

44

Circular Técnica

Fortaleza, CE
Agosto, 2014

Autores

Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho
Bióloga, D.Sc. em Genética,
pesquisadora da Embrapa
Agroindústria Tropical,
Fortaleza, CE,
cristina.carvalho@embrapa.br

Natália de Oliveira Pereira
Engenheira-agrônoma, bolsista
do Fundo Brasileiro para a
Biodiversidade, Rio de Janeiro, RJ,
natyagronomiaufc@gmail.com

Antonio Anderson de Jesus Rodrigues
Engenheiro-agrônomo, M.Sc.
em Fitotecnia pela Universidade
Federal do Ceará, Fortaleza, CE,
andersonjr@hotmail.com

Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini
Engenheira-agrônoma, D.Sc.
em Fitotecnia, professora da
Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, CE, candida@ufc.br

Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra
Engenheiro-agrônomo, D.Sc.
em Fitotecnia, professor da
Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, CE, esmeraldo@ufc.br.

José Dionis Matos Araújo
Engenheiro-agrônomo, M.Sc.
em Fitotecnia pela Universidade
Federal do Ceará, Fortaleza, CE,
dionisufc@gmail.com



Alongamento e Enraizamento de Mudanças Micropropagadas de Bananeira cv. Williams

Introdução

A bananicultura é uma atividade de grande relevância social e econômica em todo o mundo. Em 2012, a produção mundial de banana foi cerca de 102 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2013). No Brasil, é uma das espécies frutíferas de maior interesse (OLIVEIRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011). Em 2012, nosso país destacou-se como o quinto maior produtor mundial, alcançando cerca de 6,9 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2013).

Embora existam mais de mil variedades diferentes de bananeira, as mais domesticadas são estéreis e poliploides, e tais características limitam tanto o melhoramento genético pelo método tradicional quanto a propagação da cultura (PÉREZ-HERNÁNDEZ; ROSELL-GARCIA, 2008).

Segundo Silva (2000), a cv. Williams pertence ao subgrupo Cavendish, composto por cultivares muito suscetíveis a mutações, cujos frutos são delgados, longos e encurvados, além de apresentarem paladar muito doce, quando maduros. Além disso, ela possui várias vantagens, tais como: a) resistência a algumas doenças; b) maior período de durabilidade após colheita dos frutos, garantindo um produto de melhor qualidade quando exportado; c) porte baixo; d) folhas mais retas do que as da cultivar Nanicão; d) resistência ao *chilling*, dano fisiológico que ocorre na planta e/ou no fruto, causado por baixas temperaturas (MANICA, 1997).

A expansão da bananicultura no Brasil e no mundo é totalmente dependente do controle fitossanitário e da produção de mudas. Sendo assim, para atender à demanda crescente por material propagativo de bananeira de alta qualidade fitossanitária e genética, a técnica de produção de mudas micropropagadas tem sido cada vez mais empregada com esse propósito.

A grande maioria dos plantios ainda é realizada utilizando-se mudas de bananeira obtidas pelo método convencional de propagação, ou seja, provenientes de brotações laterais (axilares) de plantas adultas. Os tipos de mudas utilizadas (Figura 1) são do tipo chifirão, chifre, chifrinho, rizoma de planta adulta, rizoma com filho aderido, pedaço de rizoma e muda tipo guarda-chuva. No entanto, esse processo apresenta baixa taxa de multiplicação (VUYLSTEKE; DE LANGHE, 1985), além de resultar em mudas desuniformes, dificultando o manejo do pomar. Constitui-se também em um mecanismo de disseminação de pragas e doenças, podendo ocasionar perdas de até 100% na produtividade (SILVA et al., 2003).

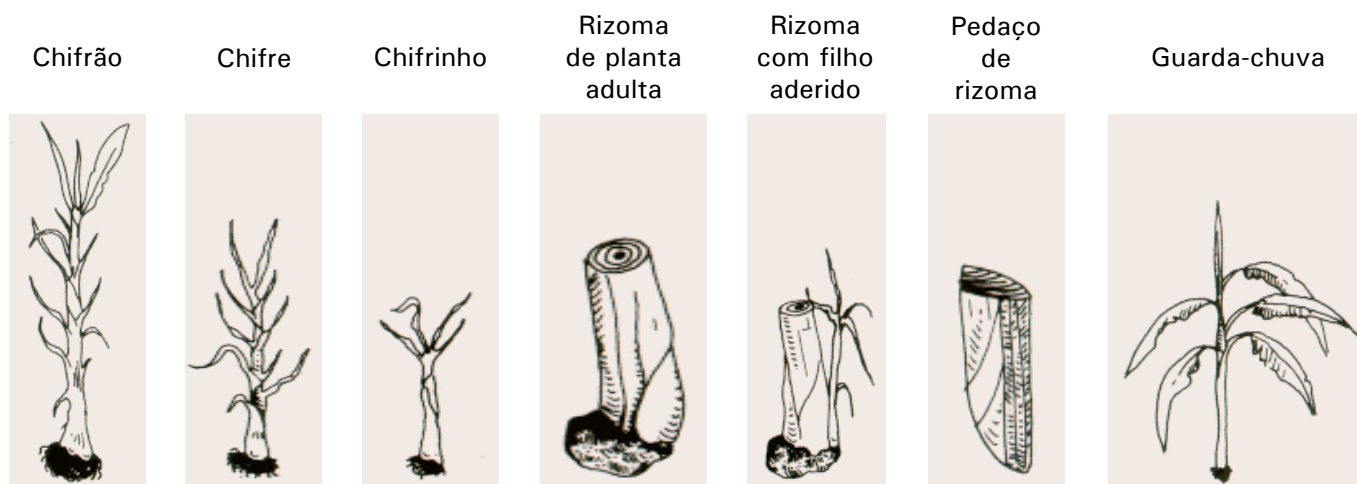


Figura 1. Esquema dos tipos de mudas de bananeira utilizadas como material propagativo pelo sistema convencional de propagação.

Fonte: Echeverri-Lopez & Garcia-Reis (1977).

