Fealho de. III. Título.

UNEMAT / MTSCB

CDU 582.563.12

ALEXSSANDRO RODRIGUES DE SOUZA

**Otimização de protocolo para micropropagação de bananeira *Musa spp.* cv.
BRS Terra-Anã**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso Campus Universitário de Tangará da Serra "Eugênio Carlos Stieler", como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre

Aprovado em, 25 de fevereiro de 2026.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho
Orientadora - PGMP – UNEMAT

Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho – Coorientador – UNEMAT

Dr. Elyabe Monteiro de Matos – UFJF – Juiz de Fora - MG

Dr. Otacílio Damásio da Costa Júnior – UFV – Viçosa - MG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, sou grato a Deus pela paciência e misericórdia concedida ao longo desta jornada.

Agradeço imensamente à minha família, especialmente aos meus pais, irmãos, cunhada e queridas sobrinhas, pelo apoio constante, incentivo e amor incondicional, aos demais familiares pela ajuda e compreensão, sou grato.

Expresso minha sincera gratidão à minha orientadora e professora, Dra. Maurecilne Lemes, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de integrar sua equipe de pesquisa e pelos valiosos ensinamentos, conselhos e correções, fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao meu coorientador e professor, Dr. Ilio Fealho, pelos conselhos, apoio, companheirismo e contribuições ao longo da graduação e do mestrado, me ajudando tanto na formação pessoal quanto intelectual.

Sou grato à equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), mestrandas Alana e Michelly, às doutorandas Gabrielle e Cíntia, e aos alunos de Iniciação Científica Bruna, Gabriel, Heitor e Mirella, pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos e projetos. Agradeço também à equipe do Laboratório de Microbiologia, Hanny, Luiza e Willian, pela ajuda prestada. O meu muito obrigado a todos.

Agradeço ao Dr. Elyabe Monteiro e ao professor Dr. Saulo Marçal pelos ensinamentos e apoio na realização das análises de citometria de fluxo e citogenética, bem como pelos momentos compartilhados em Juiz de Fora – MG.

Ao professor Dr. Diego Rocha e ao Dr. Otacílio Júnior, agradeço pela ajuda, correções e ensinamentos.

Agradeço ao professor Dr. Lyderson Viccini pela receptividade e pela disponibilização do Laboratório de Genética e Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) para as análises de citometria de fluxo e citogenética na Universidade Federal de Juiz de Fora – MG.

Agradeço à equipe do Laboratório de Genética e Biotecnologia (UFJF) pela recepção, auxílio e acompanhamento durante as análises.

Agradeço à Alana Jeniffer pela companhia, amizade e auxílio em diversas etapas importantes desta formação, bem como nas viagens, disciplinas e

experimentos por nós realizados desde o início; ao Ednan Henrique, pelos momentos compartilhados e pela ajuda em diferentes fases da formação; à Gabrielle Crepaldi, pelos conselhos, dicas e companheirismo ao longo desta trajetória. Aos demais amigos e colegas não mencionados, mas que participaram e contribuíram em diferentes momentos da minha vida, deixo meu sincero agradecimento.

Agradeço à Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), meu muito obrigado pelo suporte.

Agradeço ao Sr. Ismael Bianchi pelas valiosas dicas, pelo compartilhamento de conhecimento na micropropagação de bananeira BRS Terra anã. Meu muito obrigado!

Sou grato ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, aos professores e aos ensinamentos oferecidos ao longo da formação.

Agradeço à FAPEMAT, pelo financiamento do projeto “Produção de mudas micropropagadas de *Musa spp.* cultivar BRS Terra anã para plantios em pequenas propriedades rurais de Mato Grosso” pelo Processo: FAPEMAT-PRO.001947/2023.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa, fundamental para a realização desta defesa.

"Só o conhecimento liberta o homem, através do conhecimento o homem é livre."

Enéas Carneiro

Sumário

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 <i>Musa spp.</i> cv. BRS Terra-Anã	16
2.2 Micropropagação	17
2.2.1 Aplicações práticas: biofábricas e micropropagação comercial.....	19
2.3 Atuação dos Reguladores de Crescimento Citocinínicos na Micropropagação de <i>Musa spp.</i>	20
2.3.1 Sinalização hormonal e reprogramação celular	20
2.3.2 Citocininas na cultura de tecidos vegetais	21
2.3.3 Benziladenina (BA)	22
2.3.4 Meta-topolina (mT).....	23
2.3.5 Thidiazuron (TDZ).....	23
2.4 Variação Somaclonal	24
2.5 Citometria de fluxo como ferramenta de monitoramento	26
2.6 Thin Cell Layer (TCL).....	27
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO I.....	43
MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA cv. BRS TERRA-ANÃ: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA EM CICLOS SUCESSIVOS DE SUBCULTIVO	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46

2.1. Material vegetal	46
2.2. Desinfestação e estabelecimento in vitro	46
2.3. Multiplicação in vitro utilizando ciclos de subcultivos	48
2.4. Avaliação da estabilidade genética em cada ciclo de multiplicação ..	48
2.5. Análise Citogenética	49
2.6. Aclimatização de plantas	49
2.7. Caracterização estomática.....	50
2.8. Delineamento experimental	51
3.0 RESULTADOS	52
3.1. Ciclos consecutivos de regeneração in vitro de <i>Musa spp.</i> cv. BRS Terra-Anã a partir de ápices caulinares são geneticamente estáveis	52
3.1.1. Resposta morfogênica e estabelecimento dos explantes.....	52
3.1.2. Efeito das concentrações de BA na taxa de multiplicação	53
3.1.3. Dinâmica temporal da produção de brotos ao longo dos ciclos.....	53
3.1.4. Produção acumulada e eficiência multiplicativa	55
3.1.5. Implicações para o manejo de subcultivos e risco de variação somaclonal	56
3.2. Ciclos sucessivos de regeneração in vitro de <i>Musa spp.</i> cv. BRS Terra-Anã apresentam reduzida instabilidade genética	56
3.3 Aclimatização e Caracterizações estomáticas	58
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÃO	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
CAPÍTULO 2.....	73
REGENERAÇÃO IN VITRO DE BANANEIRA cv. BRS TERRA-ANÃ VIA TÉCNICA DE CAMADAS FINAS DE TECIDO (TCL): RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS A CITOCININAS.....	73
RESUMO.....	73

ABSTRACT	74
1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1 Preparo dos Explantes e Condições de Cultivo	76
2.2 Tratamentos Experimentais	77
2.3 Coleta de Dados e Análise Estatística	77
3. RESULTADOS	77
4. DISCUSSÃO	83
5. CONCLUSÃO	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
CONCLUSÃO GERAL	88

SOUZA, Alexssandro Rodrigues. Universidade do Estado de Mato Grosso. Fevereiro de 2026. **Otimização de protocolo para micropropagação de bananeira *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã.** Orientadora: Profa. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientador: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho

RESUMO

A micropropagação de bananeiras constitui uma estratégia fundamental para a produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, porém ciclos sucessivos de micropropagação podem induzir variações somaclonais. Este estudo teve como objetivo otimizar e validar um protocolo para micropropagação de bananeira (*Musa spp.*) cv. BRS Terra-Anã por meio de diferentes técnicas de micropropagação e uso de diferentes fontes de citocinina. Ápices caulinares foram cultivados em meio MS suplementado com benziladenina (BA) (0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) ao longo de oito ciclos consecutivos. A maior produção média de brotos por explante foi obtida com 1,0 mg L⁻¹ de BA, totalizando 666 brotos ao final do experimento, seguida por 3,0 mg L⁻¹ (582 brotos). Observou-se comportamento não linear da brotação, com incremento até o quarto ciclo e redução progressiva nos ciclos subsequentes, confirmado por modelos lineares generalizados mistos (GLMM), evidenciando interação significativa entre concentração de citocinina e número de subcultivos. A estabilidade genômica foi avaliada por citometria de fluxo e análise cromossômica, revelando predominância de plantas triploides (2n = 3x = 33), com baixa frequência de variantes somaclonais (5,56%), principalmente mixoploides, associadas ao uso de 2,0 mg L⁻¹ de BA. As plantas aclimatizadas apresentaram crescimento uniforme, e diferenças estomáticas foram restritas à densidade e à largura dos estômatos entre plantas triploides e mixoploides. No sistema TCL, BA, meta-topolina (mT) e thidiazuron (TDZ) induziram organogênese adventícia dependente do regulador, da concentração e do tempo de cultivo, com destaque para o TDZ a 2,0 e 3,0 mg L⁻¹, que apresentou maior potencial regenerativo. Entretanto, mT favoreceu melhor conversão de brotos em plantas completas, com maior vigor morfoestrutural. Os resultados demonstram que ciclos consecutivos de regeneração in vitro em *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã mantêm elevada estabilidade genética, desde que associados a concentrações adequadas de citocininas, constituindo protocolo seguro e eficiente para multiplicação clonal e aplicações em melhoramento e biotecnologia vegetal.

Palavras-chave: Micropropagação de bananeira; multiplicação in vitro; camadas finas de tecido (TCL); organogênese; mixoploidia; variação somaclonal.

SOUZA, Alexssandro Rodrigues. Universidade do Estado de Mato Grosso. February 2026. **Protocol Optimization for Micropropagation of Banana *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã**. Advisor: Prof. Dr. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co-advisor: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho.

ABSTRACT

The micropropagation of banana plants is a key strategy for producing planting material with high genetic and phytosanitary quality; however, successive in vitro regeneration cycles may induce somaclonal variation. The present study aimed to optimize and validate a micropropagation protocol for *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã using different micropropagation techniques and distinct cytokinin sources. Shoot apices were cultured on MS medium supplemented with benzyladenine (BA) (0, 1.0, 2.0, and 3.0 mg L⁻¹) over eight consecutive regeneration cycles. The highest mean number of shoots per explant was obtained with 1.0 mg L⁻¹ BA, totaling 666 shoots at the end of the experiment, followed by 3.0 mg L⁻¹ BA (582 shoots). Shoot production showed a non-linear pattern, with a progressive increase up to the fourth cycle followed by a marked decline in subsequent cycles. This trend was confirmed by generalized linear mixed models (GLMM), indicating a significant interaction between cytokinin concentration and the number of subcultures. Genomic stability was assessed by flow cytometry and chromosome analysis, revealing a predominance of triploid plants ($2n = 3x = 33$), with a low frequency of somaclonal variants (5.56%), mainly mixoploids, predominantly associated with the 2.0 mg L⁻¹ BA treatment. Acclimatized plants exhibited uniform growth, and stomatal differences between triploid and mixoploid plants were restricted to stomatal density and width. In the TCL system, BA, meta-topolin (mT), and thidiazuron (TDZ) induced adventitious organogenesis in a manner dependent on the growth regulator, concentration, and culture period, with TDZ at 2.0 and 3.0 mg L⁻¹ exhibiting the highest regenerative potential. However, mT promoted superior conversion of shoots into complete plants, resulting in improved morphostructural vigor. These results demonstrate that successive in vitro regeneration cycles in *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã maintain high genetic stability when associated with appropriate cytokinin concentrations, representing a safe and efficient protocol for clonal propagation and applications in plant breeding and biotechnology.

Keywords: Banana micropropagation; in vitro multiplication; thin cell layers (TCL); organogenesis; mixoploidy; somaclonal variation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A bananeira (*Musa spp.* L.), pertencente à família Musaceae, é uma monocotiledônea herbácea de origem no sudeste asiático, sendo amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Maseko et al., 2024; Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2007). Atualmente, estima-se a existência de mais de mil cultivares produzidas globalmente, com proeminência para o grupo Cavendish, responsável por aproximadamente 47% da produção mundial devido à sua elevada produtividade e adaptabilidade ambiental (Mordor Intelligence, 2025). A banana constitui um dos frutos mais consumidos no planeta, representando a base alimentar de centenas de milhões de pessoas e desempenhando papel fundamental na segurança alimentar e na subsistência de populações vulneráveis (OECD/FAO, 2025; George e Santos, 2025). No cenário brasileiro, a cultura apresenta ampla distribuição geográfica, com o maior volume produtivo concentrado no semiárido nordestino, que responde por cerca de 41% da produção nacional (Souza et al., 2022; Amaro et al., 2021). Segundo dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2025), a produção nacional atingiu 6,9 milhões de toneladas na safra de 2024, ratificando a importância socioeconômica da atividade, especialmente para a agricultura familiar.

Contudo, apesar da relevância estratégica, a bananicultura brasileira enfrenta sérios gargalos agrônômicos que limitam a produtividade e oneram os custos operacionais. Entre os principais entraves destacam-se as Sigatocas negra (*Pseudocercospora fijiensis*) e amarela (*Pseudocercospora musae*) (Silva et al., 2024), além do Mal-do-Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. A variante Tropical Race 4 (TR4) é atualmente classificada como a maior ameaça global à cultura, podendo inviabilizar a produção em até 100% das áreas afetadas (Amorim et al., 2025; Gasparotto et al., 2021). Adicionalmente, pragas como o moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*) comprometem o vigor das plantas e o desenvolvimento do rizoma (Mascarin et al., 2022). Nesse contexto, torna-se imperativo o investimento em estratégias de manejo integrado, melhoramento genético e, primordialmente, na produção de mudas com elevado padrão fitossanitário. A micropropagação surge como ferramenta biotecnológica essencial,

permitindo a multiplicação rápida e clonal de matrizes sadias, garantindo a fidelidade genética e a sustentabilidade do setor (Amorim et al., 2025; Ribeiro et al., 2020).

A cultivar BRS Terra-Anã, desenvolvida pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, representa uma alternativa promissora para a agricultura familiar brasileira, combinando características agronômicas desejáveis como porte reduzido, resistência moderada a doenças e adaptação a diferentes condições edafoclimáticas. O porte baixo facilita o manejo cultural e reduz perdas por tombamento, enquanto a qualidade dos frutos atende às demandas do mercado consumidor. No entanto, a ausência de protocolos otimizados de micropropagação específicos para esta cultivar limita sua disseminação em larga escala e constitui uma lacuna importante na literatura científica.

O sucesso da micropropagação depende criticamente da otimização de protocolos baseados no uso de citocininas, que atuam na quebra da dominância apical e no estímulo à divisão celular (Nagel e Heinzmann, 2024; Pasternak e Steinmacher, 2024). Entre os reguladores de crescimento mais empregados, destacam-se a benziladenina (BA), amplamente reconhecida pela eficiência na indução de brotações laterais (Bozsó e Barna, 2021); a meta-topolina (mT), que tem demonstrado resultados superiores quanto ao vigor morfofisiológico das plântulas (Abdalla e Dobránszki, 2024); e o thidiazuron (TDZ), uma citocinina do grupo das fenilureias com alta potência tanto na organogênese quanto na embriogênese somática (Nautiyal et al., 2022).

Estudos recentes têm avançado significativamente na compreensão dos efeitos dessas citocininas em diferentes cultivares de bananeira. Chhon et al. (2025) reportaram que concentrações de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA foram ótimas para a proliferação inicial de brotos em banana do subgrupo Cavendish, enquanto $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ produziram maior número de brotos em subcultivos subsequentes. Saha (2025) demonstrou que a combinação de BA com baixas concentrações de auxinas promoveu a formação de brotos em diferentes genótipos triploides de *Musa*. Mia et al. (2025) otimizaram concentrações de BA para multiplicação em massa das cultivares G9 e Agnishwar. Kumari e Kumar (2025) descreveram protocolo otimizado para G9 e Malbhog. Patel e Sahay (2025) recomendam a indução de escalpos em meio MS suplementado com $11,1 \text{ }\mu\text{M}$ de BA.

Além de BA, outras citocininas têm sido investigadas. Salma et al. (2024) reportaram alta indução de gemas em meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de TDZ na cultivar Grand Naine. Sorn et al. (2024) compararam BA e TDZ na regeneração de brotos de banana Cavendish. A meta-topolina tem emergido como alternativa promissora (Aremu et al., 2012; Werbrouck et al., 1996). Karwasra et al. (2024) reportaram maiores taxas de crescimento com mT em *Chlorophytum borivillianum*. Vasudevan et al. (2025) demonstraram superioridade da mT em melancia.

A manutenção da estabilidade genética é aspecto crítico da micropropagação (Majumder et al., 2025; Krishna et al., 2016; Nwauzoma e Jaja, 2013). A variação somaclonal está associada a diversos fatores (Bairu et al., 2011; Oh et al., 2007; Cassells e Curry, 2001). A citometria de fluxo tem emergido como ferramenta rápida para avaliação da estabilidade genética (Ho et al., 2024; Paudel et al., 2021; Bhosale et al., 2011). Estudos clássicos demonstraram sua aplicabilidade (Doležel et al., 2007; Galbraith et al., 1983). Em bananeira, marcadores RAPD e ISSR têm sido utilizados para confirmação da fidelidade clonal (Lakshmanan et al., 2007; Ray et al., 2006).

A variação somaclonal pode manifestar-se de diferentes formas em plantas regeneradas por cultura de tecidos (Bairu et al., 2007). Embora esse fenômeno possa ser explorado como fonte de variabilidade em programas de melhoramento genético (Hazarika, 2006), sua ocorrência não controlada é geralmente indesejável em sistemas de micropropagação voltados à produção clonal. As alterações associadas à variação somaclonal podem envolver modificações genômicas, como mudanças no número de cromossomos, bem como alterações epigenéticas, incluindo padrões de metilação do DNA (Ortiz e Swennen, 2014). Nesse contexto, fatores relacionados ao ambiente in vitro, como o estresse oxidativo, têm sido apontados como potenciais indutores de variabilidade epigenética, contribuindo para a instabilidade observada em culturas celulares e tecidos regenerados (Hazarika, 2003; Cassells e Curry, 2001).

Considerando o tamanho do genoma e a ploidia, a bananeira apresenta características citogenéticas particulares (Cavalier-Smith, 2005; Gregory, 2005). A citometria de fluxo permite determinação precisa do valor C (Doležel e Bartoš, 2005).

Estudos correlacionam tamanho do genoma e características fisiológicas (Franks e Beerling, 2009; Gregory, 2001).

Citocininas aromáticas, como a meta-topolina, têm sido associadas a menores taxas de variação somaclonal (Aremu et al., 2011; Bairu et al., 2009). Esse efeito tem sido atribuído, em parte, à menor indução de estresse fisiológico e metabólico nas culturas in vitro, bem como à capacidade dessa citocinina de formar conjugados reversíveis, o que reduz o acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos e contribui para maior estabilidade genética e epigenética das plantas regeneradas (Bairu et al., 2011).

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a regeneração in vitro de explantes de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã sob a influência de diferentes citocininas, empregando ciclos sucessivos de subcultivo, com ênfase na resposta morfofisiológica e na capacidade proliferativa. Especificamente, buscou-se analisar o efeito da BA ao longo dos ciclos de multiplicação, incluindo a avaliação da estabilidade genética das plantas regeneradas nos subcultivos sucessivos, objetivando consolidar um protocolo responsivo, reprodutível de micropropagação da cultivar, apto à implementação em biofábricas e direcionado ao suprimento de mudas de qualidade para a bananicultura, com especial relevância para a agricultura familiar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã

A cultivar BRS Terra-Anã (*Musa spp.* grupo AAB, subgrupo Terra) é uma variedade de plátano desenvolvida pelo Programa de Melhoramento Genético de Banana e Plátano da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em atendimento às demandas da cadeia produtiva da bananicultura no Brasil (Embrapa, 2022). Ela resulta do cruzamento e seleção de genótipos das cultivares Terra Maranhão, Terrinha e D'Angola (Farta Velhaco) (CONAFER, 2022).

A cultivar foi inicialmente recomendada para o Vale do Ribeira (SP) e para Mato Grosso, sendo validada em 20 unidades distribuídas no estado para verificar sua adaptação às condições edafoclimáticas, bem como a aprovação de produtores e consumidores das regiões (Marcilio et al., 2022; Embrapa, 2022).

A cv. BRS Terra-Anã apresenta um conjunto de características morfoagronômicas superiores quando comparada às demais variedades do tipo Terra. Seu porte reduzido (2,83 m), aliado ao maior diâmetro do pseudocaule (82,8 cm), facilita o manejo e a colheita, além de conferir maior estabilidade à planta, reduzindo o risco de tombamento e os danos provocados pelo vento (Embrapa, 2022).

A cultivar também se destaca pelo ciclo mais curto, emitindo a inflorescência em cerca de 265,8 dias, enquanto cultivares tradicionais, como a Farta Velhaco, demandam períodos mais longos (Embrapa, 2022; Marcilio et al., 2022). Esse desempenho estrutural e fisiológico reflete diretamente na produtividade, onde os cachos apresentam peso médio de 22,8 kg, superior aos valores observados em outras variedades do subgrupo Terra (CONAFER, 2022; EMPAER, 2022).

Do ponto de vista nutricional, seus frutos apresentam elevado teor de amido resistente, um carboidrato com ação prebiótica associado a benefícios metabólicos e à saúde intestinal, aumentando o interesse dos consumidores e agregando valor ao produto (Assis et al., 2025; Liang et al., 2024). Em termos fitossanitários, a cultivar exibe resistência à Sigatoka-amarela (*P. musae*) e à murcha de *Fusarium*, embora seja suscetível à Sigatoka-negra (*P. fijiensis*), à broca do rizoma e a nematoides (Embrapa, 2023).

No conjunto, as características agronômicas, nutricionais e de adaptação mostram que a cv. BRS Terra-Anã apresenta melhor arquitetura de planta, maior produtividade e qualidades superiores, tornando-se uma das cultivares mais promissoras do subgrupo Terra (Marcilio et al., 2022).

2.2 Micropropagação

A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa baseada na cultura de tecidos vegetais, que utiliza pequenas porções de uma planta-matriz, denominadas explantes, cultivadas sob condições assépticas, em meios de cultura nutritivos, com o objetivo de produzir clones geneticamente idênticos em larga escala (Marak; Devi, 2021; Moraes et al., 2012). Trata-se de uma biotecnologia aplicada em laboratório que explora o potencial totipotente das células vegetais, ou seja, a capacidade de uma única célula se diferenciar e formar uma planta completa (Singh et al., 2025; Chaudhari, 2023).

Em comparação à propagação convencional, a micropropagação oferece diversas vantagens (Bhatia; Sharma, 2015), tais como: produção de grande número de mudas em menor tempo, uniformidade genética entre as plantas propagadas (Singh et al., 2025), possibilidade de obtenção de plantas livres de patógenos, conservação de genótipos e redução do espaço para a produção de mudas (Kundu; Sindhusa; Kumar, 2021; Reuther, 1990). A técnica é amplamente empregada na produção comercial, em programas de melhoramento genético, na conservação de espécies nativas e na obtenção de matrizes isentas de doenças. No caso da bananeira, a micropropagação tem se consolidado como o método mais eficiente e amplamente utilizado para a produção massal de mudas (Agbadje et al., 2021; Ribeiro et al., 2020), possibilitando a geração de plantas com elevado padrão genético e fitossanitário, em menor espaço físico, menor tempo e com facilidade de transporte a longas distâncias (Dagnew et al., 2012; Scherwinski-Pereira; Costa; Oliveira, 2009).

A metodologia da micropropagação envolve etapas sequenciais que se iniciam com (i) a seleção criteriosa do explante, considerando o estado fisiológico, a juvenilidade e a sanidade da planta matriz, seguida de (ii) desinfestação superficial para eliminação de contaminantes e estabelecimento asséptico da cultura (Chukwu et al., 2025; Permadi et al., 2023). O (iii) estabelecimento ocorre mediante inoculação em meio de cultura apropriado, suplementado ou não com reguladores de crescimento vegetal, etapa na qual a competência morfogênica do tecido é induzida ou expressa em resposta às condições nutricionais e hormonais do meio (Rolland; Johnny, 2025; Nasrin; Islam, 2025).

A fase de (iv) multiplicação promove a amplificação clonal por meio de subcultivos sucessivos e do estímulo citocinínico à proliferação de brotações ou estruturas meristemáticas (Chukwu et al., 2025; Rolland; Johnny, 2025). Subsequentemente, a etapa de (v) enraizamento possibilita a formação de um sistema radicular funcional, condição essencial para a transição ao ambiente *ex vitro*. Por fim, durante a fase de (vi) aclimatização, as plântulas passam por ajustes anatômicos, fisiológicos e metabólicos que determinam sua sobrevivência, estabelecimento e desenvolvimento completo (Mañogil et al., 2024; Sharma et al., 2023).

Apesar de constituírem as etapas finais da micropropagação, o enraizamento e, sobretudo, a aclimatização são amplamente reconhecidos como fases limitantes do processo. A brusca mudança das condições *in vitro* para um sistema *ex vitro* sob condições ambientais variáveis pode comprometer a funcionalidade estomática, o desenvolvimento do sistema radicular e a eficiência fotossintética, impactando diretamente a sobrevivência e o desempenho inicial das mudas (Grzelak; Pacholczak; Nowakowska, 2024).

2.2.1 Aplicações práticas: biofábricas e micropropagação comercial

A micropropagação transcende o âmbito laboratorial e encontra aplicação consolidada em sistemas de produção comercial de mudas e em plataformas biotecnológicas conhecidas como biofábricas. Esses sistemas permitem a multiplicação massiva de material genético livre de doenças, com padronização de qualidade genética confirmada por marcadores moleculares e citometria de fluxo quando necessário (Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo, 2024; Faisal; Alatar, 2022).

Na produção comercial de plantas, protocolos nodais e o uso de reguladores de crescimento como TDZ, BA e AIB permitem multiplicação rápida de cultivares visando à produção industrial em larga escala (Wongchaya et al., 2024). Em bananeira, sistemas de biorreatores de imersão temporária (TIB) aumentam significativamente a taxa de brotação, comprimento e sobrevivência, permitindo adaptação à produção em larga escala com alta eficiência de enraizamento e aclimatização (Thanonkeo et al., 2024). Esses sistemas em meio líquido reduzem custos operacionais e permitem escala industrial, superando limitações dos sistemas convencionais em meio sólido.

Além da produção de mudas, a cultura de tecidos vegetais é utilizada comercialmente em biofábricas, explorando a capacidade de células vegetais cultivadas *in vitro* de sintetizar compostos bioativos de alto valor agregado (Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo, 2024). Entre as vantagens comerciais destacam-se a multiplicação massiva de material genético em espaço físico reduzido comparado a viveiros convencionais e a padronização de qualidade genética (Wongchaya et al., 2024; Faisal; Alatar, 2022).

