



**RAFAEL HANSEN MADAIL**

**DESCRITORES MORFOLÓGICOS E  
CONTEÚDO DE DNA NA CARACTERIZAÇÃO  
DE ACESSOS DE BANANEIRA**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**RAFAEL HANSEN MADAIL**

**DESCRITORES MORFOLÓGICOS E CONTEÚDO DE DNA NA  
CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE BANANEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

**Lavras – MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Madail, Rafael Hansen.

Descritores morfológicos e conteúdo de DNA na caracterização de acessos de bananeira / Rafael Hansen Madail. – Lavras : UFLA, 2011.

104 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. *Musa* sp. 2. Morfologia. 3. Citometria de fluxo. 4. Anatomia quantitativa. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.21044

**RAFAEL HANSEN MADAIL**

**DESCRITORES MORFOLÓGICOS E CONTEÚDO DE DNA NA  
CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE BANANEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 28/04/2011

Dr. Sebastião de Oliveira e Silva	PNVS /Capes / UFRB
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dra. Roselaine Cristina Pereira	UFLA
Dra. Ester Alice Ferreira	EPAMIG

Dr. Moacir Pasqual

**LAVRAS – MG**  
**2011**

*Aos meus pais, Pedro e Lorena, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e perseverança diante de todos os obstáculos que se apresentaram no curso do meu doutorado.

A minha família, por me ensinarem o significado do amor e da dignidade. Por compreenderem minha ausência e me apoiarem em todos os momentos.

A Universidade Federal de Lavras, pelo apoio na realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Moacir Pasqual, por ter apostado em minha capacidade profissional.

A minha co-orientadora, Dra. Leila Aparecida Salles Pio, pela amizade, pelos valiosos ensinamentos, pelo exemplo como profissional e pela convivência.

A todos os profissionais envolvidos neste trabalho, em especial aos técnicos do Laboratório de Cultura de Tecidos, Vantuil e Claret, pelo auxílio imprescindível na condução dos experimentos.

Aos colegas de Laboratório, pela agradável convivência e apoio sempre que preciso. Principalmente a Renata Alves Lara Silva e Ana Catarina de Oliveira pela companhia por horas seguidas na bancada de laboratório com seu bom humor e disposição.

Aos membros da banca, Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, Dr. Evaristo Mauro de Castro, Dra. Roselaine Cristina Pereira e Dra. Ester Alice Ferreira por suas valiosas contribuições.

Aos amigos, tanto de Lavras quanto do Sul, que sempre estiveram na torcida por esta conquista.

### RESUMO GERAL

A evolução das atuais cultivares de bananeira cultivadas ainda não é perfeitamente compreendida. Acreditamos que estas cultivares tiveram origem a partir de duas espécies distintas do gênero *Musa*: *M. acuminata* e *M. balbisiana*, com alguma contribuição de outras espécies. Ao longo de milhares de anos, evolução, cruzamentos, poliploidizações e isolamento geográfico criaram imensa variedade de materiais cultivados e selvagens de bananeira. Com o intuito de caracterizar acessos de bananeira oriundos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, bem como entender as relações de ploidia e grupos genômicos nas características destes acessos, foram realizadas avaliações morfológicas, anatômicas e quantificação do conteúdo de DNA. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e casa de vegetação do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Materiais vegetais de 14 acessos de bananeira provenientes da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram cultivados *in vitro* e posteriormente aclimatizados por 90 dias em casa de vegetação. Após este período foram avaliadas características morfológicas quantitativas e qualitativas em busca de descritores morfológicos. Foram coletadas amostras para avaliação do conteúdo de DNA por meio da técnica de citometria de fluxo, na qual material foliar foi triturado em tampão específico para liberação e manutenção de núcleos. Foram analisados 10 mil núcleos por amostra, com três repetições. Procedeu-se, também, a coleta de folhas jovens plenamente expandidas para avaliações anatômicas. O material coletado foi fixado em FAA e álcool 70%. Foram realizadas secções transversais e paradérmicas das faces abaxial e adaxial para verificação de parâmetros