Por essas razões, vem crescendo o uso de mudas de bananeiras propagadas por cultura de tecidos. Essa técnica é uma importante ferramenta para a obtenção massal de clones (RESMI, NAIR, 2011; NOMURA et al., 2012), pois eleva as taxas de multiplicação das culturas, gera plantas com uniformidade fisiológica, de elevada qualidade e viabilidade, livres de doenças e pragas, e garante a manutenção da identidade genética das plantas produzidas (KAÇAR et al., 2010; RESMI, NAIR, 2011; GOVINDARAJU et al., 2012). Outra vantagem da produção *in vitro* de mudas é que essa técnica independe da estação do ano, demandando menos tempo e menor área necessária para a propagação dessa espécie (ERIG, SCHUCH, 2005).

Comparando-se os diferentes métodos de propagação vegetativa com relação ao número de mudas obtidas e ao tempo gasto na sua produção, verifica-se que a micropropagação é muito superior aos demais processos. Segundo Santos-Serejo et al. (2009), enquanto no processo convencional são necessários 12 meses para a obtenção de 10 a 30 mudas, dependendo do genótipo utilizado, cerca de dez vezes mais mudas são obtidas em quase metade do tempo por meio da micropropagação.

No Brasil, o uso de mudas micropropagadas tem crescido significativamente, com o objetivo de atender à demanda por material propagativo de qualidade, principalmente nas regiões onde essa espécie é cultivada comercialmente (OLIVEIRA et al., 2008). No País, o número de biofábricas

(empresas que produzem e comercializam mudas propagadas *in vitro*) dedicadas à produção de mudas de bananeira vem crescendo a cada ano, e atualmente já representa 91,7% a mais do que no ano de 2008 (CARVALHO et al., 2012).

Entretanto, a grande limitação da produção em larga escala e do uso de mudas de bananeira propagadas *in vitro* ainda é o custo elevado, especialmente em países em desenvolvimento (GITONGA et al., 2010), apesar das vantagens oferecidas por esse tipo de material de propagação (VORA, JASRAI, 2012a). Sendo assim, ultimamente, as empresas envolvidas na produção comercial de mudas micropropagadas de bananeira têm direcionado suas ações de pesquisa para a redução dos custos de produção, mas que ao mesmo tempo melhorem a qualidade das mudas (WU et al., 2005).

A técnica de produção de mudas propagadas *in vitro* de bananeira tem início a partir de uma rigorosa seleção de plantas matrizes, seguida das fases de estabelecimento, multiplicação e alongamento/enraizamento. As plantas obtidas no final desse processo são submetidas à aclimatização em casa de vegetação ou telado (COSTA et al., 2008b).

A fase de alongamento e enraizamento *in vitro* é fundamental para a produção de mudas micropropagadas, já que a obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme é requisito básico para que elevadas taxas de sobrevivência

das mudas sejam alcançadas durante a fase de aclimatização (COSTA et al., 2008b). Entretanto, poucos são os estudos sobre o alongamento e enraizamento *in vitro* de mudas de bananeira. Essa etapa da micropropagação influencia diretamente no desempenho delas nas fases de aclimatização e plantio em condições de campo (CAMOLESI et al., 2010a).

Segundo Vora e Jasrai (2012b), o meio de cultura mais empregado na produção *in vitro* de mudas de bananeira é o MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962). Em levantamento realizado com trabalhos publicados nos últimos 5 anos com ênfase na fase de alongamento e enraizamento *in vitro* dessa cultura, verifica-se que a maioria emprega a concentração normal recomendada. Poucos são os estudos que utilizam metade da concentração dos macro e micronutrientes ou que comparam concentrações do meio MS (Tabela 1).

Além da concentração dos nutrientes do meio MS, outro aspecto importante é a sua consistência. A maioria dos trabalhos publicados nos últimos 5 anos emprega o meio MS na forma semissólida, na produção de mudas micropropagadas de bananeira. Escassos são os trabalhos que fazem uso de meio MS líquido, isto é, sem a adição de agente gelificante (Tabela 1).

A utilização de meios de cultura líquidos tem proporcionado alta eficiência para produção de mudas micropropagadas de bananeira (MARQUES et al. 2009; CAMOLESI et al., 2010a,b; GITONGA et al., 2010; ALI et al., 2011; ANDRADE et al., 2011). A facilidade no preparo, na manipulação e no uso de menor quantidade de meio de cultura por explante tem despertado o interesse dos pesquisadores em trabalhar com esse sistema. O emprego de meio de cultura líquido visa minimizar o uso do agente gelificante na sua composição, uma vez que esta substância é considerada o componente de maior valor, representando, em média, 70% dos custos com meio de cultura (PEIXOTO; PASQUAL, 1995). Além disso, o meio líquido possui vantagens de utilização em relação ao meio semissólido por dispensar prévio aquecimento para diluição do agente de solidificação, ser facilmente distribuído nos frascos de cultivo, independentemente da temperatura, e eliminar a necessidade de posicionamento de cada explante, dentro do recipiente (CAMOLESI et al., 2010b).

A adição de ágar ao meio de cultura, além de aumentar o custo de produção das mudas, pode contribuir também para o aumento da oxidação dos explantes, sendo esse efeito associado à qualidade e à quantidade utilizada do agente gelificante (OLIVEIRA, 2010). George (2008) acrescenta que, no meio líquido, os metabólitos tóxicos exsudados pelos explantes não se acumulam nas regiões circunvizinhas dos tecidos, sendo dispersos ou diluídos no volume de meio líquido disponível. Entretanto, o mesmo autor enfatiza que o uso de meio de cultura líquido estacionário apresenta limitações, em função de problemas com a aeração, sendo recomendado seu emprego em pequenos volumes, de modo que o meio forme camadas rasas. Os explantes a serem utilizados nesse sistema devem apresentar tamanho adequado, de forma que parte do tecido vegetal, em especial a parte aérea, não fique submersa no meio de cultura.