Contudo, desafios práticos persistem, incluindo custos de implantação e necessidade de infraestrutura para biorreatores e controle asséptico (Thanonkeo et

al., 2024). A aclimação pode ser ponto crítico para sobrevivência e exige protocolos específicos (Thanonkeo et al., 2024; Wongchaya et al., 2024). Adicionalmente, a regulamentação e qualidade em plantas para uso farmacêutico ou indústria alimentícia requer validação e rastreabilidade rigorosas (Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo, 2024).

Ainda assim, a micropropagação se consolida como uma das ferramentas mais eficientes e versáteis da biotecnologia vegetal moderna, sendo essencial para acelerar processos de propagação, garantir a sanidade vegetal (Chukwu et al., 2025), e conservação de recursos genéticos (Bettoni; Wang; Wang, 2024), visto que variantes somaclonais são alvo de estudo contínuo para a obtenção de genes de interesse agrônomo, especialmente aqueles associados à resistência biótica e abiótica, utilizando como recurso estratégico para o desenvolvimento e o lançamento de novas cultivares (Amorim et al., 2025; Deepthi, 2018).

2.3 Atuação dos Reguladores de Crescimento Citocinínicos na Micropropagação de *Musa spp.*

As citocininas pertencem ao grupo dos fitormônios, quando naturais, e têm sua atividade metabólica diretamente associada à estimulação da divisão celular, desempenhando papel fundamental no controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas (Abdalla; Dobránszki, 2024; Márquez-López; Quintana-Escobar; Loyola-Vargas, 2019; Cid; Teixeira, 2015). Essas substâncias podem ser também sintetizadas laboratorialmente, recebendo o nome de reguladores de crescimento vegetal, exercendo a mesma função dos hormônios vegetais (Silva et al., 2020; George et al., 2008), além disso, as citocininas podem atuar em conjunto com outros reguladores de crescimento, regulando processos como a atividade regenerativa, a diferenciação celular e a formação de órgãos (Long et al., 2022; Kieber; Schaller, 2018), como auxinas e giberelinas, modulando respostas morfogênicas distintas de acordo com a concentração, o tipo de explante e o estágio de desenvolvimento do tecido (Pasternak; Steinmacher, 2024).

2.3.1 Sinalização hormonal e reprogramação celular

A regulação hormonal por auxinas e citocininas guia decisões fundamentais de organogênese e reprogramação celular em culturas in vitro, afetando divisão,

diferenciação e indução de raízes ou brotos. O equilíbrio auxina–citocinina determina o destino celular: concentrações maiores de citocinina (ex. BAP/BA) favorecem a organogênese de gemas e brotos, enquanto auxinas (ex. NAA, AIB) favorecem enraizamento ou formação de calo, conforme demonstrado em protocolos eficientes de regeneração de diversas espécies (Faisal; Alatar, 2022; Chiappetta et al., 2014).

A reprogramação celular molecular envolve fatores de transcrição ligados à via auxínica: a modulação de membros da família ARF (Auxin Response Factors) foi associada à formação de raízes adventícias e à etapa de indução, mostrando ligação direta entre sinalização auxínica e ativação de programas de divisão celular (Chiappetta et al., 2014). O controle do ciclo celular é acompanhado por marcadores de replicação cromossômica como HISTONA H3, cuja expressão muda na fase de indução de raiz, indicando coordenação entre sinais hormonais e a maquinaria de progressão do ciclo celular (Chiappetta et al., 2014).

Essas evidências moleculares demonstram que a interação auxina–citocinina não se limita a efeitos fisiológicos superficiais, mas envolve cascatas de sinalização que regulam a expressão gênica, a atividade de fatores de transcrição e a progressão do ciclo celular, determinando a competência morfogênica dos tecidos cultivados in vitro. A otimização de meios de cultura (força basal, pH) e combinações de BA/cinetina com NAA/IAA maximizaram taxa de regeneração e número de brotos por explante em diferentes espécies, reforçando que ajustes finos nos reguladores de crescimento são cruciais para eficiência da micropropagação (Faisal; Alatar, 2022).

2.3.2 Citocininas na cultura de tecidos vegetais

Na cultura de tecidos vegetais, as citocininas são amplamente utilizadas em razão de sua elevada capacidade de induzir brotações adventícias, seja por embriogênese somática, caracterizada pela formação de embriões bipolares estrutural e funcionalmente equivalentes aos embriões zigóticos (Adero; Tripathi; Tripathi, 2023), ou por organogênese, que envolve a neoformação de órgãos unipolares a partir de tecidos competentes, como gemas axilares, meristemas apicais ou células somáticas (Tuncer, 2021). Em ambas as rotas morfogênicas, a via direta decorre da reprogramação celular, sem fase de calogênese, enquanto a via indireta pressupõe desdiferenciação celular, calogênese e posterior determinação

morfogênica. Dessa forma, esses reguladores atuam preferencialmente em regiões celulares caracterizadas por intensa atividade mitótica e elevado potencial regenerativo, favorecendo processos de diferenciação e multiplicação celular (Li et al., 2022; Cid; Teixeira, 2015).

Nos métodos de cultivo *in vitro*, a ação desses reguladores de crescimento é potencializada pela adição exógena de concentrações mínimas e controladas ao meio de cultura, permitindo que sejam absorvidos e assimilados pelo metabolismo vegetal (Yang et al., 2025; Ai et al., 2024). Essa suplementação hormonal desencadeia respostas morfogênicas específicas, de modo que a adição de citocininas favorece a indução de brotos e a multiplicação celular, enquanto a aplicação de auxinas estimula predominantemente a formação de raízes, refletindo o papel fisiológico natural desses reguladores no metabolismo vegetal (Nagel; Heinzmann, 2024).

2.3.3 Benziladenina (BA)

A Benziladenina (BA) é um regulador de crescimento vegetal sintético do grupo das adeninas, amplamente difundido em sistemas de multiplicação *in vitro* devido à sua elevada eficiência na indução de brotações adventícias e na quebra da dominância apical (Dias, 2022). Sua atuação fundamenta-se na modulação do ciclo celular e na ativação de genes responsáveis pela manutenção e diferenciação de tecidos meristemáticos (Bozsó; Barna, 2021). Além disso, a BA desempenha um papel crucial no equilíbrio hormonal quando associada a outros reguladores de crescimento, como as auxinas, direcionando as respostas morfogênicas para a via da organogênese direta ou indireta (Schaller; Bishopp; Kieber, 2015). Na cultura de *Musa spp.*, este regulador é o mais empregado em protocolos de micropropagação, demonstrando superioridade na taxa de multiplicação e na qualidade dos explantes produzidos (Siregar et al., 2025; Nugrahani et al., 2024; Kavitha et al., 2021; Pereira et al., 2018).

Apesar da eficiência da benziladenina, o uso prolongado ou em elevadas concentrações pode estar associado a efeitos fisiológicos indesejáveis, como hiperidricidade, senescência precoce e até mesmo variação somaclonal em brotos adventícios (Sianipar et al., 2024; Vasconcelos et al., 2012).

2.3.4 Meta-topolina (mT)

Nesse contexto, a meta-topolina (mT), uma citocinina aromática de ocorrência natural, tem sido amplamente investigada (Doležal et al., 2021; Nisler, 2021; Plíhalová et al., 2021). Estudos demonstram que a mT supera a BA em diversos protocolos, pois, além de promover uma proliferação axilar vigorosa, seus subprodutos metabólicos são menos inibitórios, o que reduz drasticamente a incidência de hiperidricidade e melhora a qualidade fitossanitária das brotações regeneradas (Ptak et al., 2023; Işlek, 2021) promovendo maior estabilidade regenerativa in vitro quando comparada a outras citocininas (Koç, 2021). Em *Musa spp.* as concentrações testadas e comparadas a outras citocininas como BA e thidiazuron (TDZ), apresentaram valores altamente significativos quanto à produção de brotos e formação de plantas com vigor morfofisiológico superiores (Pingua, 2023; Keshari; Mohapatra; Deo, 2020) e também em outras culturas como maçã (*Malus domestica* Borkh) (Abdalla; Dobránszki, 2024) e Kucharska et al. (2020) utilizando groselha (*Ribes grossularia*) como modelo experimental, recomendam o uso de mT como uma citocinina alternativa para multiplicação in vitro.

2.3.5 Thidiazuron (TDZ)

Desenvolvido inicialmente para fins agrícolas, o thidiazuron foi utilizado em culturas de algodão como agente desfoliante (Murthy et al., 1998; Arndt et al., 1976, apud Lu, 1993). Posteriormente, o composto passou a ser classificado como uma citocinina sintética do grupo das fenilureias, distinguindo-se das citocininas purínicas, como a benziladenina e a meta-topolina, pertencentes ao grupo das adeninas (Doležal; Bryksová, 2021; Guo et al., 2011). Em função de seu comportamento regenerativo e elevada atividade citocinínica, o TDZ passou a ser amplamente empregado em sistemas de cultura de tecidos, destacando-se na indução de brotações e em processos regenerativos, incluindo a embriogênese somática (Tuncer, 2021; Pai; Desai, 2018; Dewir et al., 2018). Em *Musa spp.*, sua aplicação tem sido associada à formação de aglomerados de brotos e nódulos meristemáticos (Hapsoro et al., 2024; Sorn; Chhon; Kun, 2024; Darvari et al., 2010), refletindo sua intensa ação morfogênica. Contudo, o uso do TDZ pode acarretar efeitos fisiológicos indesejáveis, como hiperidricidade, inibição do alongamento dos brotos e dificuldades no enraizamento subsequente, especialmente quando

empregado em concentrações elevadas ou por longos períodos de exposição (Dewir et al., 2018; Guo et al., 2011). Assim, embora o TDZ se destaque pelo elevado potencial regenerativo, sua utilização requer criteriosa otimização das condições de cultivo.

No contexto da micropropagação, as citocininas apresentam comportamentos fisiológicos distintos, refletindo diferenças estruturais, metabólicas e de interação hormonal. Assim, a escolha do tipo e da concentração de citocinina deve considerar as características da espécie, o estágio de desenvolvimento e os objetivos do protocolo, uma vez que o equilíbrio hormonal adequado é fator determinante para o sucesso da micropropagação.

2.4 Variação Somaclonal

O uso contínuo de subculturas em sistemas de micropropagação pode favorecer a ocorrência de variações somaclonais (Armini et al., 2021; Rajan e Singh, 2021; Santos e Rodrigues, 2004). Essas variações decorrem de alterações genéticas e epigenéticas, incluindo instabilidade cromossômica, modificações no padrão de metilação do DNA e estresse oxidativo associado às condições de cultivo in vitro, comprometendo a estabilidade genética das plantas regeneradas (Sianipar et al., 2024). Nesse contexto, a variação somaclonal não deve ser interpretada como um evento isolado, mas como resultado da interação entre múltiplos fatores celulares e moleculares desencadeados pelo ambiente artificial de cultivo.

Entre as manifestações mais evidentes desse fenômeno, destacam-se as alterações citogenéticas. A variação somaclonal pode expressar-se por meio de aneuploidia, poliploidia, translocações cromossômicas e endoreduplicação. Esta última, caracterizada pela replicação do DNA sem divisão celular subsequente, resulta em células com níveis de ploidia aumentados e pode ser induzida por condições de estresse típicas do cultivo in vitro. Tais alterações cromossômicas comprometem a estabilidade genética e podem refletir negativamente no desempenho agrônomo das plantas regeneradas, tornando essencial o monitoramento citogenético em programas de micropropagação.

Contudo, embora as alterações estruturais do genoma sejam amplamente documentadas, os mecanismos epigenéticos subjacentes à variação somaclonal têm recebido crescente atenção nos últimos anos. A reprogramação celular durante o

cultivo in vitro envolve mudanças profundas na organização da cromatina e na expressão gênica. Estudos demonstram, por exemplo, a modulação da expressão de HISTONA H3 durante a indução de raízes (Chiappetta et al., 2014), sugerindo alterações na dinâmica cromatínica associadas à reprogramação celular e possíveis consequências epigenéticas funcionais.

A metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de histonas constituem mecanismos epigenéticos capazes de alterar a expressão gênica sem modificar a sequência nucleotídica. Durante o cultivo in vitro, esses processos podem ser influenciados por fatores como estresse oxidativo, desbalanço hormonal e composição nutricional do meio de cultura, resultando em mudanças potencialmente hereditárias. Assim, a variação somaclonal pode emergir não apenas de alterações estruturais no genoma, mas também de reprogramações epigenéticas induzidas pelo ambiente de cultivo. Ainda assim, estudos específicos de metiloma e análises integradas envolvendo espécies reativas de oxigênio (ROS) e regulação epigenética são necessários para elucidar de forma mais abrangente os mecanismos causais desse fenômeno.

Paralelamente aos eventos genéticos e epigenéticos, o estresse oxidativo desempenha papel central na instabilidade observada em sistemas de cultura de tecidos. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode desencadear danos ao DNA, lipídios e proteínas, promovendo mutações e alterações epigenéticas. Evidências experimentais indicam que o manejo do estado redox influencia diretamente a saúde do tecido cultivado. Em culturas de *Crocus sativus*, por exemplo, tratamentos com ácido salicílico reduziram o escurecimento (browning) e demonstraram efeito protetor contra o estresse oxidativo (Ahmed et al., 2025), sugerindo que o controle redox pode contribuir para a manutenção da estabilidade genética e epigenética.

Dessa forma, a interação entre estresse oxidativo, produção de ROS e mecanismos epigenéticos configura uma rede complexa de respostas celulares que culminam na variação somaclonal. O manejo adequado dessas variáveis, seja por suplementação antioxidante ou por ajustes nas condições de cultivo, representa estratégia promissora para reduzir a instabilidade genética e aprimorar a qualidade das plantas micropropagadas.

2.5 Citometria de fluxo como ferramenta de monitoramento

A citometria de fluxo é amplamente recomendada para a determinação do conteúdo nuclear de DNA, estimativa de ploidia, análise da atividade do ciclo celular e quantificação de níveis de endorreduplicação em plantas, sendo suas diretrizes práticas, aplicações e limitações metodológicas bem estabelecidas na literatura (Sliwinska et al., 2022; Faisal; Alatar, 2022). Em programas de melhoramento genético e controle de qualidade na micropropagação, essa técnica destaca-se como ferramenta estratégica para o monitoramento da estabilidade citogenética.

Entre suas principais vantagens, ressalta-se a rapidez e a elevada sensibilidade na mensuração do conteúdo nuclear de DNA, permitindo a análise simultânea de milhares de núcleos por amostra (Leus et al., 2009). Essa capacidade confere robustez estatística às estimativas de ploidia e possibilita a detecção de alterações cromossômicas mesmo quando presentes em baixa frequência. Além disso, a citometria de fluxo apresenta ampla aplicabilidade, sendo empregada em estudos de sistemática, ecologia, biologia reprodutiva, análises em culturas de tecidos e programas de melhoramento vegetal, especialmente na identificação de poliploidia e endorreduplicação (Sliwinska et al., 2022).

No contexto específico da micropropagação, a técnica assume papel fundamental na validação da homogeneidade genética de plantas regeneradas. Estudos demonstram sua aplicação prática na confirmação da estabilidade cromossômica, como observado em *Plectranthus amboinicus* (Faisal; Alatar, 2022; Sliwinska et al., 2022), reforçando seu potencial como ferramenta de controle de qualidade em sistemas comerciais de produção de mudas.

Entretanto, apesar de suas vantagens operacionais, a citometria de fluxo apresenta limitações que devem ser consideradas para garantir a confiabilidade dos resultados. A presença de metabólitos secundários e compostos citotóxicos pode interferir no preparo das amostras e na intensidade de fluorescência, exigindo protocolos específicos de extração nuclear e, frequentemente, otimização para cada espécie (Nix; Ranney; Lynch, 2024; Sliwinska et al., 2022). Essa limitação torna-se particularmente relevante em tecidos lenhosos ou ricos em compostos fenólicos.

Adicionalmente, o uso de padrões internos adequados e a adoção de procedimentos metodológicos rigorosamente padronizados são indispensáveis para assegurar reprodutibilidade e comparabilidade entre análises (Nix; Ranney; Lynch,

2024; Leus et al., 2009). Cabe destacar ainda que a técnica permite inferir conteúdo de DNA e distribuição das fases do ciclo celular, mas não detecta diretamente mutações na sequência gênica ou alterações epigenéticas, como padrões de metilação do DNA e modificações de histonas, sendo necessária a associação com métodos complementares para análises moleculares mais aprofundadas.

Dessa forma, a citometria de fluxo constitui ferramenta rápida, robusta e altamente informativa para avaliações citogenéticas em programas de melhoramento e controle de qualidade na micropropagação, desde que suas limitações metodológicas sejam devidamente consideradas. Sua aplicação possibilita a detecção precoce de alterações cromossômicas, contribuindo significativamente para a manutenção da estabilidade genética em sistemas comerciais de produção de mudas.

2.6 Thin Cell Layer (TCL)

No sistema de cultivo *in vitro*, a técnica Thin Cell Layer (TCL), desenvolvida por Tran Thanh Van, em 1973 (Van, 1973), marcando um importante avanço na biotecnologia aplicada à cultura de tecidos vegetais, oferecendo um potencial regenerativo viável para tecidos mais complexos de regeneração *in vitro* (Phong et al., 2023). A técnica consiste na utilização de finas seções de tecido vegetal, obtidas de diferentes órgãos, como caule, folhas, raízes, inflorescências, ápice caulinar ou embriões (Singh, 2021; Van, 2003). Essas camadas podem ser seccionadas de forma transversal (tTCL) ou longitudinal (ITCL), em relação ao órgão de origem (Sharma, 2023).

A espessura reduzida desses explantes, aproximadamente 1,0 mm, influencia diretamente na capacidade organogênica ou embriogênica, pois proporciona o contato direto, ao meio de cultivo, de um número limitado de células envolvidas (Tung et al., 2022), favorecendo células ativas do tecido *in situ*, facilitando, então, a diferenciação, tornando a TCL uma técnica altamente responsiva para protocolos de regeneração em diversas espécies vegetais (Bravo-Ruiz et al., 2022; Van, 2003).

A aplicabilidade da TCL no cultivo *in vitro* demonstrou êxito em culturas de importância econômica como orquídeas (Lo et al., 2022; Wattanapan et al., 2018) em café (Avila-Victor et al., 2023) e outras culturas de interesse econômico. De

acordo Nhut et al. (2003), a TCL tem demonstrado seu potencial para protocolos de micropropagação em espécies frutíferas como maçã (*Malus spp.*), kiwi (*Actinidia chinensis*), maracujá (*Passiflora edulis* Sims) e pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) (Sharma et al., 2023), contribuindo significativamente nos sistemas de propagação em larga escala dessas espécies.

Entre suas principais vantagens estão a economia de espaço em laboratório, menor volume de meio de cultura (Sharma et al., 2023), além do maior número de explantes por unidade de tecido e resposta mais rápida à indução morfogênica (Bravo-Ruiz et al., 2022; Singh, 2021; Nhut et al., 2003).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F. M.; DOBRÁNSZKI, J. Meta-topolin: a superior cytokinin for plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 156, n. 3, p. 445–462, 2024.

ADERO M, TRIPATHI JN, TRIPATHI L. Advances in Somatic Embryogenesis of Banana. **International Journal of Molecular Sciences**, v.24, (ed.13). 2023. DOI:<https://doi.org/10.3390/ijms241310999>

AGBADJE, E. T. A. E.; AGBIDINOUCOUN, A.; ZANDJANAKOU-TACHIN, M.; CACAÏ, G. T. H.; AHANHANZO, C. Mass Production of Bananas and Plantains (*Musa spp.*) Plantlets through in vitro Tissue Culture Partway: A Review. **European Journal of Biology and Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 1–8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.24018/ejbio.2021.2.4.229>.

AI, Y.; CHEN, Y.; ZHU, S.; JIANG, L.; CHEN, J.; LI, C.; LI, P.; ZENG, W.; KUANG, D.; LIU, Q.; YANG, Y. The Impacts of Plant Growth Regulators on the Rapid Propagation of *Gardenia jasminoides* Ellis. In Tissue Culture. **Forests**, v.15, p. 446, 2024. <https://doi.org/10.3390/f15030446>AMA Style

AMARO, G. B.; SANTOS, L. S.; COELHO, M. A. Banana cultivation in the Brazilian semi-arid region: opportunities and constraints. **Scientia Horticulturae**, v. 289, p. 110456, 2021.

AMARO, G. C.; FIDELIS, E. G.; SILVA, R. S. da; MEDEIROS, C. M. de. **Concentração espacial da produção de bananas (*Musa spp.*) no Brasil**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2021.

AMORIM, E. P.; AMORIM, V. B. de O.; HADDAD, F. Banana: melhoramento genético e sistemas de produção. In: FALEIRO, F. G. (ed.). **Fruticultura tropical: capacitação e experiências de sucesso**. Brasília, DF: Embrapa, 2025. Cap. 10, p. 153-170. ISBN 978-65-5467-083-8.

AMORIM, E. P.; SILVA, S. O.; FERREIRA, C. F. Breeding banana for resistance to Fusarium wilt tropical race 4: challenges and perspectives. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 25, n. 1, e-45678, 2025.

AREMU, A. O.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation-associated challenges. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 197–206, 2011.

ARMINI, J. L.; TENAGLIA, G. C.; PARISOD, C. G.; PRATTA, G. R. Banana somaclonal variation assessed by Amplified Fragment Length Polymorphism profiles at early cycles of in vitro culture. **AgriScientia**, v. 38, n. 2, p. 143-148, 2021.

ASSIS, J. L. J.; LEONEL, M.; VIANA, E. S.; AMORIM, E. P.; REIS, R. C.; CARVALHO, C. W. P.; NETA, P. J.; LEONEL, S. Banana and plantain starches: exploring differences and potential applications. **Horticulturae**, v. 11, n. 10, p. 1214, 2025. DOI: 10.3390/horticulturae11101214.

AVILA-VICTOR, C. M.; ORDAZ-CHAPARRO, V. M.; ARJONA-SUÁREZ, E. J.; IRACHETA-DONJUAN, L.; GÓMEZ-MERINO, F. C.; ROBLEDO-PAZ, A. In vitro mass propagation of coffee plants (*Coffea 29nosito* L. var. Colombia) through indirect somatic embryogenesis. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1237, 2023. DOI: 10.3390/plants12061237.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147–173, 2011.

BAIRU, M. W.; STIRK, W. A.; DOLEZAL, K.; VAN STADEN, J. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 1, p. 15–23, 2007.

BAIRU, M. W.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, n. 3, p. 239–248, 2009.

BETTONI, J.C.; WANG, M. R.; WANG, Q. C. Regeneração In Vitro, Micropropagação e Conservação de Germoplasma de Plantas Hortícolas. **Horticulturae**, v. 10, p.45, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010045>

BHATIA, S.; SHARMA, K. Micropropagation. In: **Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences**. Elsevier, 2015. P. 361–368. DOI: 10.1016/B978-0-12-802221-4.00011-X.

BHOSALE, U. P.; MALI, S. S.; JADHAV, H. E. In vitro induction of tetraploidy in banana using colchicine and oryzalin: a flow cytometric analysis. **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 23–28, 2011.

BRAVO-RUIZ, I. N.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; CASTAÑEDA-CASTRO, O.; PASTELÍN-SOLANO, M. C.; CRUZ-CRUZ, C. A. Use of thin cell layer (TCL) to obtain somatic embryogenesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 2527, p. 183–201, 2022. DOI: 10.1007/978-1-0716-2485-2_14.

BOZSÓ, Z.; BARNA, B. Diverse Effect of Two Cytokinins, Kinetin and Benzyladenine, on Plant Development, Biotic Stress Tolerance, and Gene Expression. **Life**, [s. l.], v. 11, n. 12, art. 1404, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11121404>.

BOZSÓ, Z.; BARNA, B. The role of cytokinins in plant defense and development. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 56, n. 1, p. 23–38, 2021.

CASSELLS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 145–157, 2001.

CAVALIER-SMITH, T. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 147–175, 2005.

CHHON, Y. et al. Effect of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) on shoot proliferation in micropropagated Cavendish banana (*Musa acuminata*). **International Journal of Agronomy**, v. 2025, 2025.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (ed. téc.). **Cultivo in vitro de plantas**. 4. Ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. Cap. 1, p. 1-28.

CHAUDHARI, V. M. Tissue Culture: Aeon of Micro Propagation in Vegetable Crops. **International Journal of Environment and Climate Change**, v. 13, p. 1989-1999, 2023.

CHUKWU, S. C.; AWALA, S. K.; ANGOMBE, S.; MBEWANA, S.; KARAMURA, D.; KARAMURA, E.; TALWANA, H. Recent progress in tissue culture techniques and biotechnological innovations for banana production (*Musa spp.*): a review. **Discover Plants**, v. 2, art. 13, 2025. DOI: 10.1007/s44372-025-00099-2.

CONAFER. **BRS TERRA-ANÃ: Embrapa desenvolve novo cultivar com mais produtividade e qualidade para a banana-terra**. 2022. Disponível em: <https://conifer.org.br/brs-terra-ana-embrapa-desenvolve-novo-cultivar-com-mais-produtividade-e-qualidade-para-a-banana-terra/>. Acesso em: 03/07/25.

DAGNEW, A.; SHIBRU, S.; DEBEBE, A.; LEMMA, A.; DESSALEGN, L.; BERHANU, B.; BEYENE, W.; SIERRA, Y. M. Micropropagation of banana varieties (*Musa spp.*) using shoot-tip culture. **Ethiopian Journal of Agricultural Sciences**, v. 22, p. 14-25, 2012.

DARVARI, F. M.; SARIAH, M.; PUAD, M. P.; MAZIAH, M. Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa sp.*) cultivars using male flowers. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 16, p. 2360–2366, 2010. ISSN 1684-5315.

DEEPTHI, V. P. Somaclonal variation in micro propagated bananas. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 8, n. 6, p. 624–627, 2018. DOI: 10.15406/apar.2018.08.00395.

DEWIR, Y. H.; NURMANSYAH, N. Y.; NAIDOO, Y.; DA SILVA, J. A. T. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 1451–1470, 2018. DOI: 10.1007/s00299-018-2326-1.