Debergh (1982) observou que, quanto maior a área de contato do explante com o meio de cultura, maior será a absorção dos seus compostos e, em consequência, maior também será a taxa de crescimento das culturas. Além disso, durante a aclimatização, o uso de meio líquido reduz a mão de obra tanto para lavagem quanto para separação das mudas, pois não há necessidade da retirada do ágar aderido, principalmente às raízes das plantas.

Em relação ao tipo e volume dos recipientes e à quantidade de meio de cultura usada por recipiente e por explante, na produção de mudas micropropagadas de bananeira, verifica-se que apenas alguns estudos apresentam no item "Material e Métodos" essas informações. Na maioria dos artigos onde esses detalhes são mencionados, os frascos são de vidro e a sua capacidade varia de 100 mL a 500 mL, sendo também relatado o uso de tubos de ensaio de 25 mm x 150 mm (Tabela 1).

Quanto à quantidade de meio de cultura usada por recipiente, as informações são variadas, sendo citadas desde 30,0 mL para frascos de 100 mL até 60,0 mL para frascos de 500 mL e, para tubos de ensaio, quantidades de 20 mL (Tabela 1). Quanto às quantidades de meio de cultura usadas por explante, os valores oscilam de 6,0 mL até 50,0 mL (Tabela 1).

Tabela 1. Informações em relação a cultivar estudada, concentração de macro e micronutrientes e consistência do meio de cultura MS, volume do frasco de cultivo e quantidade de meio de cultura por frasco e volume de meio de cultura por explante, em protocolos de micropropagação de bananeira, com ênfase na fase de alongamento e enraizamento.

Cultivar de banana	Concentração do meio de cultura MS (%)	Consistência do meio de cultura MS	Volume do frasco de cultivo (mL)	Volume de meio de cultura por frasco (mL)	Relação volume de meio de cultura por explante	Referência
Preciosa	100	semissólido	250,0	40,0	8,0	Costa et al., 2008a
Caipira, Japira e Preciosa	50	semissólido	250,0	40,0	10,0	Costa et al., 2008b
Prata Anã	100	semissólido	250,0	30,0	30,0	Lédo et al., 2008
Japira, Maravilha, Pacovan Ken e Preciosa	100	semissólido	250,0	30,0	6,0	Oliveira et al., 2008
Bari Banana-I	100	semissólido	tubo de ensaio	20,0	20,0	Al-Amin et al., 2009
FHIA-02, Japira, Maravilha, Pacovan Ken e Preciosa	100	semissólido	250,0	40,0	-	Oliveira, 2009
Grand Naine e Prata Anã	100	semissólido e líquido	-	-	-	Marques et al., 2009
Apantu e Oniba	100	semissólido	100,0	50,0	50,0	Buah et al., 2010
Maçã, Nanicao Grande Naine e Nanicao Jangada	50	semissólido e líquido	250,0	40,0	6,7	Camolesi et al., 2010a
Maçã	50	líquido	250,0 e 500,0	40,0 e 60,0	-	Camolesi et al., 2010b
Grande Naine	100	semissólido	-	-	-	Chavan-Patil et al., 2010
Muunju	100	semissólido e líquido	-	-	-	Gitonga et al., 2010
Dwarf Cavendish	100	semissólido	-	-	-	Kaçar et al., 2010
Bucaneiro, Caipira, BRS Caprichosa, Fhia 18, BRS Garantida, Japira, Pacovan Ken, PA 4244, Preciosa, PV 03-76, Thap Maeo e Tropical	100 e 50	semissólido	300,0	40,0	13,0	Oliveira, 2010
Malbhog	100	semissólido	250,0	50,0	50,0	Roy et al., 2010
Berangan, Berangan Intan e Rastali	100	semissólido	100,0	30,0	10,0	Shirani et al., 2010
FHIA-01 e Prata-Anã	100	semissólido	tubo de ensaio	10,0	10,0	Souza et al., 2010
Genótipos locais	100	semissólido e líquido	-	-	-	Ali et al., 2011
Grande Naine e Prata-Anã	50	semissólido e líquido	-	-	-	Andrade et al., 2011
Berangan	100	semissólido	-	-	-	Jafari et al., 2011
Caipira, BRS Caprichosa, Pacovan Ken, Preciosa, PV 03-76 e Thap Maeo	100	semissólido	-	40,0	8,0	Oliveira et al., 2011
Chingan, Green Red, Nendran, Njalipoovan, Palayankodan e Robusta	100	semissólido	-	-	-	Resmi ; Nair, 2011
(1)	100	semissólido	-	-	-	Singh et al., 2011
Rasthali	50	semissólido	-	-	30,0	Govindaraju et al., 2012
Kluai Hin	100	semissólido	330,0	30,0	30,0	Kanchanapoom, Promsorn, 2012
Malbhog	50	semissólido	-	-	-	Kumar et al., 2012
Grand Naine	100	semissólido	-	-	-	Nomura et al., 2012
Thap Maeo	100	semissólido	-	-	-	Pereira, 2012
Maçã	100	semissólido	Tubo de ensaio	20,0	20,0	Ribeiro et al., 2012
Kabula, Mbwazirume, Mpologoma, Musakala, Nakabululu, Nakinyika e Nfuuka	100	semissólido	-	30,0	15,0	Sadik et al., 2012
Pisang Awak, Pisang Berangan, Pisang Mas e Pisang Nangka	100	semissólido	175,0	50,0	12,5	Sipen; Davey, 2012
Grand Naine	50	semissólido	-	40,0	8,0	Vora; Jasrai, 2012a,b
Grande Naine	100	semissólido	200,0	30,0	-	Asmar et al., 2013

(1) Informação que não conta no trabalho.

Objetivo

O objetivo desta publicação é fornecer informações sobre as condições ideais do meio de cultura, em relação à consistência e quantidade, para a fase de alongamento e enraizamento *in vitro* de mudas de bananeira cv. Williams, em potes de plástico, visando reduzir o custo de produção final da muda.

Metodologia

O estabelecimento *in vitro* foi efetuado com brotações que apresentaram parte aérea desenvolvida contendo três folhas em média, altura de aproximadamente 2,0 cm a 2,5 cm e sem raízes (Figura 2). Essas brotações foram obtidas a partir do estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares, isolados de rizomas de bananeira da cultivar Williams, e posteriormente subcultivadas em meio de cultura MS adicionado de 2,5 mg L⁻¹ (correspondente a 11,1 μM) de BAP (6-benzilaminopurina), por 6 subcultivos sucessivos, de 30 dias cada um.

Foto: Natália de Oliveira Pereira



Figura 2. Brotações de bananeira cv. Williams, com parte aérea desenvolvida contendo em média três folhas, altura de aproximadamente 2,0 cm a 2,5 cm e sem raízes. Barra tamanho: 1,0 cm. Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Tabela 2), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 5,8, sem a adição de fitorregulador e sem a presença do ágar, exceto para o tratamento controle, e esterilizado em autoclave a 1 atm/121 °C, por 15 minutos.

Tabela 2. Componentes do meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), utilizado para a produção de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.

Componente	Concentração final (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,200
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,250
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,850
Piridoxina HCl	0,500
Ácido nicotínico	0,500
Glicina	2,000
Tiamina HCl	0,100
Mioinositol	100
Sacarose	30.000

Foram utilizados como recipientes potes de polipropileno (plástico transparente) com diâmetro de 10,1 cm, altura de 8,0 cm e capacidade de 396 mL, vedado com tampa de encaixe também de polipropileno (Figura 3).

Foto: Natália de Oliveira Pereira



Figura 3. Pote de polipropileno (plástico transparente) com diâmetro de 10,1 cm, altura de 8,0 cm e capacidade de 396 mL, vedado com tampa de encaixe também de polipropileno. Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

Esse tipo de recipiente foi escolhido em função dos resultados obtidos no trabalho de Araújo (2009), no qual as mudas alongadas e enraizadas no recipiente de plástico apresentaram desenvolvimento superior, quando comparadas àquelas mantidas nos recipientes de vidro. Os tratamentos consistiram de diferentes volumes de meio de cultura MS líquido: 25,0 mL, 35,0 mL, 45,0 mL, 55,0 mL e 65,0 mL, com dez explantes por recipiente. Para o tratamento controle (testemunha), utilizou-se o mesmo tipo de recipiente contendo 65,0 mL de meio de cultura solidificado com 4,0 g L⁻¹ de ágar gel.

A inoculação dos explantes foi efetuada em capela de fluxo laminar, sob condições assépticas, e posteriormente, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 1°C, fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, as mudas foram retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para a retirada do meio de cultura aderido, principalmente às raízes das mudas do tratamento controle, no qual o meio utilizado foi semissólido. Após a lavagem, elas foram avaliadas quanto à altura da muda (AM) – distância entre o colo até a inserção da folha mais nova; número de folhas (NF) – número de folhas totalmente expandidas e contendo mais da metade do limbo com a coloração verde; diâmetro do pseudocaule (DP) – medido no colo da planta; comprimento da maior raiz (CMR) e massa fresca da planta (MFP).

Resultados

Com base na análise de variância, houve significância para todas as características avaliadas (Tabela 3).

Observou-se que, para a AM, os maiores valores (3,44 cm) foram registrados no meio líquido contendo volumes de 45,0 mL e 55,0 mL, diferindo estatisticamente do tamanho das mudas desenvolvidas no meio semissólido (testemunha). As culturas, mantidas no volume de 25,0 mL, apresentaram altura média de 2,76 cm, sugerindo que essa quantidade de meio de cultura pode ter sido limitante para o alongamento adequado das mudas. O procedimento padrão (controle) não diferiu dos demais tratamentos, indicando que, para essa fase da micropropagação, as mudas de bananeira Williams apresentaram a mesma altura média, independentemente da consistência e do volume do meio de cultura estudados (25,0 mL; 35,0 mL e 65,0 mL). Embora não tenham diferido estatisticamente, observou-se que as mudas submetidas ao mesmo volume de meio de cultura (65,0 mL) e aquelas mantidas no meio semissólido apresentaram valores de altura (2,87 cm) inferiores aos das mudas desenvolvidas no meio líquido (3,13 cm). Camolesi et al. (2010a) também registraram melhor desempenho das mudas da cultivar Maçã em meio líquido quando comparado ao meio semissólido. Os biorreatores, equipamentos que fazem uso de meio líquido, resultam em maior crescimento e multiplicação das plantas do que no cultivo em meio semissólido

Tabela 3. Comparação de médias dos tratamentos e da testemunha (com ágar) para as variáveis altura da muda (AM), número de folhas (NF), diâmetro do pseudocaule (DP), comprimento da maior raiz (CMR) e massa fresca da planta (MFP), de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams alongadas e enraizadas em frascos de plástico utilizando diferentes volumes de meio de cultura. Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

Tratamento	Características avaliadas				
	AM (cm)	NF	DP (cm)	CMR (cm)	MFP (g)
25,0 mL	2,76 ^{ns}	4,11 [*]	0,48 [*]	9,36 ^{ns}	1,60 ^{ns}
35,0 mL	3,22 ^{ns}	4,09 [*]	0,51 [*]	11,82 [*]	1,78 ^{ns}
45,0 mL	3,44 [*]	3,95 [*]	0,59 [*]	11,24 [*]	2,38 [*]
55,0 mL	3,44 [*]	3,34 ^{ns}	0,42 [*]	8,99 ^{ns}	2,43 [*]
65,0 mL	3,13 ^{ns}	3,32 ^{ns}	0,58 [*]	9,14 ^{ns}	2,68 [*]
Testemunha	2,87	2,90	0,29	8,54	1,91
CV (%)	12,2	13,7	13,8	19,6	13,7

^{ns} Médias seguidas de ns nas colunas não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de significância.

^{*} Médias seguidas de * nas colunas diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de significância.