DIAS, J. P. T. (org.). **Usos e aplicações de reguladores vegetais**. Belo Horizonte: EdUEMG, 2020. 142 p.

DOLEŽEL, D. W.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233–2244, 2007

DOLEŽAL, K.; BRYKSOVÁ, M. Metabolism of Topolins and Its Implications for In Vitro Plant Micropropagation. In: AHMAD, N.; STRNAD, M. (ed.). **Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture**. Cham, Switzerland: Springer Nature, 2021. Cap. 6, p. 111-125. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-41866-3_6

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 99–110, 2005.

DUTA-CORNESCU, G.; CONSTANTIN, N.; POJOGA, D.-M.; NICUTA, D.; SIMON-GRUITA, A. Somaclonal variation—advantage or disadvantage in micropropagation of the medicinal plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, art. 838, 2023. DOI: 10.3390/ijms24010838.

EMBRAPA. BRS Terra-Anã: nova variedade de porte baixo, elevada produtividade e melhor qualidade de amido para o mercado de banana-da-terra. Cruz das Almas, BA: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2022, 4p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1148028>. Acesso em: 03/07/25.

EMBRAPA. **Plátano BRS Terra-Anã.Tecnologias**,2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/8469/platano-brs-terra-ana>. Acesso em:06/7/25.

ESCOBEDO-GRACIA-MEDRANO, R. M.; BURGOS-TAN, M. J.; KU-CAUICH, J. R.; QUIROZ-MORENO, A. Using flow cytometry analysis in plant tissue culture derived plants. In: JAIN, S. M.; BRAR, D. S. (ed.). **Plant cytogenetics: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2018. P. 317–332. (Methods in Molecular Biology, v. 1815). DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4_22.

FAÇANHA, D. C.; MOTTA, D. N.; PEREIRA, M. C. N.; QUISEN, R. C. Uso de BAP e metatopolina na indução e proliferação de brotações in vitro da bananeira cultivar Pacovan. In: CORDEIRO, E. R.; OLIVEIRA, I. J.; SOUZA, M. G.; MORAIS, R. R. (Org.). **Anais da XIV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2018

FAISAL, M.; ALATAR, A.A. Establishment of an Efficient In Vitro Propagation Method for a Sustainable Supply of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) and Genetic Homogeneity Using Flow Cytometry and SPAR Markers. **Horticulturae**, v.8, p. 693, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080693>

FERREIRA, M. d. S.; ROCHA, A. d. J.; NASCIMENTO, F. d. S.; OLIVEIRA, W. D. d. S.; SOARES, J. M. d. S.; REBOUÇAS, T. A.; MORAIS LINO, L. S.; HADDAD, F.; FERREIRA, C. F.; SANTOS-SEREJO, J. A. d.; AMORIM, E. P. The role of somaclonal variation in plant genetic improvement: a systematic review. **Agronomy**, v. 13, art. 730, 2023. DOI: 10.3390/agronomy13030730.

FRANKS, P. J.; BEERLING, D. J. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 25, p. 10343–10347, 2009.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, n. 4601, p. 1049–1051, 1983.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C.; JUNQUEIRA, N. T. V. Fusarium wilt of banana: a review of the disease and management strategies. **Summa Phytopathologica**, v. 47, n. 2, p. 89–102, 2021.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. **Sigatoka-negra: desafios para a bananicultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa, 2010.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. (ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. Ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GEORGE, M.A., SANTOS, M.J. Effects of tree cover and crop diversity on biodiversity and food security in tropical agricultural landscapes. **Landsc Ecol**. V.40, p. 156,2025). <https://doi.org/10.1007/s10980-025-02167-0>.

GEORGE, S.; SANTOS, A. Banana production and food security in developing countries. **Food Security**, v. 17, n. 2, p. 145–162, 2025.

GREGORY, T. R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. **Biological Reviews**, v. 76, n. 1, p. 65–101, 2001.

GREGORY, T. R. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 133–146, 2005.

GRZELAK, M.; PACHOLCZAK, A.; NOWAKOWSKA, K. Challenges and insights in the acclimatization step of micropropagated woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.159, 2024.

GUO, B.; ABBASI, B. H.; ZEB, A.; XU, L. L.; WEI, Y. H. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984–9000, 2011. ISSN 1684-5315.

HAPSORO, D.; PRAYOGI, A. N.; RAMADIANA, S.; YUSNITA, Y. Scalp and shoot formation in response to thidiazuron concentrations in vitro culture of plantain 'Tanduk'. **Jurnal Agrotropika**, v. 24, n. 1, p. 1–8, 2025. DOI: 10.23960/ja.v24i1.9927.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704–1712, 2003.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105–120, 2006.

HESLOP-HARRISON, P.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*, **Oxford University Press**, v. 100, n. 5, p. 1073–1084, 2007. DOI: 10.1093/aob/mcm191.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 18–33, 2007.

HO, W. W.; ENG, W. H.; LING, A. P. K. Flow cytometry as a rapid technique in detecting genome size variation during micropropagation of *Typhonium flagelliforme*. **Plants**, v. 13, n. 5, p. 678, 2024.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, 2025.

IBGE. **Produção estimada de banana (2024-2025)**. 2025. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=banana>. Acesso em: 18 nov. 2025

IŞLEK, C. Efeito de meta-topolinas na senescência. *In*: AHMAD, N.; STRNAD, M. (org.). **Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture**. Singapore: Springer, 2021. Cap. 7. DOI: 10.1007/978-981-15-9046-7_7.

JIN, S.; MUSHKE, R.; ZHU, H.; TU, L.; LIN, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 8, p. 1303–1316, 2008. DOI: 10.1007/s00299-008-0557-2.

JURADO-MAÑOGIL, C.; DÍAZ-VIVANCOS, P.; HERNÁNDEZ, J. A.; LOZANO, R.; GARCÍA-CAPARRÓS, P. Efficient in vitro platform for multiplication, acclimatization, and delivery of high-NaCl-tolerant clones of the halophyte *Arthrocaulon macrostachyum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 1631–1641, 2024. DOI: 10.1007/s00344-023-11210-w.

KARWASRA, R. K.; NAZIR, R.; PANDEY, D. K. Meta-topolin mediated improved micropropagation, phytochemical profiling, and assessment of genetic fidelity in *Chlorophytum borivillianum* Sant. Et Fernand., an endangered medicinal herb. **Industrial Crops & Products**, v. 214, p. 118463, ago. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118463>

KAVITHA, N.; SARASWATHI, M. S.; KANNAN, G.; BATHRINATH, M.; BACKIYARANI, S.; UMA, S. Development of direct regeneration protocol for mass multiplication of *Musa spp.* Variety Udhayam (Pisang Awak, ABB) using different explants. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 290, art. 110506, p. 1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110506>.

KESHARI, B.; MOHAPATRA, N.; DEO, B. Study of meta-topolin in multiplication culture of local variety Champa (*Musa spp.*) through in vitro culture. **International Journal of Botany Studies**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 572–575, 2020.

KIEBER, J. J.; SCHALLER, G. E. Cytokinin signaling in plant development. **Development**, [s. l.], v. 145, n. 4, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.149344>.

KOÇ, E. Effects of meta-topolin on the growth, physiological and biochemical parameters in plant tissue culture. In: AHMAD, N.; STRNAD, M. (Org.). **Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture**. Singapore: Springer Nature, 2021. Cap. 19. DOI: 10.1007/978-981-15-9046-7_19.

KRISHNA, H. et al. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 54, 2016.

KUCHARSKA, D.; ORLIKOWSKA, T.; MACIOROWSKI, R.; KUNKA, M.; WÓJCIK, D.; PLUTA, S. Application of meta-Topolin for improving micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia*). **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 272, art. 109529, 2020. DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109529.

KUMARI, A.; KUMAR, V. B. Optimized protocol for high-efficiency micropropagation of banana varieties G9 and Malbhog. **Journal of Applied and Basic Biology**, 2025.

KUMAR, G. T.; SATISHA, K. M.; RAMESH, C. K. B. In vitro micropropagation techniques for (*Musa spp*) banana Grand-9 variety. **Zenodo**, 2022. DOI: 10.5281/zenodo.6619058.

KUNDU, S.; SINDHUSHA, P.; KUMAR, A. Micro-propagation techniques in horticultural crops and various factors affecting it: a review. **Mod Phytomorphol**, v. 15, p. 137-141, 2021.

LAKSHMANAN, V.; VENKATARAMAREDDY, S. R.; NEELWARNE, B. Molecular analysis of genetic stability. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 106–113, 2007.

LEUS, L.; VAN LAERE, K.; DEWITTE, A.; VAN HUYLENBROECK, J. Flow Cytometry For Plant Breeding. **Acta Horticulturae**, n. 836, p. 221–226, 2009. DOI: <https://doi.org/10.17660/actahortic.2009.836.31>.

LI, H.; LIU, F.; SONG, S.; WANG, C.; SUN, H. Highly effective organogenesis and somatic embryogenesis of *Clivia*. **Scientia Horticulturae**, v. 306, p. 111443, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111443>

LIANG, M.; TU, S.; FU, J.; WANG, J.; SHENG, O. Structural and physicochemical characterization of resistant starch from sixteen banana cultivars across three genome groups. **Foods**, v. 13, n. 20, p. 3277, 2024. DOI: 10.3390/foods13203277.

LO, K.-C.; GANSAU, J. A.; SHIH, C.-H.; KAO, C.-Y. Shoot development through modified transverse Thin Cell Layer (tTCL) culture of Phalaenopsis hybrid protocorms. **Horticulturae**, v. 8, art. 206, 2022. DOI: 10.3390/horticulturae8030206.

LONG, Y.; YANG, Y.; PAN, G.; SHEN, Y. New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, art. 926752, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926752>.

LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 29, p. 92–96, 1993.

LUP, S. D.; TIAN, X.; XU, J.; PÉREZ-PÉREZ, J. M. Wound signaling of regenerative cell reprogramming. **Plant Science**, v. 250, p. 178–187, 2016. DOI: 10.1016/j.plantsci.2016.06.012

MAJUMDER, S.; IGAMBERDIEV, A. U.; DEBNATH, S. C. Somaclonal variation and clonal fidelity in commercial micropropagation: challenges and perspectives. **Agronomy**, v. 15, art. 1489, 2025. DOI: 10.3390/agronomy15061489

MAKHSUNAH, I. T.; HABIBI, A. M.; KHOFIFA, R. A. N.; UBAIDILLAH, M. Efficient regeneration local banana tissue culture using floral apices by cytokinin combination. **Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia**, v. 10, n. 2, p. 355–360, 2023. DOI: 10.55981/jbbi.2023.3123.

MARCILIO, H. C.; SILVA, E. C.; TEIXEIRA, E. C.; RAMOS, M. J. M.; RODRIGUES, M.; ANDRADE, A. L. **Cultivo da bananeira BRS Terra Anã: sistema de produção para o estado de Mato Grosso**. Cuiabá: Empresa Mato-grossense de Pesquisa, Assistência e Extensão Rural (EMPAER-MT), 2022.

MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; QUINTANA-ESCOBAR, A. O.; LOYOLA-VARGAS, V. M. *Cytokinins, the Cinderella of plant growth regulators*. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 6, p. 1387–1408, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09656-6>

MASCARIN, G. M.; DELALIBERA JR., I.; OLIVEIRA, J. E. M. Biological 35nositol35f banana weevil... **BioControl**, v. 67, n. 3, p. 245–260, 2022.

MASCARIN, G. M.; MARINHO-PRADO, J. S.; ASSALIN, M. R.; MARTINS, L. G.; BRAGA, E. S.; TASIC, L.; DITA, M.; LOPES, R. B. Natural occurrence of *Beauveria caledonica*, pathogenicity to *Cosmopolites sordidus* and antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 78, n. 7, p. 2892–2901, 2022.

MASEKO, M.; MKHIZE, M. S.; MTHEMBU, N. P.; ZUMA, S. Genetic diversity and population structure of banana (*Musa spp.*). **South African Journal of Botany**, v. 168, p. 234–245, 2024.

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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112688>.

MIA, M. A. S. et al. Optimization of BAP concentration... **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 35, n. 1, 2025.

MORDOR INTELLIGENCE. **Banana Market Size – Industry Report on Share, Growth Trends & Forecasts Analysis (2025 – 2030)**. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/banana-market>. Acesso em: 26 jul. 2025.

MORAES, W.; TEIXEIRA, L.; RODRIGUES, F.; MARQUES, E.; VIEIRA, H.; DITA, M. **Intensidade da Sigatoka negra e Sigatoka amarela em bananais afetados pela fusariose no estado de São Paulo**. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, ed. 50, 2017, Uberlândia, MG. Anais [...]. Uberlândia, MG: [s.n.], 2017. ISBN 978-85-66836-16-5.

MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 110-121, 2012.

MUHIE, S. H.; TESHOME, A. S. Effects of benzylaminopurine and macro propagation techniques on multiplication of dessert banana (*Musa acuminata* L.). **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 11, p. 100515, 2023. DOI: 10.1016/j.jafr.2023.100515

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent cytokinin for plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, p. 1–14, 1998.

NAGEL, J. C.; HEINZMANN, N. Cultura de tecidos vegetais: a regulação hormonal no controle do desenvolvimento. In: SANTOS, I. L. V. L.; SILVA, C. R. C. (org.). **Estudos Aplicados em Botânica**. 1. Ed. Campina Grande: Editora Science, 2024. Cap. 9, p. 112-126. DOI: <https://doi.org/10.56001/24.9786500981315.09>.

NASRIN, S.; ISLAM, M. N. Rapid and efficient in vitro propagation protocol of banana (*Musa paradisiaca*) using sucker explants. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 277–284, 2025. DOI: 10.3329/ptcb.v35i2.86595

NAUTIYAL, A.; RASHID, A.; AGNIHOTRI, A. Induction of multiple shoots in *Oryza sativa*: roles of thidiazuron, 6-benzylaminopurine, decapitation, flooding, and Ethrel® treatments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 58, p. 1126–1137, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10316-2>

NAUTIYAL, S.; SHARMA, P.; JAIN, R. K. Thidiazuron: a potent plant growth regulator... **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 58, n. 4, p. 567–585, 2022.

NHUT, D. T.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; THORPE, T.; VAN LE, B.; VAN, T. T. Thin cell layer technology in fruit crop regeneration. In: NHUT, D. T.; VAN LE, B.; VAN, T. T.; THORPE, T. (Ed.). Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications. **Dordrecht: Springer**, 2003. P. 451–472. DOI: 10.1007/978-94-017-3522-3_12.

NISLER, J. TDZ: mode of action, use and potential in agriculture. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. (org.). **Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2018. Cap. 2. DOI: 10.1007/978-981-10-8004-3_2.

NIX, J.; RANNEY, T. G.; LYNCH, N. P.; CHEN, H. Flow Cytometry for Estimating Plant Genome Size: Revisiting Assumptions, Sources of Variation, Reference Standards, and Best Practices. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 149, n. 3, p. 131–141, 2024. DOI: 10.21273/JASHS05376-24.

NUGRAHANI, P.; PURNOBASUKI, H.; ANSORI, A. N. M.; ANUCHAI, J.; PRIYANTO, A. D. Effect of different strengths of MS media and BAP on banana plantlet growth in vitro. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 40, n. 4, p. 1110-1117, 2024. DOI: 10.17582/journal.sja/2024/40.4.1110.1117.

NWAUZOMA, A. B.; JAJA, E. T. A review of somaclonal variation in plantain (*Musa spp.*). **Journal of Applied Biosciences**, v. 67, p. 5252–5260, 2013.

OECD/FAO (2025), **Agricultural Outlook 2025-2034**, OECD Publishing, Paris/FAO, Rome, <https://doi.org/10.1787/601276cd-en>.

OH, T. J. et al. Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa spp.*)... **Physiologia Plantarum**, v. 129, n. 4, p. 766–774, 2007.

ORTIZ, R.; SWENNEN, R. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement... **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 158–169, 2014.

PAI, S. R.; DESAI, N. S. Effect of TDZ on various plant cultures. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. (Org.). **Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator**. Singapore: Springer, 2018. Cap. 25. DOI: 10.1007/978-981-10-8004-3_25.

PASTERNAK, T. P.; STEINMACHER, D. Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro. **Plants**, [s. l.], v. 13, n. 2, art. 327, p. 1-24, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13020327>.

PATEL, B.; SAHAY, N. S. Strategies for the improvement of micropropagation... **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 35, n. 1, 2025.

PAUDEL, R.; SHARMA, S.; THAPA, B. Application of flow cytometry in plant breeding and genetics. **Journal of Plant Breeding and Genetics**, v. 9, n. 2, p. 89–102, 2021.

PEREIRA, G. A.; SANTAELLA, M. B.; ALVES, L. M. S. M.; SILVA, E. C.; FLENGA, A. I. S.; SANTOS, D. M. A. Concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) in

micropropagation of banana 'Farta Velhaco' (AAB). **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 1, p. 58–63, 2018. DOI: 10.14295/cs.v9i1.2034

PERMADI, N.; NURZAMAN, M.; ALHASNawi, A. N.; DONI, F.; JULAeha, E. Managing lethal browning and microbial contamination in *Musa spp.* Tissue culture: synthesis and perspectives. **Horticulturae**, v. 9, n. 4, art. 453, 2023. DOI: 10.3390/horticulturae9040453.

PHONG, T. H.; HIEU, T.; TUNG, H. T.; MAI, N. T. N.; KHAI, H. D.; CUONG, D. M.; LUAN, V. Q.; NAM, N. B.; NHUT, D. T. Silver nanoparticles enhance the in vitro plant regeneration via thin cell layer culture system in purple passion fruit. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 155, p. 403–415, 2023. DOI: 10.1007/s11240-023-02566-8.

PLÍHALOVÁ, L. Synthesis and chemistry of meta-topolin and related compounds. In: AHMAD, N.; STRNAD, M. (Org.). **Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture**. Springer Nature, 2021. Cap. 2, p. 25–46. DOI: 10.1007/978-981-15-9046-7_2.

PINGUA, L. **Effect of meta-topolin on enhancement of in vitro multiplication rate in banana (*Musa spp.*) var. Grand Naine**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Birsa Agricultural University, Jharkhand, 2023.

PTAK, A.; SZEWCZYK, A.; SIMLAT, M.; BŁAŻEJCZAK, A.; WARCHOŁ, M. Meta-topolin-induced mass shoot multiplication and biosynthesis of valuable secondary metabolites in *Stevia rebaudiana* Bertoni bioreactor culture. **Scientific Reports**, v. 13, art. 15520, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-42619-8.

RAJAN, R. P.; SINGH, G. A review on application of somaclonal variation in important horticulture crops. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 22, n. 35–36, p. 161–175, 2021. ISSN 0972-2025.

RAMÍREZ-VILLALOBOS, M.; GARCÍA, E. Obtainment of embryogenic cell suspensions from scalps of the banana CIEN-BTA-03 (*Musa sp.*, AAAA) and regeneration of the plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 5, 2008. DOI: 10.2225/vol11-issue5-fulltext-3.

RAY, T. et al. Genetic stability of three economically important micropropagated banana... **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, n. 1, p. 11–21, 2006.

RIBEIRO, L. R.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. O. Micropropagation as a tool for producing disease-free banana plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 142, n. 2, p. 289–305, 2020

REUTHER, G. Current status and future prospects of large scale micropropagation in commercial plant production. **Food Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 445–459, 1990.

RIBEIRO, M.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; SANTOS, S. C. Micropropagação para a conservação de espécies e melhoramento genético. In: SANTOS, C. C. (Org.)

Agrobiodiversidade: manejo e produção sustentável. Volume I. Nova Xavantina, MT: Pantanal Editora, 2020. P. 43–61. DOI: 10.46420/9786588319147cap4.

ROCHA, A.D.J.; SOARES, J.M.D.S.; NASCIMENTO, F.D.S.; SANTOS, A.S.; AMORIM, V.B.D.O.; FERREIRA, C.F.; HADDAD, F.; SANTOS-SEREJO, J.A.D.; AMORIM, E.P. Improvements in the Resistance of the Banana Species to Fusarium Wilt: A Systematic Review of Methods and Perspectives. **J. Fungi** 2021, 7, 249. <https://doi.org/10.3390/jof7040249>

ROLLAND, J.; JOHNNY, D. In vitro propagation and multiplication of Sabah banana (*Musa acuminata* × *balbisiana*) using pseudostem. **Transactions of the Malaysian Society of Plant Physiology**, v. 32, p. 82, 2025.

SAHA, K. Influence of triploid *Musa spp.* Genome background... **Plants**, v. 14, n. 14, p. 2109, 2025.

SALMA, U. et al. Thidiazuron-mediated in vitro clonal propagation... **International Journal of Agriculture Extension and Social Development**, v. 7, n. 4, 2024.

SANTOS, C. C. C.; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 201–205, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052004000200005>

SCHALLER, G. E.; BISHOPP, A.; KIEBER, J. J. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. **The Plant Cell**, v. 27, n. 1, p. 44–63, 2015. DOI: 10.1105/tpc.114.133595

SCHELLENBAUM P, MOHLER V, WENZEL G, WALTER B. Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). **BMC Plant Biol.** 2008. Doi: 10.1186/1471-2229-8-78. PMID: 18627604; PMCID: PMC2491626.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S.; OLIVEIRA, J. P. Micropropagação de bananeira visando à produção massal de mudas de elevado padrão genético e fitossanitário. In: **EMBRAPA. Ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia.** Rio Branco: Embrapa Acre, 2009. Cap. 14, p. 247-284.

SHARMA, N.; KUMAR, N.; JAMES, J.; KALIA, S.; JOSHI, S. Strategies for successful acclimatization and hardening of in vitro regenerated plants: challenges and innovations in micropropagation techniques. **Plant Science Today**, 2024. DOI: 10.14719/pst.2376.

SHARMA, V.; MAGOTRA, T.; CHOURASIA, A.; MITTAL, D.; SINGH, U. P.; SHARMA, S.; SHARMA, S.; GARCÍA RAMÍREZ, Y.; DOBRÁNSZKI, J.; MARTÍNEZ-MONTERO, M. E. Thin cell layer tissue culture technology with emphasis on tree species. **Forests**, v. 14, n. 6, p. 1212, 2023. DOI: 10.3390/f14061212.

SIANIPAR, N. F.; ASSIDQI, K.; SO, I. G.; MAULIDHA, A. R.; ASIKIN, Y. Somaclonal variations induced by benzylaminopurine to enhance the fruit morphology of horn

banana. **SABRAO Journal of Breeding and Genetics**, v. 56, n. 5, p. 2045-2055, 2024. DOI: <https://doi.org/10.54910/sabrao2024.56.5.27>

SILVA, C. P. da; PISTORI, M. F.; BLINI, R. C. B.; SANTANA, A. P. L. de. Reguladores vegetais no crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas in vitro. In: ZUFFO, A. M.; AGUILERA, J. G. (org.). **Agricultura 4.0**. Nova Xavantina, MT: Editora Pantanal, 2020. Cap. 3, p. 46-57. DOI: <https://doi.org/10.46420/9786599064159cap3>.

SILVA, J. A.; COSTA, M. R.; FREITAS, P. L. Sigatoka diseases in banana... **Tropical Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 23–35, 2024.

SILVA, R. L.; DUARTE, F. V.; SOUZA, C. F. F.; COSTA, M. A. P. C. Uso de marcadores ISSR na avaliação de estabilidade genética de plantas de abacaxi conservadas in vitro. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 3., 2014, Santos, SP. *Anais...* Santos: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2014. ISBN 978-85-66836-07-3.

SILVA, P. H.; NETO, I. L. C.; SANTOS, R. M. F.; MARTINS, F. M.; SOARES, J. M. S.; NASCIMENTO, F. S.; RAMOS, A. P. S.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, C. F.; LEDO, C. A. S. Histological and molecular characterization of the *Musa spp.* x *Pseudocercospora musae* pathosystem. **Agronomy**, Basel, v. 14, n. 10, p. 2328, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy14102328>.

SINGH, A. Take advantage of the Thin Cell Layer culture technique!. **Plant Cell Technology**, 2021. Disponível em: <https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/blog-take-advantage-of-the-thin-cell-layer-culture-technique>. Acesso em: 03 ago. 2025.

SINGH, R.; RAGHUWANSHI, R.; PANDEY, S. Somaclonal variation: a novel source for crop improvement. **3 Biotech**, v. 6, art. 154, 2016. DOI: 10.1007/s13205-016-0389-7.

SINGH, R. P.; CHAND, R.; KUMAR, K.; SINGH, D.; MISHRA, B. K.; ARYA, R.; TIWARI, N. Underutilized fruit crop multiplication through micro propagation technique: a review. **International Journal of Advanced Biochemistry Research**, v. 9, p. 839–842, 2025. DOI: 10.33545/26174693.2025.v9.i1Sk.3613.

SIREGAR, A. S.; MARIANI, T. S.; RACHMAWATI, F.; RIANAWATI, S.; WINARTO, B. In vitro mass propagation protocol for an ornamental banana: explant sterilization to plantlet acclimatization. **Ornamental Horticulture**, [s. l.], v. 31, art. E312919, p. 1-8, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v31.e312919>.

SLIWINSKA, E.; LOUREIRO, J.; LEITCH, I. J.; ŠMARDÁ, P.; BAINARD, J.; BUREŠ, P.; CHUMOVÁ, Z.; HOROVÁ, L.; KOUTECKÝ, P.; LUČANOVÁ, M.; TRÁVNÍČEK, P.; GALBRAITH, D. W. Application-based guidelines for best practices in plant flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 101, n. 9, p. 749–781, 2022. DOI: 10.1002/cyto.a.24499.

SORN, V.; CHHON, Y.; KUN, M. Effects of benzyl adenine and thidiazuron on shoot regeneration of Cavendish banana. **Current Applied Science and Technology**, v. 24, n. 5, e0259302, 2024. DOI: 10.55003/cast.2024.259302.

SOUZA, G. H. de O.; APARECIDO, L. E. de O.; LIMA, R. F. de; TORSONI, G. B.; CHIQUITTO, A. G.; MORAES, J. R. C. de. Agroclimatic zoning for bananas under climate change in Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 14, p. 6511-6529, 2022. DOI: 10.1002/jsfa.12018.

SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, R. L.; SILVA, J. A. Spatial distribution of banana production in Brazil... **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 44, n. 3, e-789, 2022.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

THANONKEO, S.; KITWETCHAROEN, H.; THANONKEO, P.; KLANRIT, P. Temporary Immersion Bioreactor (TIB) System for Large-Scale Micropropagation of Musa sp. Cv. Kluai Numwa Pakchong 50. **Horticulturae**, v. 10, n. 10, p. 1030, 2024. DOI: 10.3390/horticulturae10101030.

TUNCER, B. Use of thidiazuron in tissue culture studies in vegetables. *In*: BALKAN AGRICULTURE CONGRESS, 3., 2021, Edirne, Turkey. **Anais [...]**. Edirne: [s. n.], 2021. P. 583.

TUNG, H. T.; DO, H. D. K.; TRAN, D. H.; DAO, T. H.; TRAN, T. N. B.; TRAN, T. T. H.; NGUYEN, Q. H.; NGUYEN, T. C.; NHUT, D. T. P.; YEUNG, E. C. T. The application of thin cell layer culture technique in plant regeneration and micropropagation: latest achievements. *In*: NHUT, D. T. P.; TUNG, H. T.; YEUNG, E. C. T. (Ed.). **Plant tissue culture: new techniques and application in horticultural species of tropical region**. Singapore: Springer, 2022. P. 231–257. DOI: 10.1007/978-981-16-6498-4_12.

VAN, K. T. T. Thin cell layer concept. *In*: NHUT, D. T.; VAN LE, B.; TRAN THANH VAN, K.; THORPE, T. (Ed.). **Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications**. Dordrecht: Springer, 2003. P. 1–16. DOI: 10.1007/978-94-017-3522-3_1.

VAN, M. T. T. Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v. 115, n. 1, p. 87–92, 1973. DOI: 10.1007/bf00388609.

VASCONCELOS, A. G. V. de; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000500013>.

VASUDEVAN, V. et al. Meta-topolin enhanced in vitro regeneration... **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 48, n. 2, 2025.

WATTANAPAN, N.; NUALSRI, C.; MEESAWAT, U. In vitro propagation through transverse thin cell layer (tTCL) culture system of lady's slipper orchid:

Paphiopedilum callosum var. *sublaeve*. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 306–313, 2018. DOI: 10.14456/sjst-psu.2018.48.

WERBROUCK, S. P. O.; STRNAD, M.; VAN ONCKELEN, P.; DEBERGH, P. C. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? **Physiologia Plantarum**, v. 98, n. 2, p. 291–297, 1996.

WONGCHAYA, T. et al. Micropropagation of *Cannabis sativa* using nodal explants and plant growth regulators. **Industrial Crops and Products**, v. 210, p. 118123, 2024.

YANG, B.; LUO, Z.; ZHU, X.; JI, Y.; MA, Q.; YAN, F. Research Progress on the Application of Plant Growth Regulators in the Rapid Propagation of Jujube by In Vitro Culture. **Plants**, v. 14, p. 3012. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants14193012>

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA cv. BRS TERRA-ANÃ: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA EM CICLOS SUCESSIVOS DE SUBCULTIVO

RESUMO

A micropropagação é uma técnica essencial para a produção em larga escala de mudas de bananeira com qualidade fitossanitária e uniformidade genética. A cv. BRS Terra-Anã, um plátano de porte reduzido (2,83 m) desenvolvido pela Embrapa, apresenta resistência à Sigatoka-amarela e à murcha de *Fusarium*, sendo recomendada para cultivo no Mato Grosso e Vale do Ribeira (SP). O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes concentrações de benziladenina (BA) na multiplicação in vitro de ápices caulinares da cv. BRS Terra-Anã e monitorar a estabilidade genética ao longo de oito ciclos sucessivos de subcultivo. Ápices caulinares foram estabelecidos em meio MS suplementado com BA e subcultivados a cada 30 dias durante 240 dias. A taxa de multiplicação foi avaliada pelo número médio de brotos por explante. A estabilidade genética foi monitorada por citometria de fluxo para determinação do nível de ploidia e por análise morfométrica de estômatos (densidade, comprimento, largura e área estomática) nas faces adaxial e abaxial das folhas. Os resultados demonstraram que a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BA foi a mais eficiente, equilibrando alta produtividade de brotos e viabilidade econômica. A análise citométrica revelou que a maioria das plantas manteve o padrão triploide característico (3x), porém foi detectada mixoploidia em alguns indivíduos submetidos a ciclos prolongados de subcultivo, indicando que a exposição prolongada a BA pode induzir instabilidade mitótica. Plantas mixoploides apresentaram redução de aproximadamente 15% na densidade estomática na face abaxial e aumento nas dimensões das células-guarda, confirmando a relação entre nível de ploidia e características estomáticas. Recomenda-se a realização de 3 a 4 subculturas para otimizar a produtividade sem comprometer a estabilidade genética. O protocolo proposto fornece uma base confiável para laboratórios produtores de mudas, possibilitando multiplicação eficiente e economicamente viável da cv. BRS Terra-Anã em larga escala.

Palavras-chave: Ápices caulinares; *Musa spp.*; Benziladenina; Variação somaclonal; Citometria de fluxo; Estômatos.

ABSTRACT

Micropropagation is an essential technique for large-scale production of banana plantlets with phytosanitary quality and genetic uniformity. The cultivar BRS Terra-Anã, a short-stature plantain (2.83 m) developed by Embrapa, exhibits resistance to Yellow Sigatoka and *Fusarium* wilt and is recommended for cultivation in Mato Grosso and Vale do Ribeira (SP), Brazil. This study aimed to evaluate the efficiency of different benzyladenine (BA) concentrations on in vitro multiplication of shoot tips of cv. BRS Terra-Anã and to monitor genetic stability over eight successive subculture cycles. Shoot tips were established on MS medium supplemented with BA and subcultured every 30 days for 240 days. Multiplication rate was assessed by the average number of shoots per explant. Genetic stability was monitored by flow cytometry for ploidy level determination and by stomatal morphometric analysis (density, length, width, and stomatal area) on adaxial and abaxial leaf surfaces. Results demonstrated that 1.0 mg L⁻¹ BA was the most efficient concentration, balancing high shoot productivity and economic viability. Cytometric analysis revealed that most plants maintained the characteristic triploid pattern (3x); however, mixoploidy was detected in some individuals subjected to prolonged subculture cycles, indicating that prolonged BA exposure may induce mitotic instability. Mixoploid plants showed approximately 15% reduction in stomatal density on the abaxial surface and increased guard cell dimensions, confirming the relationship between ploidy level and stomatal characteristics. It is recommended to perform 3 to 4 subcultures to optimize productivity without compromising genetic stability. The proposed protocol provides a reliable basis for plantlet production laboratories, enabling efficient and economically viable large-scale multiplication of cv. BRS Terra-Anã.

Keywords: Shoot tips; *Musa spp.*; Benzyladenine; Somaclonal variation; Flow cytometry; Stomata.

1. INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa spp.*) apresenta elevada importância socioeconômica e alimentar, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a produção atingiu aproximadamente 7,04 milhões de toneladas em 2024, com valor estimado em R\$ 16,06 bilhões, evidenciando a relevância da cultura para a economia agrícola nacional (IBGE, 2024). Nesse cenário, a cultivar BRS Terra-Anã, lançada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) em 2022, representa um avanço estratégico para o segmento de plátanos (*Musa AAB*), destacando-se pelo porte reduzido, maior facilidade de manejo e resistência à Sigatoka-amarela e à murcha de *Fusarium* raça 1 (Embrapa, 2022).

A consolidação comercial dessa cultivar depende da disponibilidade de mudas com elevada qualidade fitossanitária e fidelidade genética. A propagação convencional via rizomas apresenta limitações quanto à taxa de multiplicação e ao risco de disseminação de patógenos sistêmicos. Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais constitui importante ferramenta biotecnológica, sendo a micropropagação a técnica mais empregada para produção clonal em larga escala de *Musa spp.* (Erol et al., 2023).

Entretanto, a eficiência e a segurança do processo de micropropagação estão diretamente associadas ao manejo de reguladores de crescimento. A benziladenina (BA), citocinina amplamente utilizada na fase de multiplicação, promove a quebra da dominância apical e estimula a proliferação de gemas axilares. Apesar de sua eficácia na indução de brotações múltiplas, concentrações elevadas e sucessivos ciclos de subcultivo podem aumentar a frequência de variações somaclonais, comprometendo a uniformidade genética das plantas regeneradas (Shirani Bidabadi et al., 2010; Venkatachalam et al., 2007).

A variação somaclonal pode manifestar-se por alterações no conteúdo de DNA nuclear, incluindo eventos de aneuploidia e poliploidia, com potenciais impactos no desempenho agrônomo e na estabilidade fenotípica das mudas (Mohan Jain; Swennen, 2004). Dessa forma, o monitoramento da estabilidade genética por meio de citometria de fluxo tem sido amplamente empregado como ferramenta rápida e confiável para avaliação de fidelidade clonal em plantas

micropropagadas (Erol et al., 2023). Adicionalmente, parâmetros morfométricos estomáticos podem atuar como indicadores complementares de alterações ploídias.

Embora existam protocolos consolidados para micropropagação de *Musa spp.*, ainda são escassas informações específicas sobre a resposta morfogênica e a estabilidade genética da cv. BRS Terra-Anã sob diferentes concentrações de BA ao longo de múltiplos ciclos de subcultivo. A ausência desses dados limita a definição de estratégias que conciliem alta taxa de multiplicação e manutenção da integridade genômica.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivos: (i) avaliar a eficiência de diferentes concentrações de BA na multiplicação in vitro da cv. BRS Terra-Anã; (ii) determinar a taxa de multiplicação ao longo de oito ciclos consecutivos de subcultivo; (iii) monitorar a estabilidade genética por citometria de fluxo; e (iv) correlacionar alterações no conteúdo de DNA nuclear com parâmetros morfométricos estomáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram utilizados como material vegetal explantes de bananeira da cv. BRS Terra-Anã (*Musa spp.*, genoma AAB), obtidos a partir de plantas-matrizes mantidas em coleção de germoplasma da EMPAER – Tangará da Serra – MT. As plantas-matrizes foram previamente identificadas e caracterizadas quanto à sanidade fitossanitária e à conformidade morfológica com o padrão da cultivar.

Para o estabelecimento in vitro, foram coletados rizomas de plantas adultas saudáveis, dos quais foram extraídos os ápices caulinares (tipo chifrinho) com aproximadamente 15 a 30 cm de comprimento, após remoção das bainhas foliares externas. Alternativamente, foram utilizados explantes provenientes de plantas já estabelecidas in vitro, mantidas em meio de multiplicação.

2.2. Desinfestação e estabelecimento in vitro

Os rizomas contendo os ápices caulinares foram inicialmente lavados em água corrente para remoção de resíduos de solo e matéria orgânica. Posteriormente, foram submetidos à desinfestação superficial em câmara de fluxo laminar. O procedimento consistiu na imersão do material em solução de detergente

neutro a 2% (v/v) por 10 minutos, sob agitação, seguida de três enxágues em água destilada estéril. Em seguida, os explantes foram imersos em solução de hipoclorito de cálcio $[Ca (ClO)_2]$ a 60% por 20 minutos, sendo posteriormente enxaguados novamente três vezes em água destilada estéril. Na sequência, realizou-se imersão em solução de álcool etílico a 70% (v/v) por 5 minutos, finalizando o processo com três enxágues em água destilada estéril.

Após a desinfestação, os ápices caulinares foram isolados com auxílio de bisturi e pinça estéreis, reduzidos a aproximadamente 4 cm de altura e inoculados individualmente em frascos de vidro de 250 mL contendo 80 mL de meio de cultura.



Figura 1. Etapas do preparo dos ápices de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã. (A) Brotações do tipo chifrinho. Bar.10 cm. (B) Redução do ápice pós lavagem. (C) Ápices reduzidos no processo de desinfestação. Bar. 5 cm. (D) Ápice reduzido inoculado em MS. Bar. 4 cm.

O meio de cultura contendo os sais básicos de MS (Calsson Labs, Smithfield, UT, USA) (Murashige; Skoog, 1962) e vitaminas de White (1943), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de Inositol (Acumedia®; Neogen, Lansing, MI, USA) e solidificado com 2,8 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma Aldrich®). O meio de cultura foi suplementado com regulador de crescimento vegetal, benziladenina (Sigma Aldrich®) nas concentrações 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. O meio foi esterilizado a 121 °C (1 atm) por 15 minutos, onde os explantes foram cultivados posteriormente.

As culturas foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e 36 μmol m⁻²s⁻¹ de irradiância (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Barueri, Brasil), e 25 ± 2 °C.

2.3. Multiplicação in vitro utilizando ciclos de subcultivos

Após o estabelecimento in vitro (aproximadamente 30 dias de cultivo), os explantes que apresentaram brotações foram subcultivados para meio de multiplicação. Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias, por um período total de oito subcultivos (240 dias), para avaliação da taxa de multiplicação e da estabilidade da resposta morfogênética ao longo do tempo.

No primeiro cultivo, os ápices foram inoculados inteiros, sem seccionamento. A partir do segundo, terceiro e quarto subcultivos, os explantes foram seccionados longitudinalmente em quatro partes, visando intensificar a taxa de multiplicação.

A variável analisada foi o número médio de brotos por explante, utilizado como indicador da eficiência de multiplicação in vitro ao longo dos subcultivos.

Em cada subcultivo, as brotações foram individualizadas e transferidas para novos frascos de vidro (250 mL) contendo 80 mL de meio de cultura de multiplicação.

2.4. Avaliação da estabilidade genética em cada ciclo de multiplicação

A cada ciclo de multiplicação as brotações de aproximadamente 10 cm de comprimento foram isoladas e inoculadas em meio de cultura na ausência de BA para o desenvolvimento completo. Foram coletadas três folhas expandidas de cv. BRS Terra-Anã de cada tratamento por ciclo, isoladas para avaliar a estabilidade genética via estimativa do conteúdo de DNA nuclear.

Suspensões de núcleos foram preparadas por meio de *chopping* de folhas jovens com uma lâmina de aço descartável (Galbraith et al., 1983) em tampão de isolamento WPB (Loureiro et al., 2007). A suspensão gerada foi aspirada por meio de duas camadas de gaze, com uma pipeta de plástico e filtrada em membrana de Nylon CellTrics® com malha de 30 µm para a remoção de fragmentos de células e de tecidos, sendo em seguida adicionado 25 µL (1mg mL⁻¹) de iodeto de propídio e 5 µL (1mg mL⁻¹) de Rnase para corar o DNA.

Após 30 minutos em ambiente protegido da incidência de luz as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Sendo realizadas três repetições e, pelo menos, 10.000 núcleos analisados para a quantificação da emissão da fluorescência com o uso do citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Como padrão interno, foi utilizada a espécie *Pisum sativum* com conteúdo de DNA 2C =

9.09pg (Dolezel et al., 1998). Os histogramas foram gerados e analisados pelo programa CytExpert 2.0.1 e o conteúdo de DNA (pg) calculado de acordo Dolezel e Bartos (2005) e Dolezel et al. (2007).

Conteúdo 2C de DNA (em pg):

Média do pico G1 de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã x 9,09

Média do pico G1 de *Pisum sativum*

2.5. Análise Citogenética

O número cromossômico das plantas regeneradas da cv. BRS Terra-Anã foi avaliado por meio da análise do conteúdo de DNA, permitindo a identificação de plantas com ploidia correspondente à cv. BRS Terra-Anã.

As pontas de raízes com aproximadamente 1 a 2 cm de comprimento foram coletadas das plantas mixoploide confirmadas dos ciclos 4, 5, 6 e triploide (controle) no período da manhã. Em seguida, as amostras foram pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinolina a 0,003M (HQ) por 7 horas à 4°C.

Após o pré-tratamento, o material foi fixado em solução Metanol (álcool metílico: ácido acético, 3:1 v/v) por 24 horas e armazenado sob refrigeração até o preparo das lâminas. As raízes foram posteriormente lavadas em água destilada por 15 minutos e submetidas à hidrólise em HCl 1M a 60 °C por 20 minutos.

Em seguida, os ápices meristemáticos esmagados entre lâmina e lamínula para dispersão das células, realizada a técnica *freeze-crack* em nitrogênio líquido (-196°C) (Conger; Fairchild, 1953), e secas ao ar. As lâminas foram coradas em Giemsa 5% por 10 minutos, e posteriormente submetida a observação em microscópio ótico.

A contagem cromossômica foi realizada em células individualizadas, preferencialmente em metáfase. O número cromossômico foi determinado com base na contagem direta dos cromossomos visíveis, e as imagens representativas foram selecionadas para documentação e confecção das pranchas.

2.6. Aclimatização de plantas

Plantas com raiz e parte aérea expandidas, com aproximadamente 10 cm de altura, foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para a remoção do

meio de cultura. Em seguida, foram submersas em água e mantidas por um período de 24 horas, posteriormente foram plantadas em copos plásticos (11 cm x 8 cm) com orifícios contendo substrato Carolina Soil® (Figura 2).

Após 5 dias mantidas em condições climatizada (25 ± 2 °C), as plantas foram cultivadas em casa de vegetação, onde permaneceram sob cultivo e monitoramento contínuo (Figura 2).

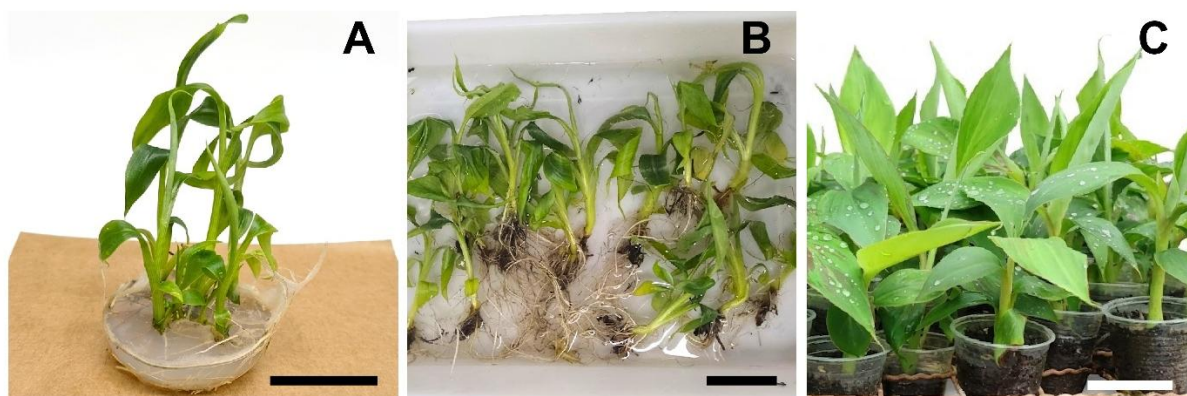


Figura 2. Etapas da aclimatização. (A) Brotações da cv. BRS Terra-Anã retiradas do frasco para seleção padronizada; (B) Plantas submergidas em água em bandeja; (C) Plantas em substrato sob condições de casa de vegetação. Bar. 6 cm.

As plantas variantes e exemplares de indivíduos controles foram mantidas em cultivo, com o objetivo de acompanhamento do desenvolvimento vegetativo e avaliação da estabilidade morfofisiológica durante a fase de crescimento *ex vitro*.

À medida que alguns indivíduos atingiram aproximadamente 20 cm de altura, apresentando porte adequado e bom vigor vegetativo, estes foram destinados a agricultores familiares, como forma de extensão e transferência de tecnologia, mantendo-se parte do material sob cultivo para continuidade das avaliações experimentais.

2.7. Caracterização estomática

As folhas analisadas foram coletadas de plantas previamente aclimatizadas em casa de vegetação, sob sistema de irrigação controlado. Foram amostrados indivíduos triploides ($2n = 3x$) e mixoploides ($2n = 3x/6x$), previamente confirmados quanto ao nível de ploidia.

O decalque epidérmico foi obtido nas regiões mediana das faces adaxial e abaxial da lâmina foliar. Para a confecção das impressões, utilizou-se adesivo instantâneo à base de cianoacrilato (Super Bonder®). Uma gota do adesivo foi

depositada sobre lâmina de vidro, sendo imediatamente pressionada contra a superfície foliar selecionada por aproximadamente 1 minuto. Após a remoção completa da folha, o material permaneceu em secagem ao ar por 5 minutos, antes da observação em microscópio óptico.

Para a determinação da densidade estomática, foram analisadas três folhas por nível de ploidia, selecionando-se cinco campos de visualização por face foliar nas regiões mediana e central da lâmina, totalizando 15 observações por ploidia. As contagens foram realizadas em microscópio óptico com objetiva de 10x.

A mensuração do comprimento e da largura dos estômatos e das células guardas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de 40x. Foram avaliadas três folhas por ploidia, com cinco medições por folha, totalizando 15 medições por nível de ploidia. As análises biométricas foram conduzidas com auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

2.8. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), constituído por quatro tratamentos, correspondentes às concentrações de BA (1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e ao tratamento controle (ausência de BA). Cada tratamento foi composto por 13 repetições, sendo cada repetição representada por um frasco contendo quatro explantes, totalizando 52 unidades experimentais e 208 explantes.

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao modelo linear misto generalizado (GLMM) e Zero-Inflated Negative Binomial (ZINB) adequados para dados de contagem com alta superdispersão e excesso de zeros. O modelo ZINB permitiu distinguir zeros estruturais de zeros amostrais, fornecendo estimativas mais robustas, considerando os efeitos fixos dos tratamentos e do tempo, e o efeito aleatório das repetições. Quando constatada significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As análises foram realizadas no software Rstudio® (Posit Software, PBC, 2024).

3.0 RESULTADOS

3.1. Ciclos consecutivos de regeneração in vitro de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã a partir de ápices caulinares são geneticamente estáveis

3.1.1. Resposta morfogênica e estabelecimento dos explantes

Ápices caulinares da cv. BRS Terra-Anã cultivados na presença de diferentes concentrações de benziladenina (BA) demonstraram variações significativas na produção de brotações ao longo de oito ciclos consecutivos de regeneração. Primeiramente, observou-se o intumescimento da região basal dos ápices com proliferação celular evidente, e após 11 dias de cultivo, pequenas brotações tornaram-se visíveis (Figura 3).

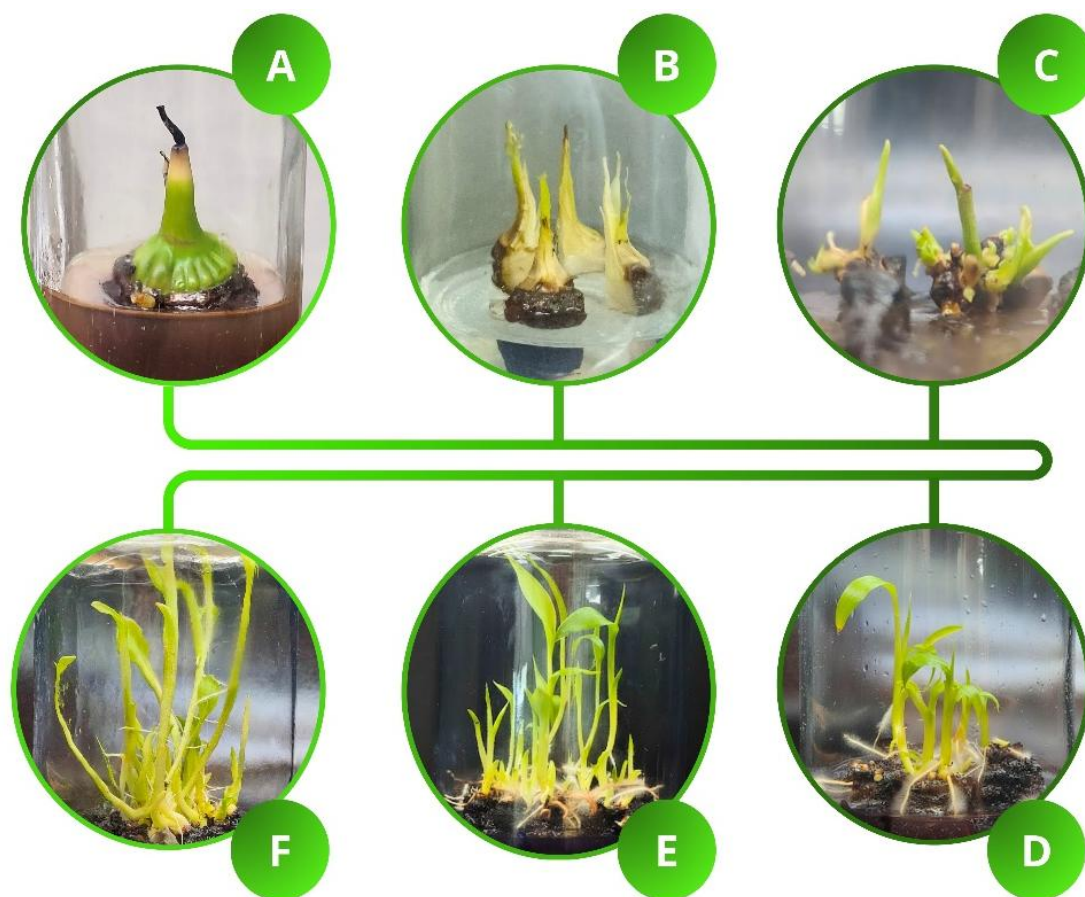


Figura 3. Sequência de multiplicação in vitro de explantes de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã cultivados em meio MS suplementado com BA. (A–F) Estágios sucessivos do desenvolvimento: (A) ápice caulinar estabelecido em meio de cultura MS; (B) início da emissão de brotações; (C) formação de múltiplos brotos adventícios; (D) alongamento dos brotos e emissão dos primeiros primórdios foliares; (E) brotos alongados em diferentes estágios de desenvolvimento; (F) plântulas com sistema foliar e radicular completos.

3.1.2. Efeito das concentrações de BA na taxa de multiplicação

A análise comparativa das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) revelou que a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BA foi a mais eficaz, produzindo uma média de 1,20 brotos por explante ao longo dos oito ciclos. Este resultado foi estatisticamente superior a todos os outros tratamentos testados (Figura 4). A concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ também apresentou desempenho satisfatório, com média de 1,02 brotos por explante, sendo significativamente superior ao grupo controle (0,37 brotos por explante) e ao tratamento com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (0,38 brotos por explante), que não diferiram estatisticamente entre si.