(RIBEIRO; BASTOS, 2008). Uma das razões do melhor desempenho das mudas é que a concentração de oxigênio dissolvido no meio líquido está diretamente relacionada com a taxa de crescimento das células e/ou dos tecidos no meio nutritivo. Provavelmente a concentração de oxigênio dissolvido no meio foi um dos fatores que contribuiu para o melhor desempenho das mudas desenvolvidas no meio de cultura líquido, em especial nos volumes de 45,0 mL e 55,0 mL (3,44 cm). Já no volume de 65,0 mL, a redução da AM (3,13 cm) pode ter sido ocasionada pelo fato de que, quanto maior a profundidade da coluna de líquido, menor o balanço de oxigênio dissolvido. Entretanto, embora a AM tenha sido reduzida (3,13 cm), quando foi empregado o maior volume testado de meio líquido (65 mL), esse valor foi maior do que o da muda desenvolvida no mesmo volume de meio semissólido (2,87 cm).

A obtenção de melhores resultados em meio líquido também pode ser explicada pelo fato de que altas concentrações de ágar podem limitar a difusão de nutrientes até o explante (ROMBERGER; TABOR, 1971). Além disso, o meio de cultura sem a adição de ágar permite maior absorção de água pelos tecidos (WILLIAMS; LEOPOLD, 1989).

Marques et al. (2009), testando doses de ágar na produção in vitro de mudas das cultivares de bananeira Grand Naine e Prata Anã, evidenciaram maior altura das mudas desenvolvidas em meio líquido do que aquelas desenvolvidas em meio contendo ágar.

As mudas desenvolvidas no meio líquido contendo volumes de 25,0 mL a 45,0 mL apresentaram número de folhas por planta (NF) superior (3,95 a 4,11) ao das plantas mantidas no meio semissólido, com média de apenas 2,90.

Os resultados diferem dos apresentados por Camolesi et al. (2010a), que observaram que as mudas desenvolvidas no meio semissólido apresentaram maior NF, isto é, no meio líquido, essa característica apresentou tendência de redução para as três cultivares de bananeiras testadas: Maçã, Nanicao Grande Naine e Nanicao Jangada.

Em relação ao diâmetro do pseudocaule (DP), constatou-se que os menores valores foram

registrados nas mudas desenvolvidas em meio semissólido. O DP das mudas alongadas e enraizadas em meio líquido variaram de 0,42 cm a 0,59 cm, contra apenas 0,29 cm das plantas desenvolvidas em meio semissólido, indicando que o meio líquido promoveu maior espessamento da região do colo, resultando em mudas mais vigorosas (Figura 4).



Foto: Natália de Oliveira Pereira

Figura 4. Mudanças de bananeira cv. Williams desenvolvidas (alongadas e enraizadas) em recipiente de plástico, contendo 45,0 mL de meio de cultura MS líquido (mudas do lado direito) e 65,0 mL de meio de cultura MS semissólido (mudas do lado esquerdo), aos 30 dias de cultivo in vitro. Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

De uma forma geral, as mudas alongadas e enraizadas no meio líquido apresentaram comprimento da maior raiz (CMR) superior ao das mudas desenvolvidas no meio semissólido. O tratamento controle diferiu significativamente dos volumes de 35,0 mL e 45,0 mL de meio líquido, para o teste de Dunnett (Tabela 3).

As mudas das cultivares de bananeira Nanicao Jangada, Nanicao Grande Naine e Maçã enraizadas em meio líquido apresentaram ligeira superioridade (7,6%) em termos de número de raízes quando comparadas às enraizadas em meio semissólido (CAMOLESI et al., 2010a). Entretanto, de um modo geral, Camolesi et al. (2010a) constataram que as mudas enraizadas em meio semissólido apresentaram maior crescimento radicular do que as enraizadas em meio líquido. Esses autores registraram redução de 16,6% no CMR quando as mudas foram enraizadas em meio líquido. Marques et al. (2009) não observaram diferença estatística

tanto para o comprimento quanto para o número de raízes das cultivares Grand Naine e Prata-Anã, em relação à consistência do meio de cultura.

A obtenção de melhores resultados em meio líquido pode ser explicada pelo fato de que altas concentrações de ágar ou meios muito consistentes limitam a difusão de nutrientes até o explante (ROMBERGER; TABOR, 1971). Além disso, os meios líquidos são mais homogêneos, uma vez os gradientes de nutrientes estabelecidos são normalmente menores do que os que ocorrem nos meios sólidos. Além disso, a ausência de ágar ou a sua utilização em baixas concentrações está relacionada ao potencial osmótico. Dessa forma, o aumento da concentração de ágar promove a elevação do potencial osmótico do meio de cultura, dificultando a difusão dos nutrientes para o explante (ROMBERGER; TABOR, 1971).

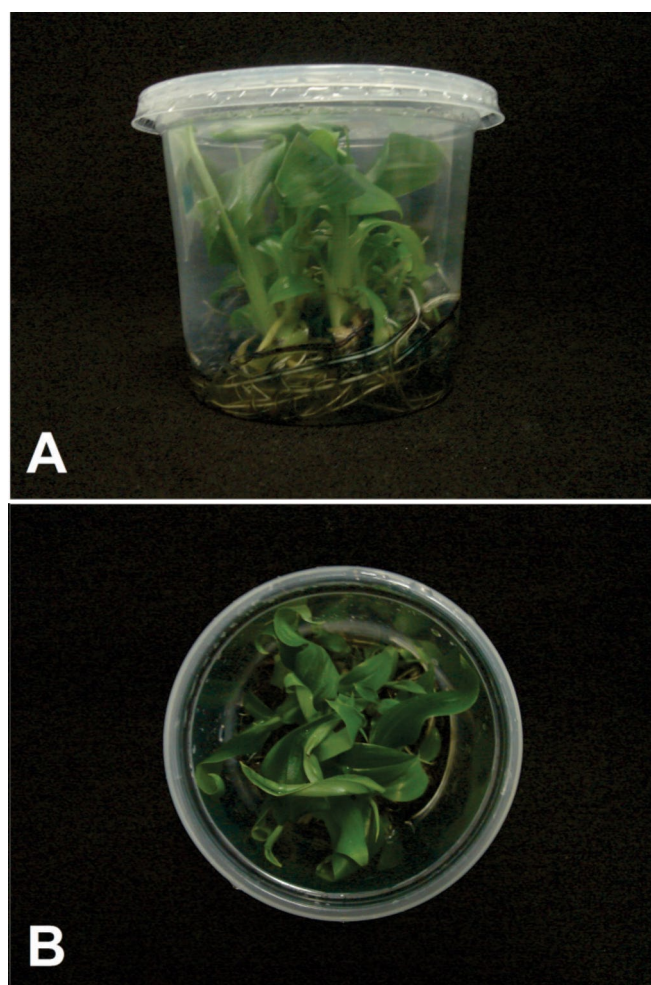
As mudas crescidas no meio semissólido apresentaram massa fresca da planta (MFP) muito inferior (1,91 g) do que das mudas submetidas ao meio líquido nos volumes de 45,0 mL (2,38 g) a 65,0 mL (2,68 g). Embora não tenha sido registrada diferença significativa de MFP entre as mudas crescidas no meio líquido, nos volumes de 45,0 mL a 65,0 mL, constatou-se que os valores para essa característica apresentaram tendência de aumento de acordo com a maior disponibilidade de meio de cultura. Williams e Leopold (1989) enfatizam que o meio de cultura sem a adição de ágar permite maior absorção de água pelos tecidos, justificando possivelmente os valores mais altos de MFP nas mudas mantidas nos maiores volumes de meio líquido.