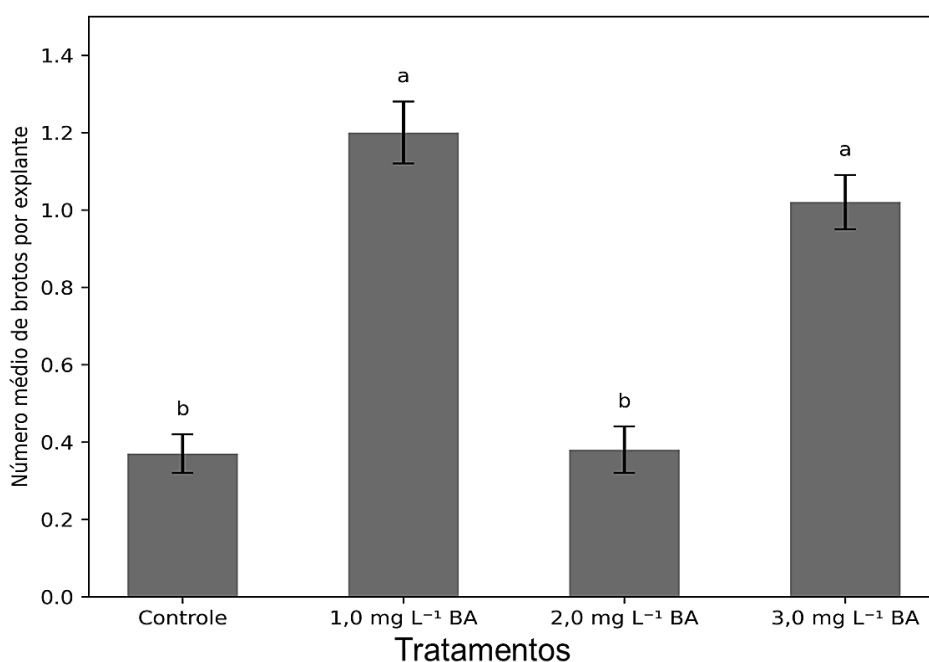


Figura 4. Número médio de brotos por explante de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã em diferentes concentrações de BA no decorrer de oito ciclos consecutivos de multiplicação in vitro. As barras de erro indicam o erro padrão. As letras referem-se a diferenças estatísticas entre os tratamentos por ciclo de acordo com o teste de Tukey, a 5%.

3.1.3. Dinâmica temporal da produção de brotos ao longo dos ciclos

No primeiro ciclo de cultivo, no qual os explantes provenientes de ápices caulinares não foram seccionados, então não foi observada a formação de brotações. A partir do segundo ciclo de multiplicação, iniciou-se a proliferação de brotos em todos os tratamentos, evidenciando que o seccionamento dos explantes é um fator crítico para a indução da organogênese adventícia em *Musa spp.* (Figura 5).

No ciclo 2, os tratamentos contendo 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BA produziram 140, 78 e 106 brotos, respectivamente, enquanto o tratamento controle apresentou 68 brotos. Nos ciclos 3 e 4, observou-se aumento significativo no número de brotações em todos os tratamentos, com pico de produção no ciclo 4. Destacaram-se as concentrações de 1,0 e 3,0 mg L⁻¹, que apresentaram 150 e 126 brotos no ciclo 3; e 186 e 194 brotos no ciclo 4, respectivamente. O tratamento controle apresentou resposta intermediária no ciclo 4, com 106 brotos, enquanto a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BA resultou em menor produção de brotações, com 82 brotos (Figura 5).

A partir do quinto ciclo de cultivo, observou-se redução acentuada no número de brotações em todos os tratamentos (Figura 5). A redução foi mais evidente no tratamento contendo 2,0 mg L⁻¹ de BA, que apresentou apenas 13 brotos no ciclo 5 e ausência total de brotações nos ciclos subsequentes.

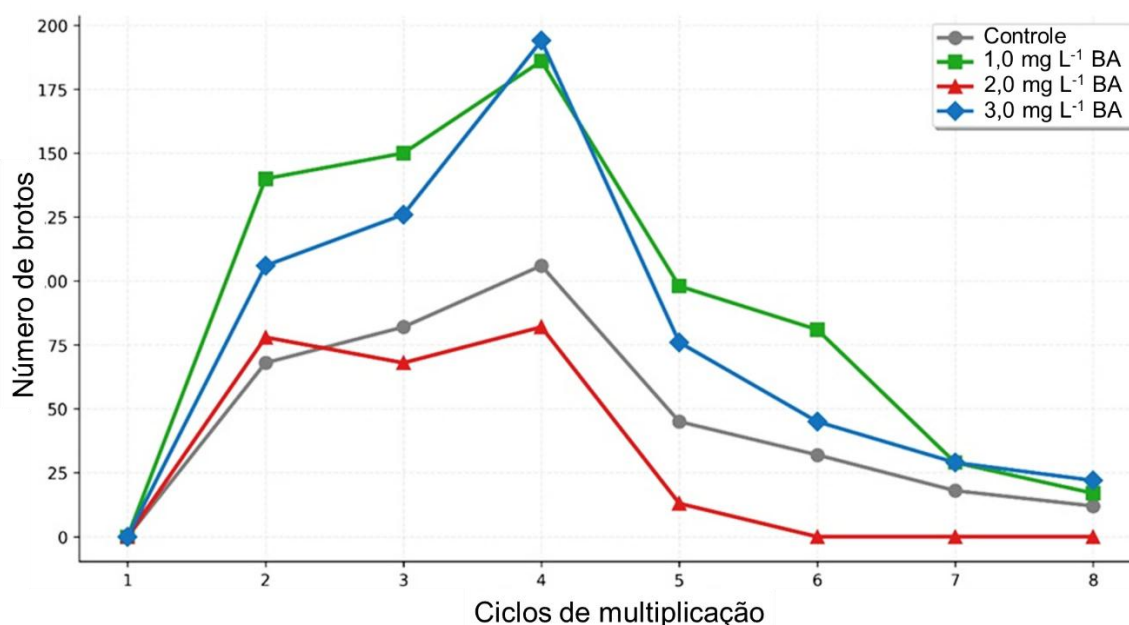


Figura 5. Evolução da produção de brotos ao longo de oito ciclos consecutivos de multiplicação in vitro de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã em diferentes concentrações de BA. Os dados representam o número total de brotos produzidos em cada ciclo para cada tratamento.

Em contraste, as concentrações de 1,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BA mantiveram a produção de brotos até o ciclo 8, embora com redução progressiva da produção relativa após o pico observado no quarto ciclo. Nos ciclos subsequentes, verificou-se declínio gradual da capacidade regenerativa, resultando em produção residual de brotos nos ciclos finais de multiplicação (Figura 6).

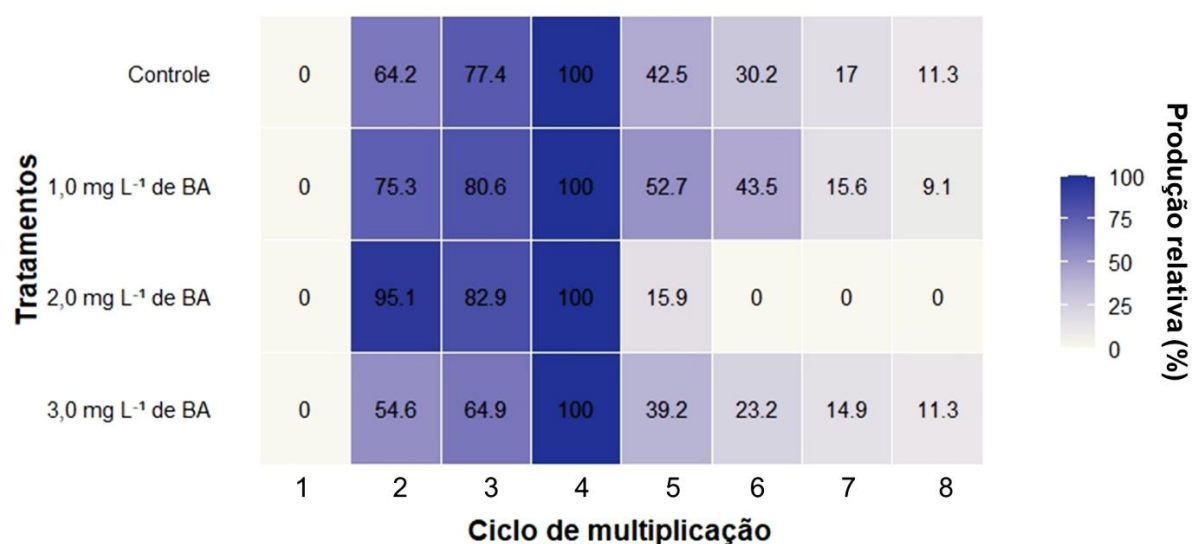


Figura 6. Mapa de calor da produção relativa de brotos (%) por ciclo e tratamento em *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã. Os valores foram normalizados em relação ao valor máximo observado em cada tratamento, permitindo evidenciar a dinâmica da capacidade regenerativa ao longo dos subcultivos.

3.1.4. Produção acumulada e eficiência multiplicativa

A quantificação da produção acumulada ao longo dos oito ciclos confirma o padrão observado na análise temporal (Figura 7). O tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de BA apresentou a maior produção total, atingindo 666 brotos, seguido por 3,0 mg L⁻¹ de BA com 598 brotos. O tratamento controle produziu 363 brotos, enquanto 2,0 mg L⁻¹ de BA resultou em apenas 241 brotos ao longo de todo o período experimental.

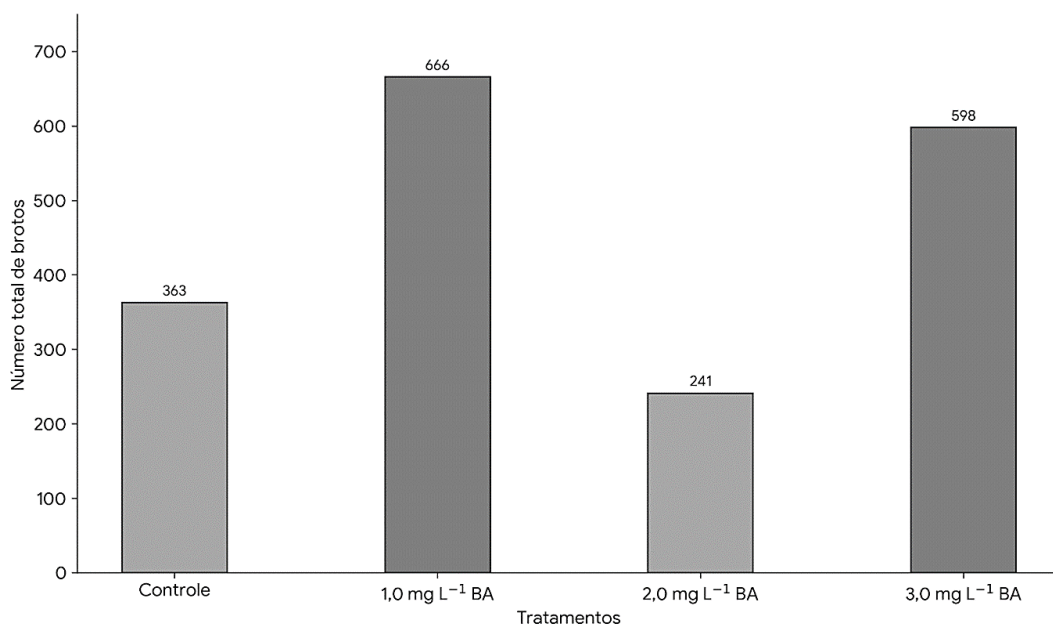


Figura 7. Produção acumulada de brotos ao longo de oito ciclos de multiplicação in vitro de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã em diferentes concentrações de BA. Os

valores representam o número total de brotos produzidos em cada tratamento durante todo o período experimental.

3.1.5. Implicações para o manejo de subcultivos e risco de variação somaclonal

O declínio acentuado na capacidade regenerativa observado a partir do quinto ciclo levanta questões importantes sobre o número ideal de subcultivos consecutivos em protocolos de micropropagação comercial.

No presente estudo, a manutenção de capacidade regenerativa até o oitavo ciclo nos tratamentos com 1,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BA, embora com produtividade decrescente, sugere que a cv. BRS Terra-Anã apresenta relativa estabilidade genética sob estas condições. No entanto, considerando o pico de produção no ciclo 4 e o declínio subsequente, recomenda-se que protocolos comerciais limitem o número de subcultivos consecutivos a 3 – 4 ciclos, estabelecendo periodicamente novas culturas a partir de ápices caulinares de plantas-matrizes certificadas.

3.2. Ciclos sucessivos de regeneração in vitro de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã apresentam reduzida instabilidade genética

A estabilidade genômica das plantas de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã regeneradas subsequentes a oito ciclos de multiplicação in vitro apresentaram reduzida instabilidade genética demonstrada na avaliação da estimativa de DNA nuclear via citometria de fluxo.

Os histogramas de fluorescência obtidos revelaram, na maioria das amostras, um pico unimodal de intensidade fluorescente, proporcional com o perfil citométrico esperado para plantas de cv. BRS Terra-Anã triploide ($2n = 3x = 33$ cromossomos). Essa observação confirma a preservação da estabilidade genética ao longo dos ciclos sucessivos de proliferação in vitro, sem evidências de aneuploidia ou poliploidia significativa (Figura 8). Entre as 72 plantas avaliadas, quatro (5,56%) apresentaram variações no padrão de ploidia, sendo classificadas como variantes somaclonais.

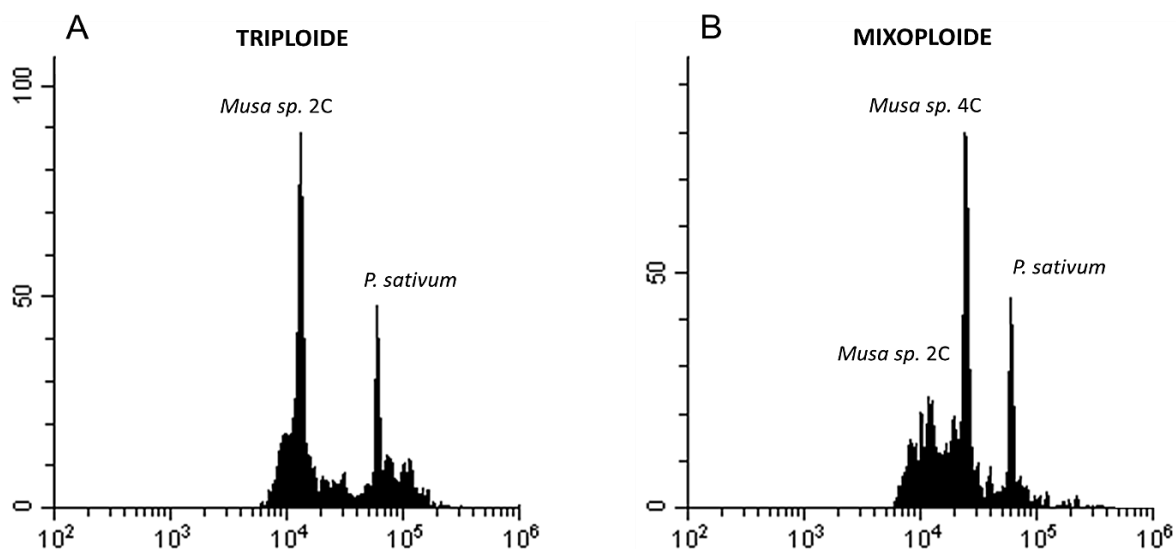


Figura 8. Histogramas de citometria de fluxo comparando plantas triploide e mixoploide de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã. (A) Planta triploide (3x) com pico único em 2C; (B) Planta mixoploide (3x/6x) apresentando dois picos distintos, correspondentes às populações celulares triploide (2C) e hexaploide (4C). O padrão de referência *Pisum sativum* é indicado em ambos os histogramas.

Entretanto, em um subconjunto de amostras, foram detectados dois picos distintos de fluorescência, indicativos de mixoploidia, caracterizada pela coexistência de populações celulares triploides e hexaploides (Figura 8 B). Essa alteração na estimativa do DNA nuclear cromossômica foi mais prevalente em tratamentos submetidos a concentrações de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA, enquanto o controle e demais concentrações exibiram predominantemente o padrão triploide.

O conteúdo relativo de DNA nas amostras triploides variou entre 12,6 e 15,4 pg com coeficiente de variação 3,67%, alinhando-se aos valores do genótipo padrão. Em contraste, as amostras mixoploides apresentaram faixas de 26,8 a 29,5 pg e 6,86% coeficiente de variação, refletindo a proporção de células hexaploides ($2n=6x=66$ cromossomos) (Figura 9).

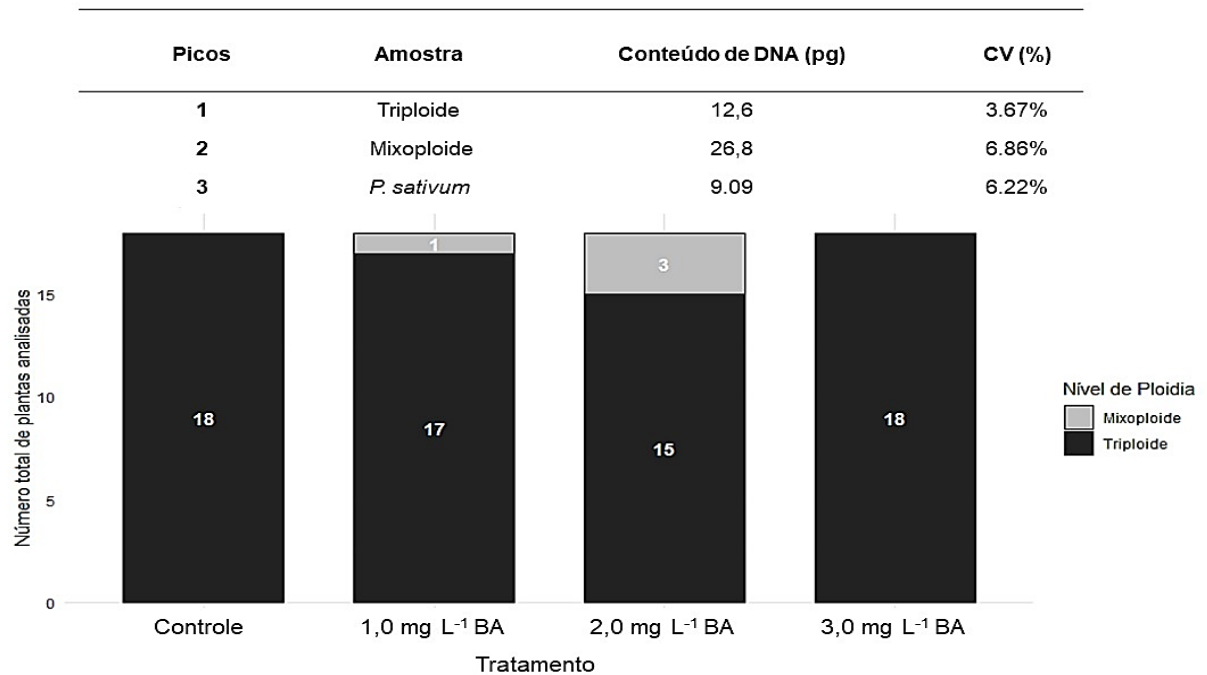


Figura 9. Nível de ploidia por meio de análise de DNA nuclear em amostras de *Musa* spp. cv. BRS Terra-Anã. Total de plantas analisadas pela citometria de fluxo.

Plantas triploides ($2n=3x$) apresentaram 33 cromossomos (Figura 10 A) e plantas mixoploides com células ($2n=3x$ ou $6x$) com 40 cromossomos (Figura 10 B).

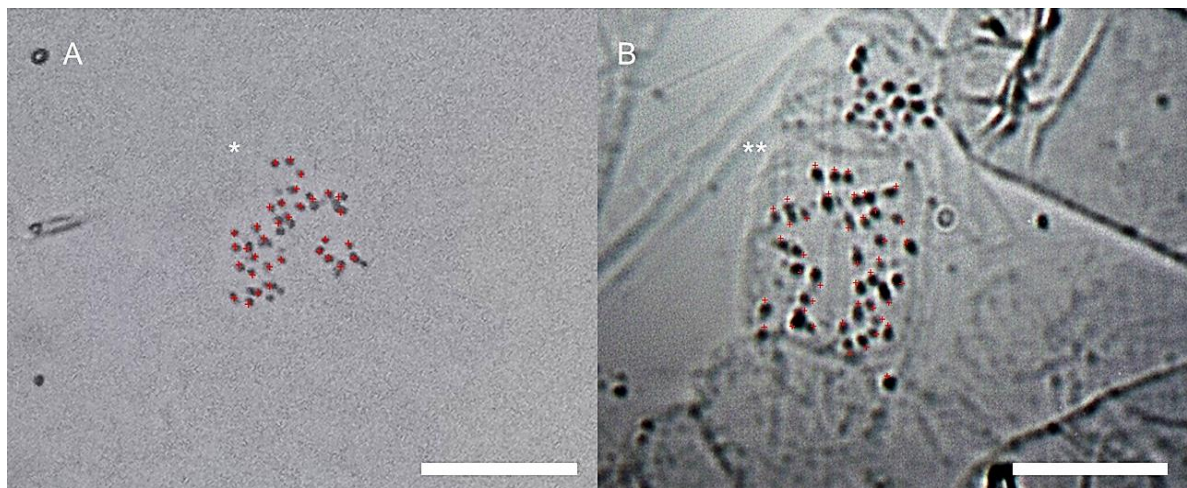


Figura 10. Arranjo cromossômico em metáfases de *Musa* spp. cv. BRS Terra-Anã. (A)* indivíduo triploide ($2n = 3x = 33$) e (B)** indivíduos mixoploides apresentando variação de ploidia entre $2n=3x= 33$ e $2n=6x= 66$. Bar. 40 μ m.

3.3 Aclimatização e Caracterizações estomáticas

Após a aclimatização em substrato a cada ciclo com nível de ploidia confirmado, em manutenção sob condições controladas de casa de vegetação, plantas da cv. BRS Terra-Anã, apresentaram crescimento uniforme, conforme esperado para plantas oriundas do sistema de micropropagação (Figura 11).

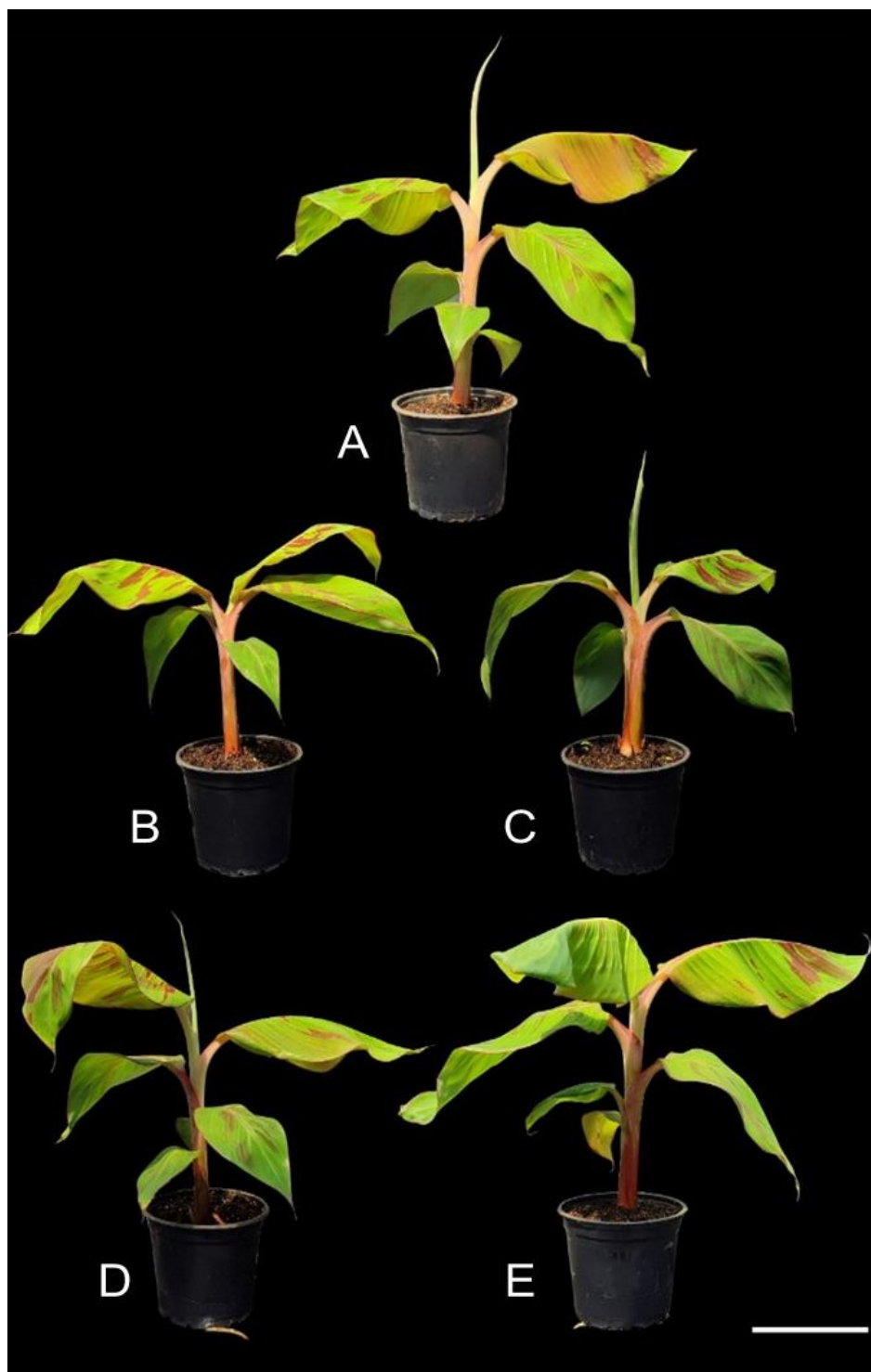


Figura 11. Plantas de *Musa* spp. cv. BRS Terra-Anã aclimatizadas, ilustrando indivíduos triploides e mixoploides oriundos de diferentes ciclos de regeneração in

vitro. (A) Planta triploide (controle); (B) mixoploide do ciclo 4; (C) mixoploide do ciclo 5; (D – E) mixoploides do ciclo 6, mantidas em casa de vegetação. Bar. 15 cm.

Apesar do desenvolvimento vegetativo homogêneo, diferenças na morfologia estomática foram observadas entre plantas triploides e mixoploides cultivadas ex vitro, especialmente quanto à densidade estomática e à largura dos estômatos, conforme evidenciado tanto pelas imagens (Fig. 12 A–B) quanto pelas análises quantitativas. A maior densidade estomática foi observada em plantas triploides na face abaxial, com média de 100,2 estômatos mm^2 , seguida por plantas mixoploides na face abaxial, com 85,4 estômatos mm^2 . Valores inferiores foram registrados na face adaxial, sendo 29,8 estômatos mm^2 em plantas triploides e 19,8 estômatos mm^2 em plantas mixoploides, com todas as comparações estatisticamente distintas (Fig. 12 C).

Quanto à morfometria estomática, a largura estomática diferiu significativamente entre as ploidias e faces foliares (Fig. 12 D), sendo maior em plantas mixoploides na face abaxial (54,2 μm) e menor em plantas triploides na face adaxial (46,9 μm), enquanto plantas mixoploides na face adaxial e triploides na face abaxial apresentaram valores intermediários (50 e 46 μm respectivamente).

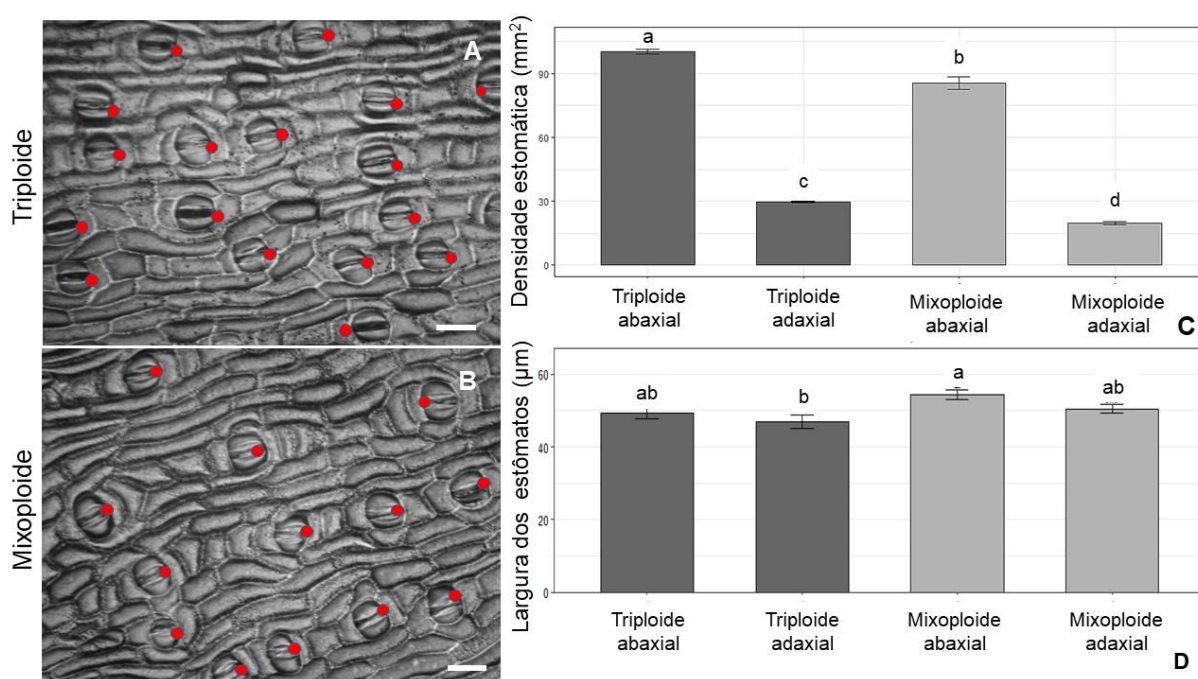


Figura 12. Caracterização dos estômatos das plantas triploides e mixoploides de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã, cultivadas em casa de vegetação. (A) Epiderme da folha triploide face abaxial. (B) Epiderme da folha mixoploide face abaxial. Bars. 40 μm . (C) Densidade estomática (mm^2). (D) Largura dos estômatos (μm). As barras

indicam o erro padrão, letras distintas dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey 5%.

Em contraste, o comprimento do estômato não apresentou diferenças significativas entre os grupos, variando de 46,1 a 49,0 μm .

Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre a área estomática, o comprimento dos estômatos ou as dimensões das células-guarda. A área estomática variou de 1884 a 2038 μm^2 , o comprimento dos estômatos de 46,1 a 49,0 μm , e as células-guarda apresentaram comprimento entre 38,5 e 40,0 μm e largura entre 17,8 e 19,8 μm .

As análises referentes à densidade, morfometria estomática entre plantas triploides e mixoploides da cv. BRS Terra-Anã limitaram-se à densidade estomática e à largura dos estômatos.

4. DISCUSSÃO

O corte do explante é um passo fundamental para o sistema de cultivo in vitro, possuindo a finalidade de quebrar a dominância do meristema apical do explante, processo diretamente refletido na fisiologia da planta, interrompe a dominância e atividade de auxinas presentes no ápice, permitindo que citocininas atuem diretamente na proliferação de gemas laterais e posteriormente brotos adventícios (Sosnowski; Truba; Vasileva, 2023; Suman, 2017).

As variações de concentrações de reguladores de crescimento apresentaram respostas significativas para o número de brotos produzidos, com destaque para a concentração de 1,0 mg L^{-1} de BA, que promoveu a maior taxa de multiplicação ao longo dos oito subcultivos. Em estudo realizado por Hasmayaputra, Asnawati e Arifin (2024), o meio de cultura suplementando com 1,5 mg L^{-1} BA obtiveram média de 12,0 brotos de *Musa spp.* Cavendish, ressaltando a não utilização de 1,0 mg L^{-1} BA dentre os tratamentos. Tirkey (2021) por sua vez utilizou a combinação de 1,0 mg L^{-1} BA com 50 mg L^{-1} de sulfato de adenina a qual resultou uma média de 5,5 brotos por explante de *Rauvolfia serpentina* (L). Contudo, observa-se que a concentração de 1,0 mg L^{-1} de BA apresenta elevada responsividade para a indução e multiplicação de brotos em diferentes cultivares de *Musa spp.* e em outras espécies, evidenciando seu expressivo potencial regenerativo. A taxa de multiplicação acumulada obtida nessa concentração (666

brotos a partir do número inicial de explantes) demonstra a viabilidade técnica e econômica do protocolo para fins de produção comercial de mudas. Considerando que cada broto regenerado pode ser utilizado como nova fonte de explantes em subcultivos sucessivos, a capacidade multiplicativa exponencial do sistema torna-se substancial, reforçando sua aplicabilidade em programas de micropropagação em larga escala.

A concentração de 3,0 mg L⁻¹ de BA não diferiu estatisticamente de 1,0 mg L⁻¹, demonstrado também em estudos de Naitchede et al. (2025) e Nugrahani et al. (2024). Contudo, sob o ponto de vista econômico e prático, a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BA mostra-se mais viável e recomendada para *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã, por proporcionar maior taxa de proliferação e regeneração de brotos com menor uso da citocinina. Esta maior resiliência sugere que estas concentrações proporcionam um balanço hormonal mais adequado para a manutenção da capacidade regenerativa ao longo de múltiplos subcultivos.

As diferenças observadas entre os estudos também refletem a influência do genótipo, pois as cultivares de *Musa spp.* exibem uma sensibilidade variável às citocininas. Além disso, fatores como a composição do meio de cultura, adição de reguladores de crescimento e a idade fisiológica dos explantes contribuem para essas variações experimentais (Šimoníková et al., 2022; Martanti et al., 2022).

A técnica de subcultivo sucessivo constitui uma etapa fundamental da micropropagação, pois permite a multiplicação seriada de brotos a partir de um explante inicial (Chukwu et al., 2025; Mendonça et al., 2020), mantendo o material vegetal metabolicamente ativo e apto a novos ciclos de cultivo (Jhurree-Dussoruth, 2022). O pico de produção observado no quarto ciclo pode estar associado ao estabelecimento de um equilíbrio fisiológico entre a competência proliferativa dos explantes e as condições físico-químicas do meio de cultura, favorecendo a máxima expressão do potencial morfogênico.

Entretanto, como observado, em condições de cultivo *in vitro*, especialmente sob exposição prolongada a elevadas concentrações de citocininas e sucessivos ciclos de subcultivo, esse estímulo hormonal pode intensificar artificialmente a divisão celular, favorecendo a ocorrência de falhas na coordenação entre replicação nuclear e citocinese (Yang et al. 2021). Como consequência, podem surgir alterações citogenéticas, como endorreduplicação induzindo a ocorrência de

variação somaclonal, epigenéticas e fisiológicas, afetando a estabilidade genética e, em alguns casos, a morfologia das plantas regeneradas (Oliveira et al., 2022; Krishna et al., 2016).

Embora frequentemente relacionada a anomalias morfológicas e redução de vigor, a variação somaclonal também constitui uma importante fonte de variabilidade genética, podendo ser explorada como ferramenta de melhoramento vegetal (Das et al., 2025). Quando controlada e devidamente caracterizada, essa instabilidade pode contribuir para a obtenção de cultivares com maior resistência a estresses bióticos e abióticos e melhor desempenho agrônomo (Deepthi, 2018; Nwauzoma; Jaja, 2013). Nesse contexto, a formação de indivíduos mixoploides a partir de plantas triploides, observada nos subcultivos suplementados com BA, indica a ocorrência de instabilidade citogenética induzida pelas condições *in vitro* como a submissão à múltiplos ciclos de subcultivo, à exposição prolongada a citocininas e ao estresse fisiológico acumulado como a oxidação (Sianipar et al., 2024; Ermini et al., 2021).

A citometria de fluxo constituiu etapa fundamental para a estimativa do conteúdo nuclear de DNA das plantas avaliadas, configurando-se como uma das metodologias mais rápidas, precisas e sensíveis para a detecção de variações no nível de ploidia e de possíveis alterações genômicas estruturais (Ho; Eng; Ling, 2024).

A quantificação de núcleos para a estimativa de DNA foi realizada com base na intensidade relativa de fluorescência dos núcleos corados, utilizando *Pisum sativum* como padrão interno de referência. A análise dos histogramas revelou que a maioria dos indivíduos apresentou pico principal compatível com o nível triploide esperado, com valores consistentes e bem definidos, indicando estabilidade citogenética. Entretanto, em determinadas amostras, observou-se a presença de dois picos distintos no histograma, correspondentes a níveis triploide e próximos à hexaploide no mesmo indivíduo, caracterizando a ocorrência de mixoploidia, evidenciando a coexistência de populações celulares com diferentes níveis de ploidia. Esses resultados demonstram a eficiência da citometria de fluxo como ferramenta para monitoramento da estabilidade genética.

Após a triagem preliminar por citometria de fluxo, os indivíduos variantes e controle foram submetidos à confirmação citogenética por meio da contagem direta de cromossomos em metáfase, utilizando meristemas radiculares. (Souza et al.,

2023; Guimarães et al., 2009). As análises confirmaram que a maioria das células apresentaram $2n = 3x = 33$ cromossomos, compatível com o padrão triploide esperado para o subgrupo Terra (AAB) (Dehury; Dehery; Das, 2021; Nwauzoma et al., 2002). Entretanto, em determinados indivíduos, observou-se a coexistência de células entre 33 e 66 cromossomos ($2n = 6x$), caracterizando mixoploidia.

A ocorrência de mixoploides sugere eventos de duplicação possivelmente associados a falhas na segregação cromossômica ou à ocorrência de endorreduplicação. A incidência dessas alterações foi observada predominantemente em indivíduos submetidos a ciclos de subcultivos sucessivos sob exposição à BA, indicando que o estímulo citocinínico prolongado pode atuar como fator indutor de instabilidade mitótica (Ferreira et al., 2023).

Embora a maioria das plantas mantiveram-se triploide característica, a detecção de mixoploidia evidencia que o protocolo de micropropagação da cv. BRS Terra-Anã, em ciclos de subcultivo sob exposições prolongadas de BA, pode desencadear alterações no nível de ploidia.

A ocorrência de estômatos nas faces adaxial e abaxial confirma o padrão anfiestomático, com predominância na face abaxial, conforme relatado para diferentes cultivares de bananeira (Moraes et al., 2023; Nyainleta; Pesik; Hiarij, 2022; Costa et al., 2009). Esse arranjo anatômico está associado à otimização das trocas gasosas e à redução da perda hídrica sob condições edafoclimáticas.

A comparação entre níveis de ploidia revelou que indivíduos mixoploides apresentaram redução consistente na densidade estomática, acompanhada por aumento nas dimensões das células-guarda. A diminuição aproximada de 15% na densidade estomática na face abaxial sugere que a alteração no conteúdo nuclear interfere diretamente na organização da epiderme foliar. Esse padrão está de acordo com a relação descrita entre ploidia e densidade estomática, na qual o aumento do DNA nuclear promove expansão celular, resultando em estômatos maiores e menos numerosos (Vandenhout et al., 1995).

De modo geral, os resultados indicam que a ploidia da cv. BRS Terra-Anã influenciam principalmente a densidade estomática, enquanto as características relacionadas à morfometria dos estômatos (comprimento, área e dimensões das células-guarda) permanecem relativamente estáveis entre os grupos avaliados.

Os resultados evidenciam que protocolos de micropropagação devem ser ajustados conforme o sistema experimental, sendo a escolha da citocinina, da concentração e do número de ciclos determinante para eficiência e qualidade das mudas. Para o uso de ápices caulinares, a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BA destacou-se por aliar alta eficiência multiplicativa e viabilidade econômica, uma vez que o aumento das concentrações não proporcionou maior produtividade, além de aumentar riscos fisiológicos como variação somaclonal. Além disso, a condução do protocolo entre três e cinco ciclos de subcultivo configura intervalo tecnicamente seguro para manter elevada produtividade sem ampliar significativamente o risco de variações somaclonais. Assim, o protocolo proposto integra eficiência técnica, racionalização de insumos e controle de estabilidade genética, apresentando potencial aplicabilidade comercial e contribuição direta para o fortalecimento sustentável da bananicultura.

5. CONCLUSÃO

Entre as concentrações de benziladenina (BA) avaliadas, 1,0 mg L⁻¹ destacou-se como a mais responsiva para a multiplicação *in vitro* da cv. BRS Terra-Anã, promovendo maior taxa de proliferação de brotos aliada à viabilidade técnica e econômica do protocolo. A taxa de multiplicação ao longo de oito ciclos consecutivos de subcultivo apresentou variações entre os ciclos, com pico produtivo observado entre o terceiro e o quarto subcultivo, indicando que a limitação a três ou quatro subculturas consecutivas pode otimizar a produtividade, ao mesmo tempo em que reduz a exposição prolongada ao regulador de crescimento e, conseqüentemente, o risco de alterações citogenéticas.

O monitoramento da estabilidade genética por meio da citometria de fluxo evidenciou a ocorrência de variações no nível de ploidia, incluindo eventos de mixoploidia, demonstrando que subcultivos sucessivos sob exposição contínua à BA podem estar associados à indução de alterações citogenéticas. Esses achados reforçam a necessidade de controle periódico da qualidade genética em programas de micropropagação comercial.

Adicionalmente, a correlação entre ploidia e parâmetros morfométricos estomáticos confirmou a associação clássica entre aumento do nível de ploidia e ampliação das dimensões estomáticas, especialmente da largura, acompanhada de

redução na densidade estomática. Tal relação demonstra que a análise anatômica foliar constitui ferramenta complementar eficiente para a triagem preliminar de variações citogenéticas detectadas por citometria de fluxo.

Dessa forma, no contexto das condições experimentais adotadas, propõe-se um protocolo de micropropagação eficiente para a cv. BRS Terra-Anã, com definição da concentração de BA mais responsiva e número recomendado de subculturas, aliado à implementação de monitoramento citogenético sistemático, a fim de assegurar a qualidade genética das mudas produzidas em larga escala.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHUKWU, S. C.; AWALA, S. K.; ANGOMBE, S.; VALOMBOLA, J. S.; NANHAPO, P. I.; MBERAMA, C.; RAFII, M. Y.; OLADOSU, Y.; THOMAS, B.; OKPORIE, E. O.; MUSA, I. Recent progress in tissue culture techniques and biotechnological innovations for banana production (*Musa spp.*): a review. **Discover Plants**, v. 2, art. 13, 2025. DOI: 10.1007/s44372-025-00099-2.

CONGER, A. D.; FAIRCHILD, L. M. A quick-freeze method for making smear slides permanent. **Stain Technology**, v. 28, n. 5, p. 281–283, 1953. DOI: 10.3109/10520295309105555.

COSTA, F. H. S.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta à aclimatização. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 386–392, 2009.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 742–748, 2009.

DAS, S.; DATTA, S.; KUNDU, M.; BHATTACHARJEE, P.; WANGCHU, L.; NINGOMBAM, L.; SINGH, S.; NANDITA, K.; TANI, M.; DAS, S.; SHIL, S. From induction to innovation: investigating somaclonal variation induced by tissue culture and its role in advancing fruit crop improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 161, art. 25, 2025. DOI: 10.1007/s11240-025-03044-z.

DEEPTHI, V. P. Somaclonal variation in micro propagated bananas. *Advances in Plants & Agriculture Research*, v. 8, n. 6, 2018.

DEHURY, S.; DEHERY, S. K.; DAS, A. B. Karyotype variation in eight cultivars of Indian dessert banana (*Musa acuminata* L.) of section Eumusa from Odisha, India. **Caryologia**, v. 74, n. 1, p. 23–31, 2021. DOI: 10.36253/caryologia-597.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99–110, 2005. DOI: 10.1093/aob/mci005.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, v. 82, suppl. A, p. 17–26, 1998.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233–2244, 2007.

EMBRAPA. Plátano BRS Terra-Anã. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/8469/platano-brs-terra-ana>. Acesso em: 3 jul. 2025.

EMBRAPA. BRS Terra-Anã: nova variedade de porte baixo, elevada produtividade e melhor qualidade de amido para o mercado de banana-da-terra. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2022. 4 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1148028>. Acesso em: 3 jul. 2025.

EMBRAPA. Plátano BRS Terra-Anã. Tecnologias. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/8469/platano-brs-terra-ana>. Acesso em: 6 jul. 2025.

ERMINI, J. L.; TENAGLIA, G. C.; PARISOD, C.; PRATTA, G. R. Banana somaclonal variation assessed by amplified fragment length polymorphism profiles at early cycles of in vitro culture. **AgriScientia**, v. 38, n. 2, p. 143–148, 2021. DOI: 10.31047/1668.298x.v38.n2.33260.

ERMINI, J. L.; SOUZA, E. H.; PIO, R.; SOUZA, F. V. D.; PASQUAL, M. Banana somaclonal variation assessed by amplified fragment length polymorphism profiles at early cycles of in vitro culture. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo**, v. 38, n. 2, p. 1–12, 2021. DOI: 10.48162/rev.39.021.

EROL, M. H.; CÖMERTPAY, G.; KARAKAYA, H. C.; KAYA, Z. Genetic stability of banana plant regenerated from floral axis organogenesis assessed by newly developed SSR markers. **Agrivita**, v. 41, n. 2, p. 234–245, 2023. DOI: 10.17503/agrivita.v41i2.3456.

EROL, M.H.; DÖNMEZ, D.; BIÇEN, B.; ŞİMŞEK, Ö.; KAÇAR, Y.A. Modern Approaches to In Vitro Clonal Banana Production: Next-Generation Tissue Culture Systems. **Horticulturae**, v.9, p.1154, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9101154>

FAO. **Banana Market Review 2024**. Rome: FAO, 2025. 9 p.

FERREIRA, M. S.; ROCHA, A. J.; NASCIMENTO, F. S.; OLIVEIRA, W. D. S.; SOARES, J. M. S.; REBOUÇAS, T. A.; MORAIS LINO, L. S.; HADDAD, F.; FERREIRA, C. F.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P. The role of somaclonal

variation in plant genetic improvement: a systematic review. **Agronomy**, v. 13, art. 730, 2023. DOI: 10.3390/agronomy13030730.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, p. 1049–1051, 1983.

GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. (ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. Ed. Dordrecht: Springer, 2008. P. 205–226.

GUIMARÃES, N. C. C.; TORGA, P. P.; RESENDE, E. C.; CHALFUN JÚNIOR, A.; PAIVA, E.; PAIVA, L. V. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras 'Prata Anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 448–454, 2009.

HASMAYAPUTRA, H.; ASNAWATI; ARIFIN, N. Effect of coconut water and BAP concentration on the induction of Cavendish banana shoots in vitro. **Brazilian Journal of Development**, v. 10, n. 12, e75841, 2024. DOI: 10.34117/bjdv10n12-044.

HO, W. S.; ENG, W. H.; LING, K. H. Optimizing flow cytometry analysis for determining ploidy level and genome size of colchicine-induced polyploids of *Neolamarckia cadamba*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 93–97, 2024. DOI: 10.7324/JABB.2024.157607.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola Municipal (PAM) 2024: banana**. Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/68nositol-agropecuaria/banana/br>. Acesso em: 6 jul. 2025.

JHURREE-DUSSORUTH, B. Low-cost in vitro options for banana mutation breeding. In: JANKOWICZ-CIESLAK, J.; INGELBRECHT, I. L. (ed.). Efficient screening techniques to identify mutants with TR4 resistance in banana. Berlin; **Heidelberg: Springer**, 2022. P. 151–176. DOI: 10.1007/978-3-662-64915-2_10.

KALLOW, S.; MERTENS, A.; JANSSENS, S. B.; VANDELOOK, F.; DICKIE, J.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Banana seed genetic resources for food security: status, constraints, and future priorities. **Food and Energy Security**, v. 11, n. 1, e345, 2022. DOI: 10.1002/fes3.345.

KHAN, A.; BASHIR, A.; ERUM, S.; KHATAK, J. Z. K.; MUHAMMAD, A. Effects of 6-benzylaminopurine and indole-3-acetic acid on growth and root development of banana explants in micropropagation. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 37, n. 1, p. 9–13, 2021. DOI: 10.17582/journal.sja/2021/37.1.9.13.

KHALID, N.; TAN, S. G. Micropropagation of banana (*Musa spp.*): a comprehensive review. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 4, p. 683–692, 2016.

KRISHNA, H.; ALIZADEH, M.; SINGH, D.; SINGH, U.; CHAUHAN, N.; EFTEKHARI, M.; SADH, R. K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 54, 2016. DOI: 10.1007/s13205-016-0389-7.

LACERDA, G. A.; SILVA, J. O. C.; ABREU, J. C.; ALVES, E.; PAIVA, L. V. Características morfoanatômicas da epiderme foliar de plantas variantes e não variantes somaclonais de bananeiras (*Musa* sp. Colla cv. Prata-anã) cultivadas in vitro. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 85–90, 2008.

LOBERANT, B.; ALTMAN, A. Micropropagation of plants. In: FLICKINGER, M. C. (ed.). **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 875–888, 2007. DOI: 10.1093/aob/mcm152.

MARAK, M. R.; DEVI, R. A. Clonal propagation in horticultural crops. **The Pharma Innovation Journal**, v. 10, p. 496–499, 2021.

MARCILIO, H. C.; SILVA, E. C.; TEIXEIRA, E. C.; RAMOS, M. J. M.; RODRIGUES, M.; ANDRADE, A. L. **Cultivo da bananeira BRS Terra Anã: sistema de produção para o estado de Mato Grosso**. Cuiabá: Empresa Mato-grossense de Pesquisa, Assistência e Extensão Rural (EMPAER-MT), 2022.

MARTANTI, D.; POERBA, Y. S.; WITJAKSONO; HERLINA; AHMAD, F. Male flower characteristics of induced tetraploid, mixoploid, and diploid banana *Musa acuminata* (AA) cv. 'Pisang Rejang'. **SABRAO Journal of Breeding and Genetics**, v. 54, n. 3, p. 617–626, 2022. DOI: 10.54910/sabao2022.54.3.14.

MEKONEN, G.; EGIGU, M. C.; MUTHSUWAMY, M. In vitro propagation of banana (*Musa paradisiaca* L.) plant using shoot tip explant. **Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology**, v. 9, n. 12, p. 2339–2346, 2021. DOI: 10.24925/turjaf.v9i12.2339-2346.2883.

MENDONÇA, E. G.; BATISTA, T. R.; STEIN, V. C.; BALIEIRO, F. P.; ABREU, J. R.; PIRES, M. F.; SOUZA, P. A.; PAIVA, L. V. In vitro serial subculture to improve rooting of *Eucalyptus urophylla*. **New Forests**, v. 51, p. 801–816, 2020. DOI: 10.1007/s11056-019-09761-6.

MOHAN JAIN, S.; SWENNEN, R. Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. In: MOHAN JAIN, S.; SWENNEN, R. (ed.). **Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Enfield: Science Publishers, 2004. P. 1–12.

MORAIS, A. L.; ALVARENGA, B. L.; AOYAMA, E. M.; ZUCOLOTO, M.; OLIVEIRA, V. S. Stomatal characterization in leaves of banana cultivars of the type Prata and Maçã. **Revista de Iniciação Científica**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2023. DOI: 10.36524/ric.v9i1.1658.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NAITCHEDE, L. H. S.; IHEARAHU, O. C.; SAHA, K.; IGWE, D. O.; RAY, S.; UDE, G. Influence of triploid *Musa spp.* Genome background and exogenous growth regulators on in vitro regeneration in plantains and bananas. **Plants**, v. 14, p. 2109, 2025. DOI: 10.3390/plants14142109.

NUGRAHANI, P.; PURNOBASUKI, H.; ANSORI, A. N. M.; ANUCHAI, J.; PRIYANTO, A. D. Effect of different strengths of MS media and BAP on banana plantlet growth in vitro. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 40, n. 4, p. 1110–1117, 2024. DOI: 10.17582/journal.sja/2024/40.4.1110.1117.