Tendo como base os resultados obtidos, pôde-se inferir que o uso do ágar, especialmente em altas concentrações, como agente solidificante do meio semissólido pode interferir nos processos de absorção e de translocação de íons (WILLIAMS, 1993), constituindo um fator limitante no crescimento das mudas.

Andrade et al. (2011) avaliaram a produção de mudas micropropagadas de bananeira em diferentes concentrações de ágar no meio de cultura, concluindo que não há necessidade de uso de ágar na composição do meio de cultura para o enraizamento de mudas de bananeira das cultivares Grande Naine e Prata-Anã.

O uso de meio líquido na fase de alongamento e enraizamento, como foi estudado no presente trabalho, tem outras vantagens adicionais, como maior facilidade para retirar as mudas do meio de cultura por ocasião da transferência dessas mudas para a casa de vegetação, onde serão aclimatizadas (TEIXEIRA et al., 2001), bem como a redução no tempo de lavagem dos frascos de cultivo e da vidraria utilizada para o preparo do meio de cultura.

Com base nos resultados obtidos para AM, NF, DP, CMR e MFP, é possível substituir o meio semissólido pelo meio líquido. Além disso, a quantidade de meio utilizado por frasco, contendo 10 brotações, pode ser reduzida de 65,0 mL para 45,0 mL (Figura 5), sem que haja comprometimento no desenvolvimento das mudas de bananeira cv. Williams (Figura 6). Esse procedimento traz uma significativa redução no custo de produção.



Fotos: Natália de Oliveira Pereira

Figura 5. Mudanças de bananeira cv. Williams alongadas e enraizadas em recipiente de plástico, contendo 45,0 mL de meio de cultura MS líquido, aos 30 dias de cultivo in vitro. Vista lateral (A) e superior (B). Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

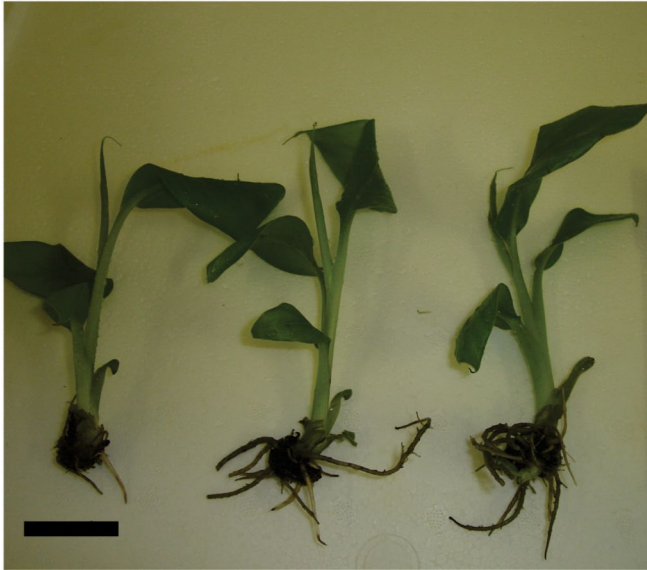


Figura 6. Mudanças de bananeira cv. Williams desenvolvidas (alongadas e enraizadas) em recipiente de plástico, contendo 45,0 mL de meio de cultura MS líquido, aos 30 dias de cultivo in vitro. Barra tamanho: 1,0 cm. Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

Sendo assim, considerando a fase de alongamento e enraizamento in vitro de mil mudas de bananeira cv. Williams, no sistema in vitro convencional, seriam necessários 6,5 litros de meio de cultura MS solidificado com 4,0 g L⁻¹ de ágar gel. Para a produção dessa mesma quantidade de mudas, no sistema proposto, seriam empregados apenas 4,5 litros de meio de cultura MS líquido. Um litro de meio de cultura MS, sem a adição de ágar, custa em média R\$ 1,14 e, com adição de 4,0 g de ágar gel, em média R\$ 3,06 (cálculo efetuado tendo-se como base o preço médio para cada componente do meio de cultura, recebido de três empresas). Dessa forma, no sistema convencional in vitro, o custo aproximado seria de R\$ 19,89, enquanto, no sistema proposto, o custo total seria de R\$ 5,13, representando uma economia de R\$ 14,76 a cada mil mudas, resultando numa redução de 74,2% dos custos de produção na fase de alongamento e enraizamento in vitro.

Conclusões

Não há necessidade da adição de ágar na composição do meio de cultura para o alongamento e enraizamento de mudas de bananeira da cultivar Williams.

Recomenda-se o uso de 45,0 mL de meio de cultura MS líquido, quando as mudas forem

alongadas e enraizadas em potes de plástico (capacidade de 400 mL), utilizando-se dez mudas por recipiente.

As mudas desenvolvidas no sistema recomendado, isto é, em 45,0 mL de meio líquido, exibem melhor desempenho do que as alongadas e enraizadas no sistema convencional, isto é, em 65,0 mL de meio semissólido, apresentando aumentos de 19,9% na altura, 24,6% na massa fresca, 31,6% no comprimento da maior raiz, 36,2% no número de folhas e 103,5% no diâmetro do pseudocaule da muda. Além do desenvolvimento superior das mudas, o sistema recomendado representa uma redução de 74,2% dos custos de produção com meio de cultura, na fase de alongamento e enraizamento in vitro.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Euvaldo Lodi e à BioClone Produção de Mudanças S.A., pela concessão de bolsa de estágio.

Referências

- AL-AMIN, M. D.; KARIM, M. R.; AMIN, M. R.; RAHMAN, S.; MAMUN, A. N. M. In vitro micropropagation of banana (*Musa* spp.). **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, Bangladesh, v. 34, n. 4, p. 645-659, 2009.
- ALI, A.; SAJID, A.; NAVEED, N. H.; MAJID, A.; SALEEM, A.; KHAN, U. A.; JAFERY, F. I.; NAZ, S. Initiation, proliferation and development of micro-propagation system for mass scale production of banana through meristem culture. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 70, p. 15731-15738, 2011.
- ANDRADE, R. A.; MARQUES, T. F.; JASPER, S. P.; DAMATTO JÚNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Micropropagação de mudas de bananeira em meio líquido. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v. 2, n. 3, p. 156-159, 2011.
- ARAÚJO, J. D. M. **Técnicas alternativas para redução de custos na produção de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams**. 2009. 60 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- ASMAR, S. A.; PASQUAL, M.; ARAUJO, M. A. G.; SILVA, R. A. L.; RODRIGUES, F. A. PIO, L. A. S. Características morfofisiológicas de bananeiras 'Grande Naine' aclimatizadas em resposta a utilização de silício in vitro. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 73-82, 2013.

BUAH, J. N.; DANSO, E.; TAAH, K. J.; ABOLE, E. A.; BEDIKO, E. A.; ASIEDU, J.; BAIDOO, R. The effects of

- different concentrations cytokinins on the in vitro multiplication of plantain (*Musa sp.*). **Biotechnology**, Pakistan, v. 9, n. 3, p. 343-347, 2010.
- CAMOLESI, M. R.; MARTINS, A. N.; SOUZA, L. D.; SACONI, C. G. Enraizamento in vitro de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa sp.*) em diferentes meios de cultivo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1446-1451, 2010a.
- CAMOLESI, M. R.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J.; MARTINS, A. N. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação in vitro da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n. 2, p. 255-260, 2010b.
- CARVALHO, A. C. P. P. de; RODRIGUES, A. A. de J.; SANTOS, E. de O.; **Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. 42 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 157).
- CHAVAN-PATIL, V. B.; AREKAR, C. D.; GAIKWAD, D. K. Field performance of in vitro propagated banana plants from 8th and 15th subculture. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 1, n. 2, p. 96-103, 2010.
- COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; SANTOS, A. M. dos; CASTRO, R. M. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Modificações na anatomia foliar de bananeiras durante o processo de micropropagação. **Interciência**, Caracas, v. 33, n. 9, p. 663-667, 2008a.
- COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; RODRIGUES, F. A.; MIYATA, L. Y. Relação entre o tempo de enraizamento in vitro e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 31-37, 2008b.
- DEBERGH, P. C. Physical properties of culture media. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 5., 1982, Tokio. **Proceedings...** Tokio, 1982. p. 135-136. Editado por Akio Fujiwara.
- ECHEVERRI-LOPEZ, M.; GARCIA-REIS, E. Influencia de la classe de material de siembra sobre la producción de plátano. In: RUIZ CAMACHO, R. (Org.). **Manual para el cultivo del banano y plátano**. Bogotá: [s. n.], 1977. p. 136-148.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. N. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- FAOSTAT. **The Statistics Division of the FAO**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>>. Acesso em: 23 set. 2013.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrech: Springer, 2008. 501 p.
- GITONGA, N. M.; OMBORI, O.; MURITHI, K. S. D.; NGUGI, M. Low technology tissue culture materials for initiation and multiplication of banana plants. **African Crop Science Journal**, Kampala, v. 18, n. 4, p. 243-251, 2010.
- GOVINDARAJU, S.; SARAVANAN, J.; JAYANTHI, B.; NANCY, D.; INDRA, A. P. In vitro propagation of Banana (*Musa sp.* - Rasthali variety) from sword suckers for its commercial production. **Research in Plant Biology**, Índia, v. 2. n. 5, p. 1-6, 2012.
- JAFARI, N.; OTHMAN, R. Y.; KHALID, N. Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on in vitro shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2446-2450, 2011.
- KAÇAR, Y. A.; BIÇEN, B.; VAROL, I.; MENDI, Y. Y.; SERÇE, S.; ÇETINER, S. Gelling agents and culture vessels affect in vitro multiplication of banana plantlets. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 416-424, 2010.
- KANCHANAPOOM, K.; PROMSORN, N. Micropropagation and in vitro germplasm conservation of endangered *Musa balbisiana* 'Kluai Hin' (BBB group). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 24, p. 6464-6469, 2012.
- KUMAR, A.; KUMARI, P.; SHUKLA, L. N. In vitro rooting in the tissue culture raised plantlets of Malbhog cultivar of banana. **Indian Journals of Innovations and Development**, v. 1, n. 9, p. 665-668, 2012.
- LÉDO, A. S.; OLIVEIRA, L. F. M.; MACHADO, C. A.; FREIRE, K. C. S. **Aclimação de mudas de bananeira 'Prata-anã' regeneradas em diferentes condições de cultivo in vitro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2008. 19 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 37).
- MANICA, I.; **Fruticultura: 4. Banana**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 485 p. (II. Fruticultura Tropical).
- MARQUES, T. F.; ANDRADE, R. A.; SILVA S. H. M. G.; DAMATTO JUNIOR, E. R. **Enraizamento de mudas de bananeira micropropagadas**. Registro: UNESP- Câmpus Experimental – Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira, 2009. p. 7430-7433.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NOMURA, E. S.; DAMATTO JÚNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; SAES, L. A.; JENSEN, E. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira 'Grande Nine' com aplicação de biofertilizantes em duas estações do ano. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 518-529, 2012.
- OLIVEIRA, J. P.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINKI-PEREIRA, J. E. Micropropagación y estimativa de producción de mudas de bananos para la Amazonia Occidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.43, n.10, p.1429-1432, 2008.
- OLIVEIRA, H. S.; LEMOS, O. F.; MIRANDA, V. S.; MOURA, H. C. P.; CAMPELO, M. F.; SANTOS, L. R. R. Estabelecimento e multiplicação in vitro de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa spp.*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 369-376, 2011.
- OLIVEIRA, J. P. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Influência genotípica e clonal de genótipos de bananeiras micropropagadas a partir gemas florais masculinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. especial, p. 558-563, 2011.