NWAUZOMA, A. B.; JAJA, E. T. A review of somaclonal variation in plantain (*Musa spp.*): mechanisms and applications. **Journal of Applied Biosciences**, v. 67, p. 5260–5268, 2013. DOI: 10.4314/jab.v67i0.95046.

NWAUZOMA, A. B.; TENKOUANO, A.; CROUCH, J. H.; PILLAY, M.; VUYLSTEKE, D.; KALIO, L. A. D. Yield and disease resistance of plantain (*Musa spp.*, AAB group) somaclones in Nigeria. **Euphytica**, v. 123, p. 323–331, 2002.

NYAINLETA, G.; PESIK, A.; HIARIEJ, A. Epidermal structure and leaf stomata of several accessions of banana plants (*Musa spp.*). **Jurnal Penelitian Pendidikan IPA**, v. 8, n. 6, p. 2194–2201, 2022. DOI: 10.29303/jppipa.v8i6.2194.

OLIVEIRA, T. R.; BALFAGÓN, D.; SOUSA, K. R.; ARAGÃO, V. P. M.; OLIVEIRA, L. F.; FLOH, E. I. S.; SILVEIRA, V.; GÓMEZ-CÁRDENAS, A.; SANTA-CATARINA, C. Long-term subculture affects rooting competence via changes in the hormones and protein profiles in *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 137–153, 2022. DOI: 10.1007/s11240-021-02172-6.

PASTERNAK, T. P.; STEINMACHER, D. Plant growth regulation in cell and tissue culture in vitro. **Plants**, v. 13, n. 2, e327, 2024. DOI: 10.3390/plants13020327.

PERMADI, N.; AKBARI, S. I.; PRISMANTORO, D.; INDRIYANI, N. N.; NURZAMAN, M.; ALHASNAWI, A. N.; DONI, F.; JULAEHA, E. Traditional and next generation methods for browning control in plant tissue culture: current insights and future directions. **Current Plant Biology**, v. 38, p. 100339, 2024. DOI: 10.1016/j.cpb.2024.100339.

POSIT SOFTWARE, PBC. **Rstudio: Integrated Development Environment for R**. Boston: Posit Software, PBC, 2024. Disponível em: <https://posit.co/>. Acesso em: 6 jul. 2025.

RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; SANTOS, S. C. Micropropagação para a conservação de espécies e melhoramento genético. In: SANTOS, C. C. (org.). **Agrobiodiversidade: manejo e produção sustentável**. Nova Xavantina, MT: Pantanal, 2020. V. 1, cap. 4. DOI: 10.46420/9786588319147cap4.

SHIRANI BIDABADI, S.; MEON, S.; WAHAB, Z.; SUBRAMANIAM, S.; MAHMOOD, M. Somaclonal variation and genetic stability assessment in micropropagated banana (*Musa* sp.) cultivars using RAPD markers. **Journal of Agricultural Science**, v. 2, n. 4, p. 254–261, 2010. DOI: 10.5539/jas.v2n4p254.

ŠIMONÍKOVÁ, D.; ČÍŽKOVÁ, J.; ZOULOVÁ, V.; CHRISTELOVÁ, P.; HŘIBOVÁ, E. Advances in molecular cytogenetics of bananas (Musaceae). **Plants**, v. 11, n. 4, e482, 2022. DOI: 10.3390/plants11040482.

SONI, K. B.; ANURADHA, T.; JADHAV, P. R.; ALEX, S. Genetic improvement of banana. In: TIWARI, B. K.; KOUL, O. (ed.). *Genetic engineering of crop plants for food and health security*. **Singapore: Springer Nature**, 2023. Cap. 15, p. 305. DOI: 10.1007/978-981-99-5034-8_15.

SOSNOWSKI, J.; TRUBA, M.; VASILEVA, V. O impacto da auxina e da citocinina no crescimento e desenvolvimento de culturas selecionadas. **Agriculture**, v. 13, n. 3, p. 724, 2023. DOI: 10.3390/agriculture13030724.

SOUZA, T. S.; MACEDO, J. P.; FERREIRA, M. T. M.; MORAES, I. C.; CASTRO, E. M.; RAMALHO, M. A. P.; MINGOSSO, F. B.; MISSIAGGIA, A. A.; TECHIO, V. H. Assessment of the cytogenetics and leaf anatomy of synthetic polyploids of *Eucalyptus* clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 23, n. 1, e43762316, 2023. DOI: 10.1590/1984-70332023v23n1a6.

STROSSE, H.; SCHOOFS, H.; PANIS, B.; ANDRÉ, E.; REYNIERS, K.; SWENNEN, R. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa spp.*). **Plant Science**, v. 170, p. 104–112, 2006.

SUMAN, S. Plant tissue culture: a promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. **Biochemistry and Cell Archives**, v. 17, p. 1–26, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TEIXEIRA, J. A. S.; DOBRÁNSZKI, J. Plant thin cell layers: update and perspectives. **Folia Horticulturae**, v. 27, n. 2, p. 183–190, 2015. DOI: 10.1515/fhort-2015-0029.

TIRKEY, N. **Influence of different cytokinins on in vitro regeneration of *Sarpagandha Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz.** 2021. Tese (Biotechnology) – College of Biotechnology, Birsa Agricultural University, Ranchi, Jharkhand, 2021.

VANDENHOUT, H.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; BAI, K. V. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, v. 83, n. 2, p. 117–122, 1995. DOI: 10.1007/BF01677738.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and

ISSR markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 43, n. 3, p. 267–274, 2007. DOI: 10.1007/s11627-007-9051-4.

VIEIRA, M. R. S.; SILVESTIM, E. G.; LIMA FILHO, A. A.; LOPES, A. B.; SILVESTIM, F. G. Métodos de assepsia na multiplicação in vitro da bananeira ‘Pacovan’ (*Musa spp.*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, e291101623765, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i16.23965.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised roots. **Growth**, v. 7, p. 53–65, 1943.

YANG, W.; CORTIJO, S.; KORSBO, N.; ROSZAK, P.; SCHIESSL, K.; GURZADYAN, A.; WIGHTMAN, R.; JÖNSSON, H.; MEYEROWITZ, E. Molecular mechanism of cytokinin-activated cell division in *Arabidopsis*. **Science**, v. 371, n. 6536, p. 1350–1355, 2021. DOI: 10.1126/72nosito.abe230.

CAPÍTULO 2

REGENERAÇÃO IN VITRO DE BANANEIRA cv. BRS TERRA-ANÃ VIA TÉCNICA DE CAMADAS FINAS DE TECIDO (TCL): RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS A CITOCININAS

SOUZA, Alexssandro Rodrigues. Universidade do Estado de Mato Grosso. Fevereiro de 2026. **Regeneração in vitro de bananeira cv. BRS Terra-Anã via técnica de camadas finas de tecido (TCL): respostas morfogênicas a citocininas**
Orientadora: Profa. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientador: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho.

RESUMO

A micropropagação de bananeira (*Musa spp.*) é uma ferramenta biotecnológica essencial para a produção massal de mudas de alta qualidade. Este estudo investigou, pela primeira vez, a aplicação da técnica de camadas finas de tecido (*Thin Cell Layer* – TCL) na regeneração organogênica da cv. BRS Terra-Anã, avaliando as respostas morfogênicas induzidas por três citocininas: benziladenina (BA), thidiazuron (TDZ) e meta-topolina (mT), em cinco concentrações (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg·L⁻¹). Explantes nodulares ultrafinos (≈1,1 mm) foram cultivados em meio MS modificado durante 120 dias. Os resultados revelaram padrões morfogênicos contrastantes: TDZ promoveu a maior taxa de multiplicação (8,46 brotos por explante aos 120 dias com 2,0 mg L⁻¹). Em contraste, mT demonstrou superioridade qualitativa, produzindo regenerantes com maior vigor, alongados e com alta competência para enraizamento (92% dos brotos apresentaram primórdios radiculares). A análise estatística via modelos lineares mistos generalizados (GLMM) e *Zero-Inflated Negative Binomial* (ZINB) confirmou a significância dos efeitos de tratamento, tempo e suas interações ($p < 0,05$). A técnica TCL mostrou-se altamente eficiente para bananeira, permitindo maior densidade de inoculação (sete explantes por frasco) e otimização do uso de recursos. Para protocolos de micropropagação comercial que priorizam eficiência, incluindo aclimatização, mT a 2,0–3,0 mg L⁻¹ representa a escolha ótima. Este estudo preenche uma lacuna metodológica importante na literatura de cultura de tecidos de *Musa spp.* e fornece subsídios para otimização de protocolos de micropropagação em larga escala.

Palavras-chave: Micropropagação; *Musa spp.*; Organogênese; Meta-topolina; Thidiazuron; Cultura de tecidos vegetais.

SOUZA, Alexssandro Rodrigues. Universidade do Estado de Mato Grosso. February 2026. **In vitro regeneration of cv. BRS Terra-Anã banana via the Thin Cell Layer (TCL) technique: morphogenetic responses to cytokinins.** Advisor: Prof. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co-advisor: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho.

ABSTRACT

Micropropagation of banana (*Musa spp.*) is an essential biotechnological tool for mass production of high-quality plantlets. This study investigated, for the first time, the application of the Thin Cell Layer (TCL) technique in organogenic regeneration of cultivar BRS Terra-Anã, evaluating morphogenetic responses induced by three cytokinins: benzyladenine (BA), thidiazuron (TDZ), and meta-topolin (mT), at five concentrations (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, and 4.0 mg·L⁻¹). Ultrathin nodular explants (≈1.1 mm) were cultured on modified MS medium for 120 days. Results revealed contrasting morphogenetic patterns: TDZ promoted the highest multiplication rate (8.46 shoots per explant at 120 days with 2.0 mg·L⁻¹), but with severe qualitative limitations, including hyperhydricity and absence of rooting competence. In contrast, mT demonstrated qualitative superiority, producing more vigorous, elongated regenerants with high rooting competence (92% of shoots presented root primordia). Statistical analysis via Generalized Linear Mixed Models (GLMM) and Zero-Inflated Negative Binomial (ZINB) confirmed the significance of treatment, time effects, and their interactions ($p < 0.05$). The TCL technique proved highly efficient for banana, allowing higher inoculation density (seven explants per flask) and optimization of resource use. For commercial micropropagation protocols prioritizing overall efficiency, including acclimatization, mT at 2.0–3.0 mg·L⁻¹ represents the optimal choice. This study fills an important methodological gap in the *Musa spp.* Tissue culture literature and provides support for optimization of large-scale micropropagation protocols.

Keywords: Micropropagation; *Musa spp.*; Organogenesis; Meta-topolin; Thidiazuron; Plant tissue culture.

1. INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa spp.*) consolidou-se como uma das culturas de maior relevância socioeconômica global, sendo a fruta mais comercializada internacionalmente e um pilar fundamental para a segurança alimentar em regiões tropicais e subtropicais (Galán et al., 2018). Com uma produção mundial estimada em mais de 95 milhões de toneladas, o Brasil destaca-se como o quinto maior produtor, desempenhando um papel estratégico na bioeconomia frutícola da América Latina (Silva et al., 2013). No entanto, a sustentabilidade da bananicultura enfrenta ameaças fitossanitárias sem precedentes, como o avanço da murcha de *Fusarium* (Raça Tropical 4 – TR4) e da Sigatoka-negra, que exigem a renovação constante dos plantios com clones de alta fidelidade genética e isentos de patógenos (Kumar et al., 2024).

Neste cenário, a micropropagação convencional via ápices caulinares tem sido o método padrão para a produção massal de mudas. Contudo, apesar de sua ampla adoção, essa técnica ainda apresenta gargalos importantes, como taxas de multiplicação limitadas, elevados custos operacionais por unidade produzida e risco de variações somaclonais, especialmente em decorrência do uso prolongado ou de altas concentrações de reguladores de crescimento (Cejas et al., 2011; Tegen, 2016). Para superar essas limitações, a técnica de Camadas Finas de Tecido (*Thin Cell Layer* – TCL) emerge como uma alternativa disruptiva e de alto rendimento. Baseada no uso de explantes ultrafinos (0,1 a 5,0 mm), a TCL maximiza a área de contato com o meio de cultura e otimiza a reprogramação celular devido à maior densidade de tecidos meristemáticos e vasculares expostos (Teixeira; Dobránszki, 2015). Embora promissora, a aplicação da TCL em *Musa spp.* ainda é escassa na literatura, carecendo de protocolos otimizados para cultivares de relevância regional.

Um dos fatores determinantes para o sucesso da regeneração *in vitro* via TCL é o balanço hormonal, especificamente a escolha da citocinina. Tradicionalmente, a benziladenina (BA) e o thidiazuron (TDZ) têm sido os reguladores mais empregados. Embora a BA seja amplamente utilizada devido à sua disponibilidade e eficiência na indução de brotações, sua presença pode comprometer o desenvolvimento do sistema radicular. Esse efeito tem sido associado tanto ao acúmulo de metabólitos derivados da BA na base do explante quanto ao desequilíbrio hormonal entre citocininas e auxinas, uma vez que níveis

elevados de citocininas tendem a inibir processos relacionados ao enraizamento (Sosnowski; Truba; Vasileva, 2023; Aremu et al., 2012^a).

Já o TDZ, apesar de seu potente efeito proliferativo, é frequentemente associado a desordens fisiológicas como a hiperhidricidade, comprometendo a qualidade das mudas e o sucesso na aclimatização (Salma et al., 2024). Em contrapartida, a meta-topolina (mT), um análogo aromático da BA, tem demonstrado resultados superiores em diversas espécies lenhosas e herbáceas. A vantagem metabólica da mT reside em sua translocação eficiente e desativação via metabólitos que não interferem na sinalização das auxinas endógenas, promovendo um equilíbrio único entre altas taxas de multiplicação e excelente competência radicular *in vitro* (Abdalla; Dobránszki, 2024; Grira et al., 2024).

A cv. BRS Terra-Anã representa um avanço estratégico para a agricultura brasileira, oferecendo resistência e produtividades adaptadas às condições locais. No entanto, a expansão comercial desta cultivar depende diretamente da disponibilidade de protocolos biotecnológicos que assegurem o vigor vegetativo e a sanidade do material propagativo.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial morfogenético de explantes TCL da cv. BRS Terra-Anã sob diferentes regimes de BA, mT e TDZ. A fim de maximizar a taxa de multiplicação, visando a otimização da cadeia produtiva de mudas e o fortalecimento da bananicultura nacional.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo dos Explantes e Condições de Cultivo

Foram utilizadas formações nodulares de bananeira cv. BRS Terra-Anã previamente estabelecidos *in vitro*. Os explantes TCL foram obtidos através de cortes transversais ultrafinos (aproximadamente 1,1 mm de espessura) na região do disco basal (Teixeira; Dobránszki, 2015) (Figura 1). Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (Calsson Labs, Smithfield, UT, USA) (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas de White (1943), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de 76nositol (Acumedia®; Neogen, Lansing, MI, USA) e solidificado com 2,8 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma Aldrich®). O meio foi suplementado com reguladores de

crescimento vegetal, como Benziladenina (BA), Meta-topolina (mT) e Thidiazuron (TDZ) (Sigma Aldrich®).

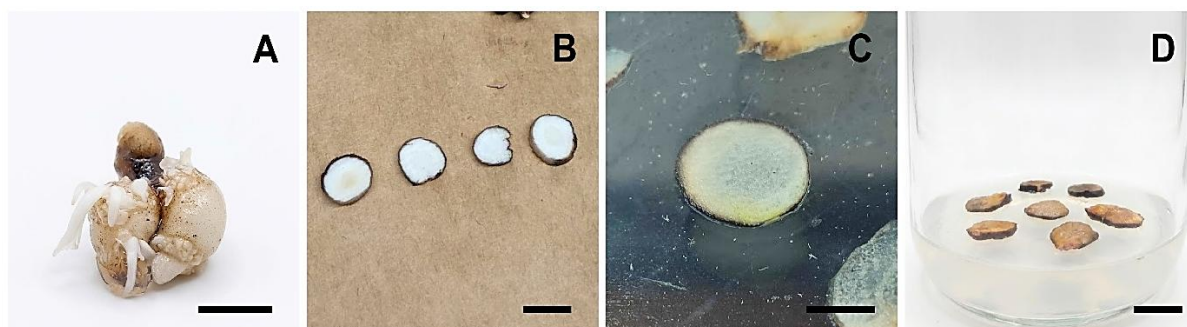


Figura 1. Etapas do preparo das TCLs. (A) Formação nodular. Bar. 2 cm. (B) TCLs após seccionadas. Bar. 2 cm (C) TCL evidenciando estabelecida em meio de cultura evidenciando espessura. Bar. 1 cm. (D) Disposição das TCLs após a inoculação em meio de cultura. Bar. 2 cm.

2.2 Tratamentos Experimentais

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial $3 \times 5 \times 4$, envolvendo três citocininas (BA, mT e TDZ), cinco concentrações (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e quatro tempos de avaliação (30, 60, 90 e 120 dias de cultivo). Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco de cultivo com capacidade de 250 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e sete explantes do tipo TCL.

2.3 Coleta de Dados e Análise Estatística

Foram avaliados o número de brotos por explante, o comprimento do broto (mm), o número de folhas, o diâmetro do pseudocaule (mm) e a presença de raízes. Os dados foram analisados utilizando Modelos Lineares Mistos Generalizados (GLMM) para variáveis contínuas e Modelos *Zero-Inflated Negative Binomial* (ZINB) para dados de contagem com excesso de zeros (Zuur et al., 2009). As análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2023).

3. RESULTADOS

A regeneração via TCL seguiu um padrão de organogênese direta, com a formação de primórdios de brotos a partir da periferia do explante (Figura 2).

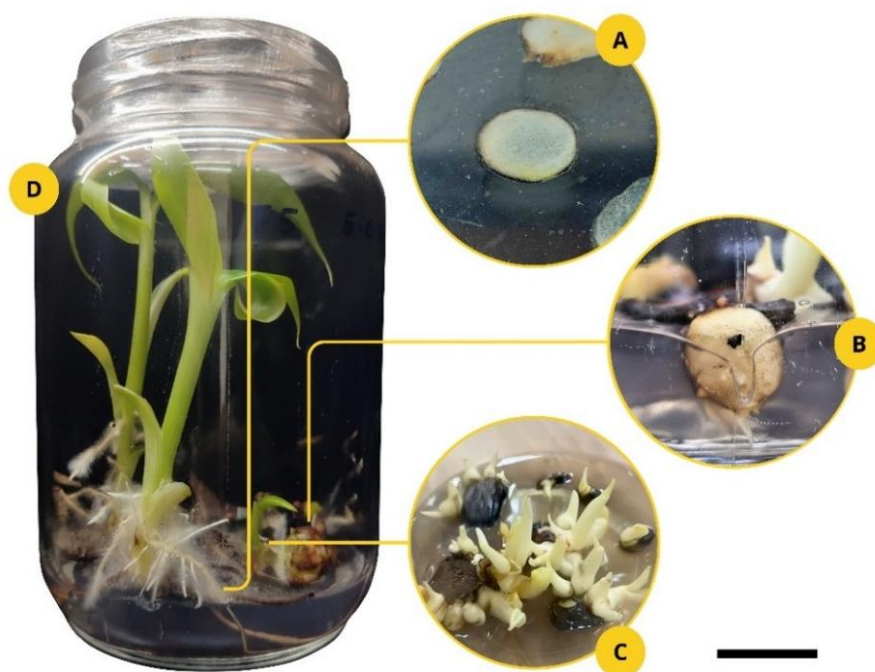


Figura 2. Etapas da organogênese in vitro em explantes de camadas finas de tecido (TCL) da cv. BRS Terra-Anã. (A-B) Início da resposta morfogênética com intumescimento dos tecidos; (C-D) Desenvolvimento de múltiplos primórdios de brotos a partir da região subepidérmica.

Houve efeito significativo da interação entre tipo de citocinina, concentração e tempo de cultivo ($p < 0,001$). A dinâmica de proliferação variou drasticamente entre os reguladores (Figuras 3, 4 e 5).

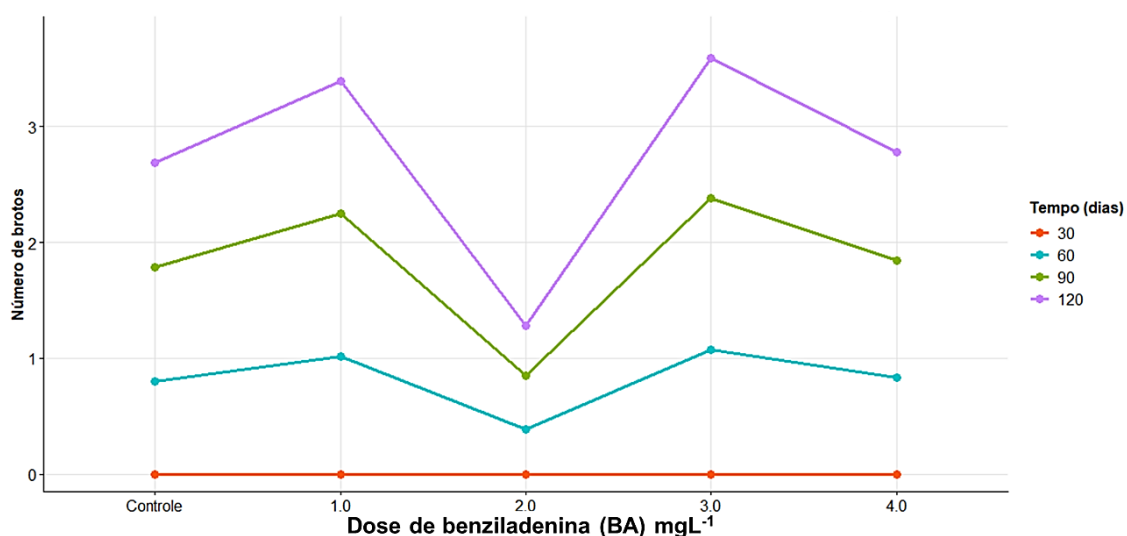


Figura 3. Dinâmica temporal do número médio de brotos por explante TCL sob diferentes concentrações de benziladenina (BA). As linhas representam as médias ajustadas pelo modelo ZINB ao longo de 120 dias de cultivo.

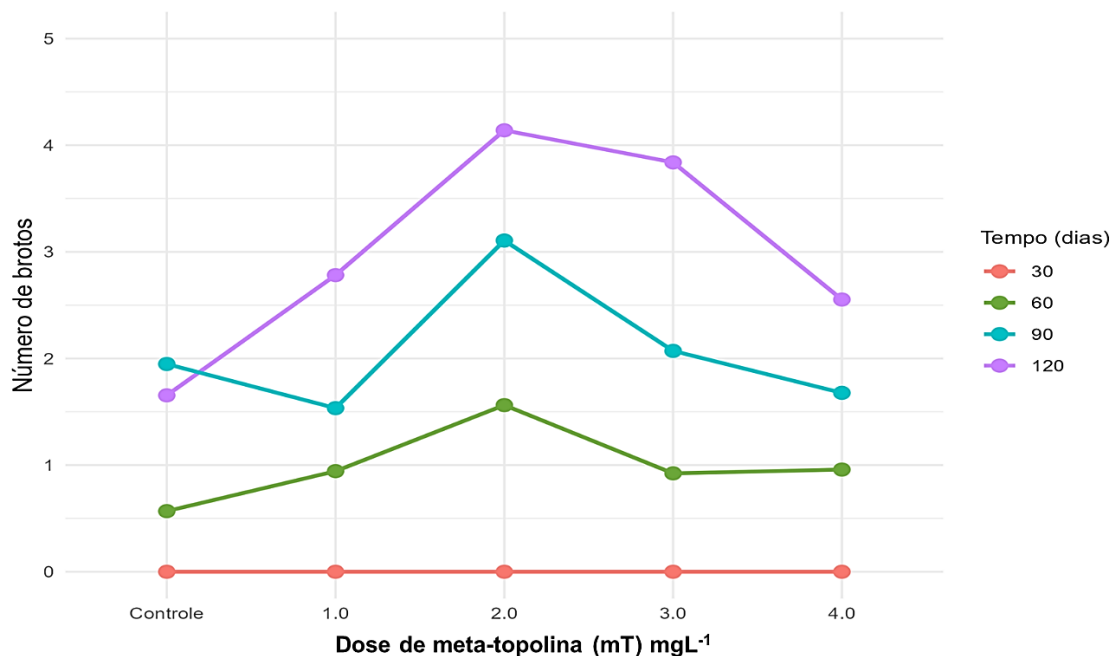


Figura 4. Resposta proliferativa de explantes TCL em função de diferentes concentrações de meta-topolina (mT). Observa-se um incremento linear na produção de brotos até os 120 dias, com estabilização qualitativa superior.

O thidiazuron (TDZ) promoveu a maior taxa de multiplicação, alcançando média de 8,46 brotos por explante na concentração de 2,0 mg L⁻¹ aos 120 dias (Figura 4).

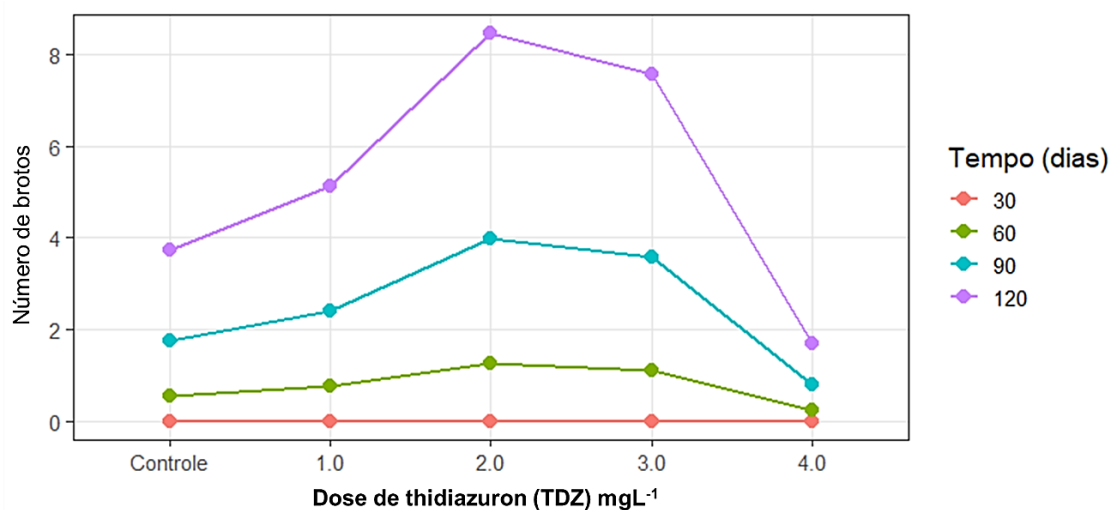


Figura 5. Efeito de concentrações de thidiazuron (TDZ) na multiplicação de brotos via TCL. Nota-se o maior potencial quantitativo deste regulador aos 120 dias de cultivo em comparação aos demais tratamentos.