- OLIVEIRA, H. S. **Comportamento de cultivares de bananeira (*Musa* spp.) resistentes a doenças no processo de micropropagação**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.
- OLIVEIRA, J. P. **Produção de mudas in vitro e ocorrência de microrganismos endofíticos em bananeiras da Amazônia Sul-Ocidental**. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Produção Vegetal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco.
- PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, v.42, p.432-443, 1995.
- PEREIRA, G. A. **Protocolo para micropropagação de bananeira 'Thap Maeo'**. 2012. 121 f. Tese (Doutorado em Sistemas de Produção) – UNESP, Ilha Solteira.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ, J. B.; ROSELL-GARCÍA, P. Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. 'Dwarf Cavendish') male flowers. **Plant Cell Report**, v. 27, p. 965-971, 2008.
- RESMI, L.; NAIR, A. S. Differential effect of cytokinins in the micropropagation of diploid and triploid *Musa* cultivars. **International Journal of Integrative Biology**, v. 11, n. 1, p. 35-38, 2011.
- RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2008. 26 p. (Embrapa Semiárido. Documentos, 214).
- RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F.; COELHO, A. K. N. S.; PINTO, M. S. T. Efeito do melado de cana-de-açúcar no desenvolvimento in vitro de bananeira (*Musa* spp.) cv. Maçã. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.3, p. 293-298, 2012.
- ROMBERGER, J. A.; TABOR, C. A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**, v. 58, p. 131-140, 1971.
- ROY, O. S.; BANTAWA, P.; GHOSH, S. K.; SILVA, J. A. T.; DEBGHOSH, P.; MONDAL, T. K. Micropropagation and field performance of 'Malbhog' (*Musa paradisiaca*, AAB group): a popular banana cultivar with high keeping quality of North East India. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 52-58, 2010.
- SADIK, K.; ARINAITWE, G.; SSEBULIBA, J. M.; GIBSON, P.; LUGOLOBI, C.; MUKASA, S. B. Proliferation and shoot recovery among the East African Highland banana. **African Crop Science Journal**, Uganda, v. 20, n. 1, p. 67-76, 2012.
- SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; SOUZA, F. V. D.; JUGHANS, T. G.; LINO, L. S. M.; SOARES, T. L.; SOUZA, E. H. Micropropagação da bananeira. In: JUGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 237-255.
- SHIRANI, S.; SARIAH, M.; ZAKARIA, W.; MAZIAH, M. Scalp induction rate responses to cytokinins on proliferating shoots-tips of banana cultivars (*Musa* spp.). **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 128-134, 2010.
- SILVA, S. de O. Cultivares de banana para exportação. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 30-38. (Frutas do Brasil, 1).
- SILVA, S. O.; PASSOS, A. R.; DONATO, S. L. R.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V.; LIMA NETO, F. P.; LIMA, M. B. Avaliação de genótipos de bananeira em diferentes ambientes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 737-748, 2003.
- SINGH, H. P.; UMA, S.; SELVARAJAN, R.; KARIHALOO, J. L. **Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific**. Índia : APCoAB, APARI, 2011. 94 p.
- SIPEN, P.; DAVEY, M. R. Effects of n6-benzylaminopurine and indole acetic acid on in vitro shoot multiplication, nodule-like meristem proliferation and plant regeneration of malaysian bananas (*Musa* spp.). **Tropical Life Sciences Research**, v. 23, n. 2, p. 67-80, 2012.
- SOUZA, D. S.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R.; SANTOS, D. Micropropagação das bananeiras 'Prata-Anã' e 'FHIA 01' a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 561-570, 2010.
- TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 3, p. 42-47, 2001.
- VORA, N. C.; JASRAI, Y. T. Microwave oven based sterilization of media for micropropagation of banana. **Cibtech Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 2/3, p. 18-21, 2012a.
- VORA, N. C.; JASRAI, Y. T. Natural and low-cost substitutes of synthetic pgr for micropropagation of banana. **CIBTech Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 9 -13, 2012b.
- VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of in vitro propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture, Surrey**, v. 62, p. 323-328, 1985.
- WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition "in vitro": a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 41, p.237-251, 1993.
- WILLIAMS, R. J.; LEOPOLD, A. C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, v. 89, p. 977-981, 1989.
- WU, Y.; YI, G.; YANG, H.; ZHOU, B.; ZENG, J. Basal medium with modified nitrogen source and other factors influence the rooting of banana. **HortScience**, v. 40, n. 2, p. 428-430, 2005.

Patrocínio:



Apoio:



Circular Técnica, 44

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici
Fone: (0xx85) 3391-7100
Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7195
E-mail: www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição (2014): on-line

Comitê de Publicações

Presidente: Marlon Vagner Valentim Martins
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama

Membros: José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cássia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim e Fábio Rodrigues de Miranda.

Expediente

Revisão de texto: Marcos Antonio Nakayama
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira
Normalização bibliográfica: Rita de Cassia C. Cid