No entanto, observou-se um painel visual de diferenciação nítido entre os tratamentos (Figura 6).

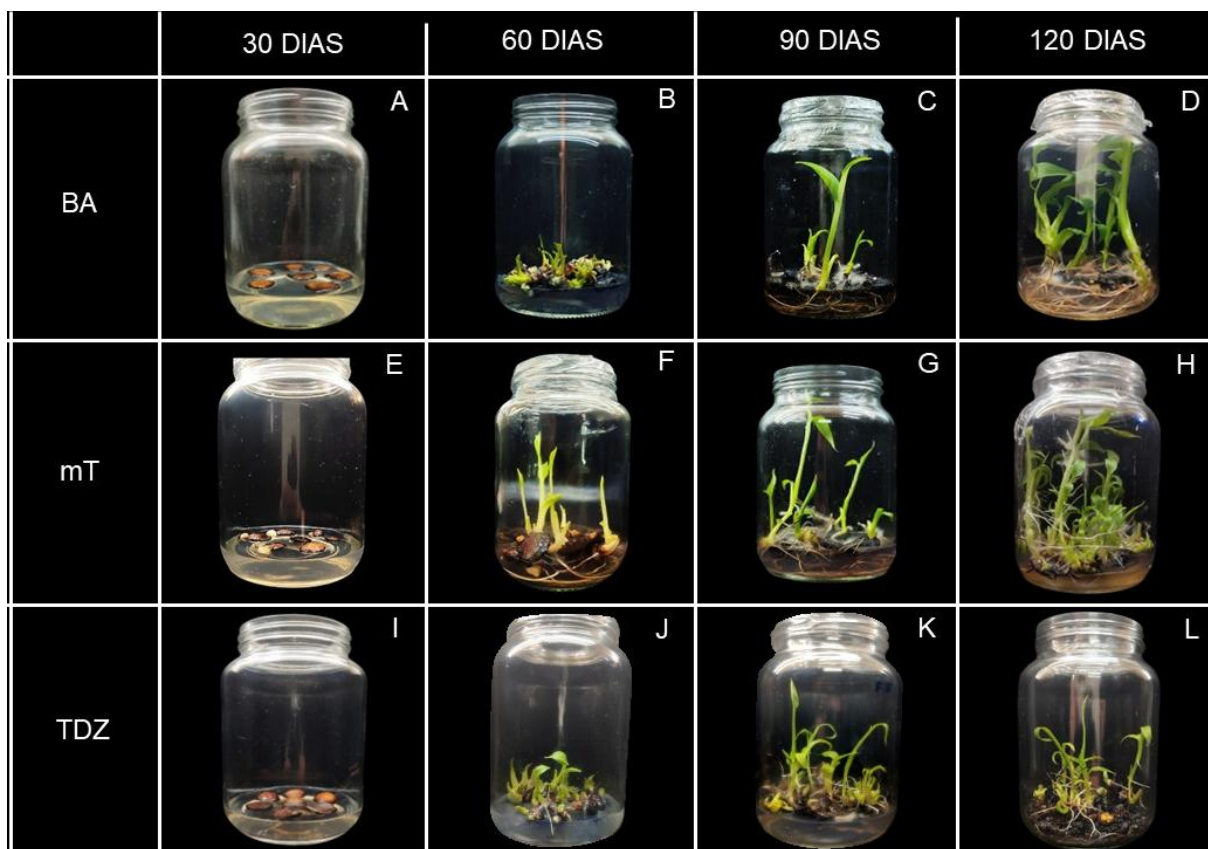


Figura 6. Aspectos morfológicos de regenerantes da cv. BRS Terra-Anã aos 120 dias de cultivo em função da citocinina e concentração. (A-D) BA; (E-H) mT e (I-L) TDZ. Escala de tempo horizontal (30, 60, 90 e 120 dias).

A análise comparativa pelo teste de Tukey (Figura 7) e a relação entre brotos totais e plantas viáveis (Figura 8) destacam a superioridade quantitativa do TDZ e a eficiência qualitativa da mT.

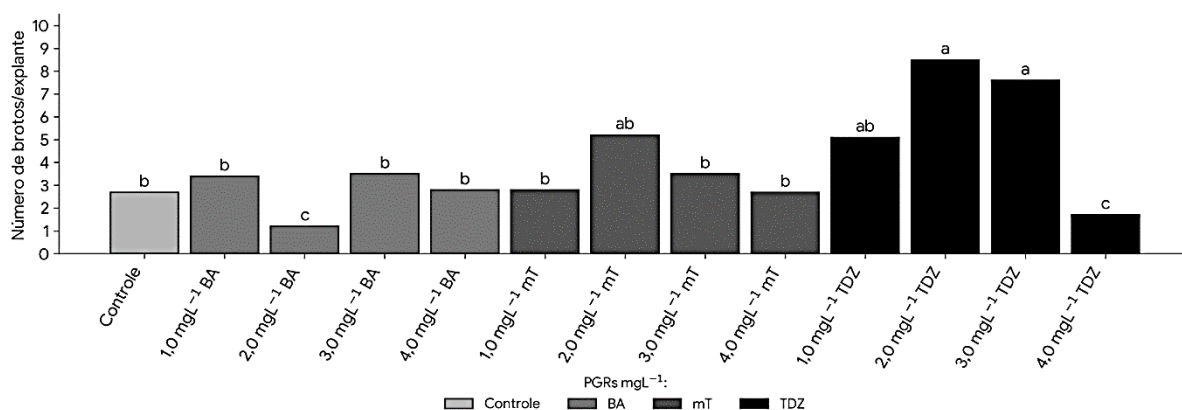


Figura 7. Comparação estatística do número de brotos aos 120 dias entre as três citocininas nas concentrações testadas. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

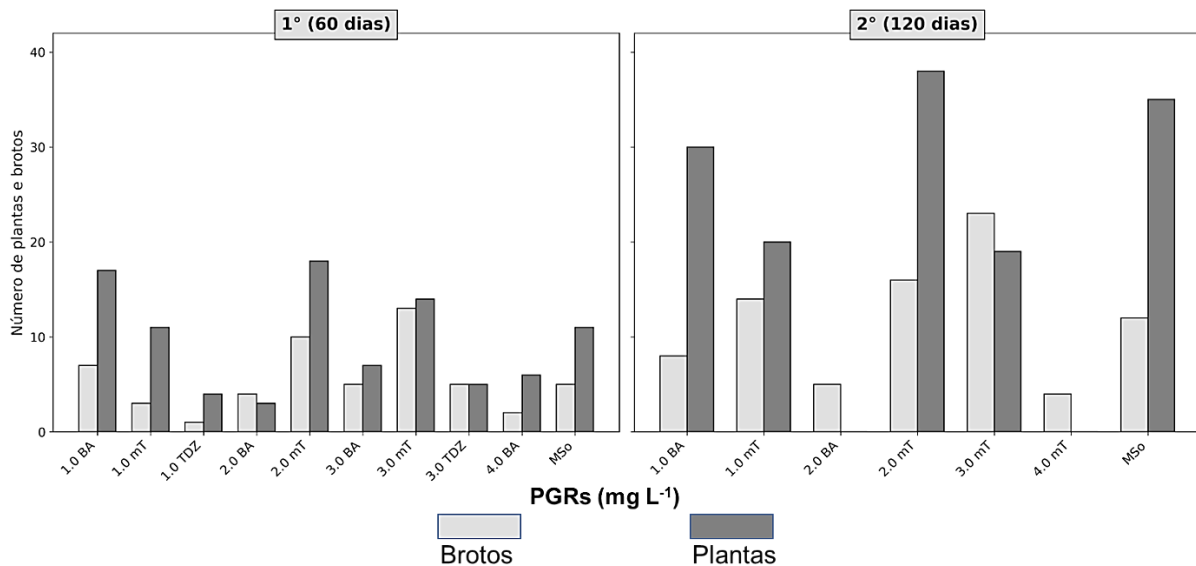


Figura 8. Análise comparativa entre o número total de brotos regenerados e o número de plantas individualizadas aos 60 e 120 dias. Observa-se a discrepância entre produção bruta (TDZ) e aproveitamento final (mT).

As variáveis morfométricas (Figura 9) confirmaram que a mT produz plantas com pseudocaule mais robusto e folhas mais largas, facilitando a etapa posterior de aclimatização.



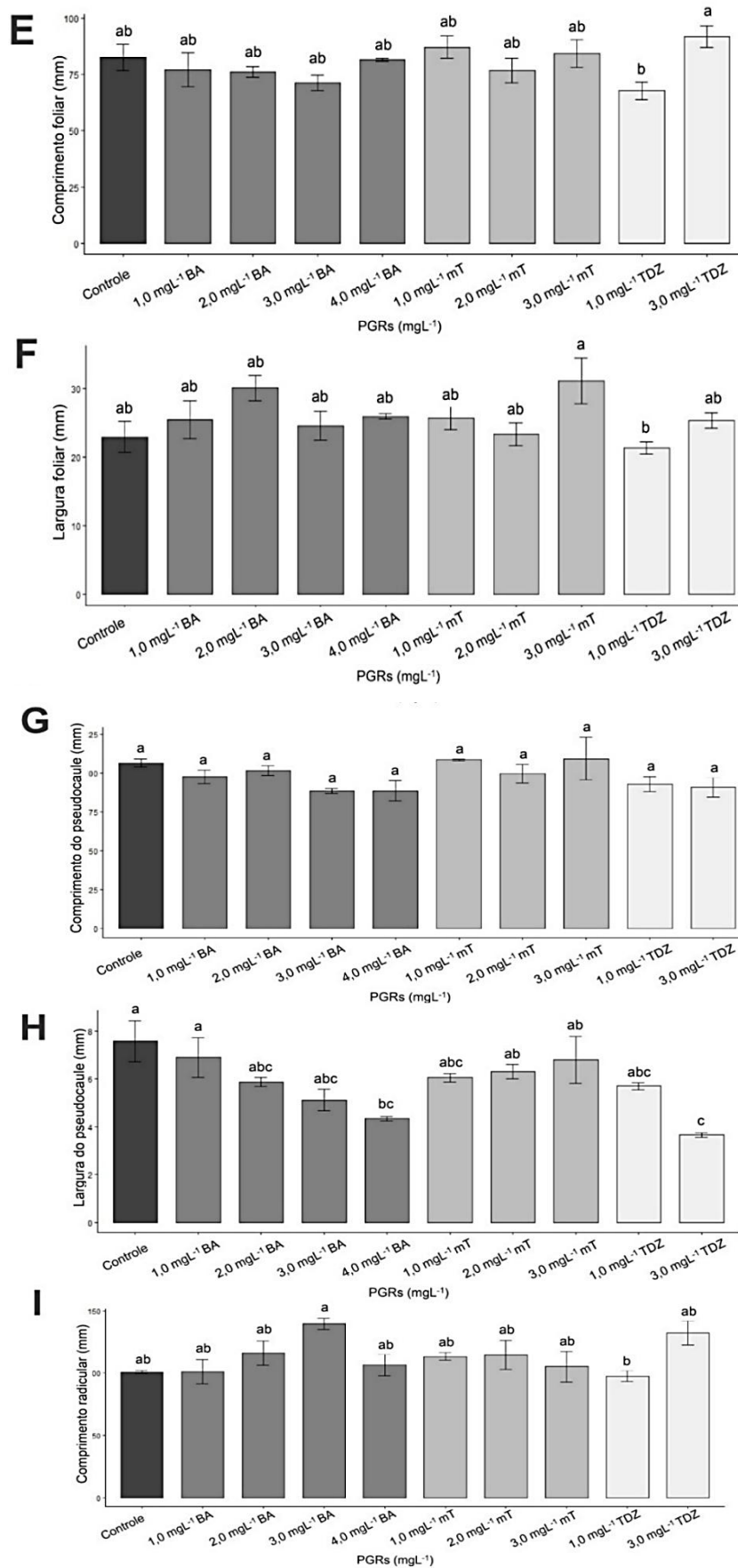


Figura 9. Parâmetros morfométricos e competência radicular de regenerantes aos 120 dias. Visão geral das plantas formadas (A) Planta controle cultivada em meio MS isento de reguladores de crescimento; plantas previamente induzidas em meio suplementado com reguladores de crescimento vegetal (PGRs): (B) BA; (C) mT; (D) TDZ. Bar. 5 cm; (E-I) Gráficos de barras representando comprimento do pseudocaule, largura foliar, comprimento foliar, largura do pseudocaule e comprimento radicular. Barras representam erro padrão da média (SEM).

Por fim, a síntese dos resultados demonstra que, embora o TDZ maximize a produção numérica, a mT oferece um equilíbrio superior entre eficiência proliferativa e qualidade fisiológica (Figura 10).

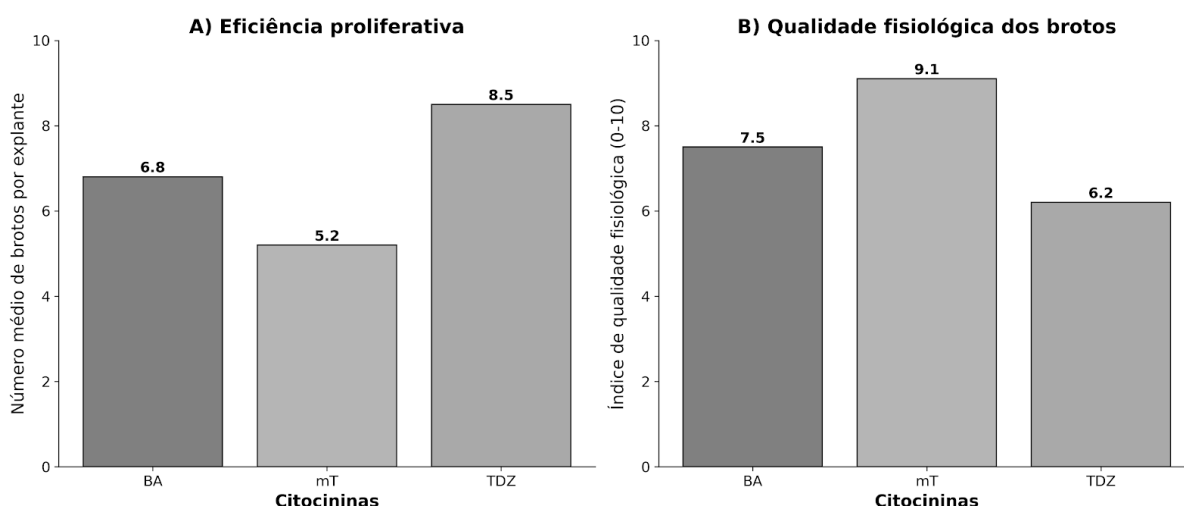


Figura 10. Comparação de citocininas na técnica TCL em *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã. (A) Síntese da eficiência proliferativa: Número de brotos por explante TCL em função dos tratamentos. Índice de qualidade fisiológica e competência para enraizamento in vitro; (B) A meta-topolina (mT) resultou em maior vigor e prontidão para aclimatização.

4. DISCUSSÃO

A eficácia da técnica de Camadas Finas de Tecido (TCL) para a regeneração da cv. BRS Terra-Anã confirma a premissa de que explantes de dimensões reduzidas maximizam a competência morfogenética (Sharma et al., 2023). A superioridade da TCL em relação aos métodos convencionais de ápices caulinares (Cronauer; Krikorian, 1984) deve-se à maior exposição das células aos reguladores de crescimento e à proximidade dos tecidos vasculares, facilitando a absorção de nutrientes e a reprogramação celular (Teixeira; Dobránszki, 2015).

O thidiazuron (TDZ) demonstrou ser a citocinina mais eficaz na indução de brotações, um resultado consistente com o relatado por Salma et al. (2024), que destacam o TDZ como um regulador de alta estabilidade metabólica capaz de inibir

a enzima citocinina oxidase. No entanto, a alta taxa de multiplicação (8,46 brotos/explante) foi acompanhada por baixa competência radicular espontânea. Este fenômeno ocorre porque o TDZ, sendo uma fenilureia, pode induzir estresse oxidativo e desequilíbrios na síntese de etileno, resultando em tecidos com excesso de água e paredes celulares pouco lignificadas (Abdalla; Dobránszki, 2024). Em protocolos de alto impacto, a produtividade bruta não deve se sobrepor à viabilidade técnica, o que torna o uso isolado de TDZ em altas concentrações um risco para a produção comercial da cv. BRS Terra-Anã.

A meta-topolina (mT) destacou-se como o regulador mais equilibrado, promovendo não apenas uma proliferação satisfatória, mas também o melhor desenvolvimento morfométrico. A notável taxa de enraizamento espontâneo (92%) observada nos tratamentos com mT representa um diferencial crítico. Ao contrário da benziladenina (BA), que frequentemente inibe a formação de raízes, a mT possui uma via metabólica distinta. Estudos recentes indicam que os derivados da mT são translocados de forma mais eficiente e sua desativação via N9-glicosilação ocorre de modo a não interferir na sinalização das auxinas necessárias para a iniciação radicular (Grira et al., 2024; Hussain et al., 2019).

Além disso, o vigor das plantas tratadas com mT, evidenciado pelo maior diâmetro do pseudocaule e largura foliar, são características preditores diretos de sucesso na etapa de aclimatização, reduzindo o tempo de permanência em casa de vegetação e a mortalidade ex vitro (Talla et al., 2022; Koç, 2021).

A escolha entre mT e TDZ deve considerar o objetivo final do produtor. Se o foco for a multiplicação rápida em fases iniciais, reguladores de maior atividade citocinínica podem favorecer taxas elevadas de proliferação. Contudo, para a cv. BRS Terra-Anã, a recomendação de mT (2,0-3,0 mg L⁻¹) mostra-se mais segura e eficiente.

É importante ressaltar que o uso prolongado de citocininas de alta atividade, como o TDZ, aumenta o risco de variações somaclonais (Aremu et al., 2012b). Embora a mT seja frequentemente associada a uma maior estabilidade genética em diversas espécies (Hussain et al., 2019), recomenda-se o monitoramento molecular dos regenerantes para garantir a fidelidade genética desta cultivar brasileira em larga escala.

A técnica de TCL apresenta-se não apenas como um método de regeneração, mas como uma perspectiva transformadora para a produção massal de mudas da cv. BRS Terra-Anã. A capacidade de gerar múltiplos brotos a partir de secções ultrafinas abre caminho para a automação do processo e a integração com sistemas de biorreatores de imersão temporária (TIS), o que poderia reduzir drasticamente os custos operacionais e o tempo de laboratório. Além disso, a otimização deste protocolo permite uma resposta rápida a demandas de mercado e programas de fomento agrícola, garantindo o fornecimento de material propagativo com alto rigor sanitário e vigor vegetativo.

Em suma, a transição para métodos mais refinados como a TCL, apoiada pela bioeficiência da meta-topolina, fornece as bases para que produtores e biofábricas otimizem seus sistemas produtivos, assegurando que a cv. BRS Terra-Anã alcance seu pleno potencial produtivo no campo com o suporte de uma base científica sólida e inovadora.

Considerando a eficiência global do processo de micropropagação, que inclui a taxa de sobrevivência na aclimatização, a meta-topolina na faixa de 2,0 a 3,0 mg L⁻¹ mostrou-se a melhor recomendação para produção comercial. Embora produza menos brotos que o TDZ em números absolutos, os regenerantes de mT possuem maior vigor e competência para o estabelecimento ex vitro.

5. CONCLUSÃO

A técnica TCL é um método viável e eficiente para a regeneração in vitro da cv. BRS Terra-Anã, permitindo alta densidade de explantes e otimização do meio de cultura. O thidiazuron (TDZ) a 2,0 mg L⁻¹ maximiza a produção numérica de brotos, mas compromete a qualidade fisiológica e o enraizamento das plântulas. A meta-topolina (mT) a 2,0-3,0 mg L⁻¹ é a citocinina mais indicada para protocolos que visam mudas de alta qualidade, apresentando o melhor equilíbrio entre multiplicação e prontidão para o campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, N.; DOBRÁNSZKI, J. Meta-Topolin as an Effective Benzyladenine Derivative to Improve the Multiplication Rate and Quality of In Vitro Axillary Shoots of Húsvéti Rozmaring Apple Scion. **Plants**, v. 13, n. 11, 1568, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13111568>

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; SZÜČOVÁ, L.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F. Shoot and root proliferation in 'Williams' banana: are the topolins better cytokinins? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n. 3, p. 209–218, 2012a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0187-9>

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; SZÜČOVÁ, L.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F. Assessment of the role of meta-topolins on in vitro produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated 'Williams' banana. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 6, p. 2265–2273, 2012b. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1027-6>

CEJAS, I.; CAPOTE, I.; ARAGÓN, C.; ESCALONA, M.; PINA, D. Optimizing protocol of plantain propagation cv. CEMSA 3/4 in temporary immersion bioreactors. **Biotecnología Vegetal**, v. 11, n. 4, p. 231–237, 2011.

CRONAUER, S. S.; KRIKORIAN, A. D. Rapid multiplication of bananas and plantains by in vitro shoot tip culture. **HortScience**, v. 19, n. 2, p. 234–235, 1984.

GALÁN, V.; RANGEL, A. G.; LÓPEZ, J.; PÉREZ HERNÁNDEZ, J. B.; SANDOVAL, J. Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 4, e-574, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-29452018574>

GRIRA, M.; PRINSEN, E.; WERBROUCK, S. New Understanding of Meta-Topolin Riboside Metabolism in Micropropagated Woody Plants. **Plants**, v. 13, n. 9, 1281, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13091281>

HUSSAIN, S. A.; AHMAD, N.; ANIS, M.; ALATAR, A. A. Influence of meta-topolin on in vitro organogenesis in *Tecoma stans* L., assessment of genetic fidelity and phytochemical profiling of wild and regenerated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 139, n. 1, p. 151–164, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01631-5>

KOÇ, E. Effects of Meta-topolin on the Growth, Physiological and Biochemical Parameters in Plant Tissue Culture. In: **Recent Trends in Plant Tissue Culture**. Singapore: Springer, 2021. p. 435-451. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-15-9046-7_19

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

SALMA, U.; KUNDU, S.; MANDAL, N.; et al. Thidiazuron-mediated in vitro clonal propagation of banana cultivar Grand Naine. **International Journal of Agriculture**

Extension and Social Development, v. 7, n. 4, 2024.
DOI: <https://doi.org/10.33545/26180723.2024.v7.i4sb.533>

SHARMA, V.; MAGOTRA, T.; CHOURASIA, A.; MITTAL, D.; PRATHAP SINGH, U.; SHARMA, S.; SHARMA, S.; GARCÍA RAMÍREZ, Y.; DOBRÁNSZKI, J.; MARTINEZ MONTERO, M.E. Thin Cell Layer Tissue Culture Technology with Emphasis on Tree Species. **Forests**, v.14, p. 1212, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/f14061212>

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; et al. Melhoria genética da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 1-10, 2013. DOI: 10.1590/S0100-29452013000300032

SOSNOWSKI, J.; TRUBA, M.; VASILEVA, V. The Impact of Auxin and Cytokinin on the Growth and Development of Selected Crops. **Agriculture**, v.13, p.724, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13030724>

TALLA, S. K.; BAGARI, P.; MANGA, S. B.; et al. Comparative study of micropropagated plants of Grand Naine banana during in vitro regeneration and ex vitro acclimatization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40, 102325, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102325>

TEGEN, H. The Role of Plant Tissue Culture to Supply Disease Free Planting Materials of Major Horticultural Crops in Ethiopia. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

TEIXEIRA, J. A. S.; DOBRÁNSZKI, J. Plant thin cell layers: update and perspectives. **Folia Horticulturae**, v. 27, n. 2, p. 183–190, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1515/fhort-2015-0029>

WHITE, P. R. **A Handbook of Plant Tissue Culture**. Lancaster: Jacques Cattell Press, 1943. 277 p.

CONCLUSÃO GERAL

A regeneração de explantes de *Musa spp.* cv. BRS Terra-Anã em ciclos sucessivos de subcultivo sob ação de BA evidenciou elevado potencial proliferativo, destacando-se a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ como a mais eficiente por conciliar alta produtividade de brotos e viabilidade econômica. O monitoramento sistemático dos subcultivos mostrou-se indispensável para assegurar a fidelidade genética das plantas regeneradas, considerando o risco de variações somaclonais associado ao estresse oxidativo, à exposição prolongada a citocininas e ao número elevado de repicagens. Recomenda-se a realização de três a quatro subculturas como estratégia para maximizar a multiplicação com menor probabilidade de instabilidade genética.

A micropropagação por meio da técnica de TCL demonstrou forte dependência do tipo de citocinina, da concentração e do tempo de exposição, evidenciando que não há um regulador universalmente superior, mas respostas específicas conforme o objetivo da cultivar. O TDZ promoveu elevada indução de brotos, embora com menor vigor; o mT favoreceu melhor qualidade fisiológica; e a BA proporcionou produção intermediária, aliada a menor custo e ampla aplicabilidade. As diferenças entre reguladores refletiram-se tanto na quantidade quanto na qualidade e no vigor dos brotos regenerados, reforçando a importância da escolha estratégica do PGR conforme a finalidade produtiva.

Diante da inexistência de protocolos consolidados para a cv. BRS Terra-Anã, os resultados obtidos constituem base técnica consistente para programas de micropropagação comercial. A padronização das concentrações hormonais, do número de subcultivos e do tipo de regulador de crescimento permite aliar eficiência regenerativa, qualidade fisiológica e segurança genética. Considerando a relevância agrônômica da cultivar para a agricultura familiar, os achados contribuem para viabilizar a produção em larga escala de mudas uniformes e de alto desempenho, consolidando a BA como principal alternativa para multiplicação, com uso complementar de TDZ ou mT conforme o objetivo específico do sistema produtivo.