anatômicos como espessura de limbo foliar e nervura central, espessura de epidermes e hipodermes inferiores e superiores e parênquimas paliçádico e lacunoso, além da densidade e tamanho de estômatos. Os resultados obtidos nas avaliações morfológicas não foram adequados para relacionar as características avaliadas com o nível de ploidia dos acessos ou grupos genômicos. Porém, pela avaliação das características morfológicas foi possível diferenciar os acessos ainda em estágio juvenil, o que é de grande utilidade para evitar prejuízos aos produtores e aos programas de melhoramento por seleção incorreta de material. As avaliações anatômicas mostraram boa relação dos parâmetros de comprimento e densidade estomática e espessura do limbo com a ploidia do material avaliado. A citometria de fluxo, por sua vez, apresentou alguma sobreposição de valores de conteúdo de DNA nos diferentes níveis de ploidia. Entretanto, a técnica foi capaz de separar os genomas A e B, sendo o genoma A 11% maior que o genoma B. Desta forma, a citometria de fluxo não deve ser utilizada isoladamente para a determinação da ploidia de acessos de bananeira, assim como as características morfológicas, apesar de identificarem os acessos, não permitem a sua separação por nível de ploidia. Entretanto, os parâmetros estomáticos e de espessura foliar apresentam uma boa relação com o nível de ploidia e são recomendados para avaliação de diferentes acessos de bananeira.

**Palavras-chave:** *Musa* sp. Caracterização. Morfologia. Anatomia quantitativa. Citometria de fluxo.

## GENERAL ABSTRACT

The evolution of current banana cultivars is not perfectly understood. It is believed that these cultivars have had their origin in two species of genus *Musa*: *M. acuminata* and *M. balbisiana*, with a little contribution of other species. By the course of thousands of years, evolution, crossings, polyploidizations and geographical isolation have created an immense variety of cultivated and wild bananas. The purpose of this study was to characterize banana accesses from Embrapa Mandioca e Fruticultura, as well as to understand the relation between ploidy level and genomic groups in the characteristics of these plants. To achieve that, morphological and anatomical characteristics were evaluated and DNA content was determined for the plant material. The experiments were performed at Plant Tissue Culture Laboratory and greenhouse from Agriculture Institute and Plant Anatomy Laboratory from Biology Institute of Universidade Federal de Lavras. Fourteen banana accesses from Embrapa Mandioca e Fruticultura were cultivated *in vitro* in MS medium for two generations and then transferred to greenhouse for acclimatization for 90 days. After this period, qualitative and quantitative morphological characteristics were evaluated. Quantitative traits included plant height, pseudostem diameter, number of leaves, length and width of leaf blades, while qualitative traits included leaves and pseudostem color, leaves orientation and presence of blots. Leaf samples were collected for DNA content estimation by flow cytometry methodology. Leaf material was crushed in specific buffer for nuclei liberation and conservation. Ten thousand nuclei were evaluated per sample with three repetitions. Young leaves were sampled and fixed in FAA and alcohol 70% for anatomical analysis. Transversal and longitudinal sections were made for the evaluation of anatomical parameters such as thickness of leaf and central vein,

thickness of upper and lower epidermis and hypodermis, thickness of palisade and spongy parenchyma and stomatal length and density. Results from morphological evaluation were not considered adequate in indicating a relation between ploidy level or genomic groups and morphological characteristics. However, the morphological evaluation enabled to differentiate the accesses still in the juvenile phase. This is very useful to avoid losses for producers or breeding programs due to wrong selection of plant material. Anatomical evaluation showed good relation with ploidy level in some parameters, such as stomatal length and density and leave thickness. In the other hand, flow cytometry showed a high overlapping between the values for different ploidy levels. However, the technique was capable of separating genome A and B. Genome A showed a size 11% larger than genome B. So, the flow cytometry is not suitable to be used solely in determining ploidy level in banana accesses. The morphological characteristics, despite the capacity of identifying the accesses, were not able characterizing the material according to ploidy level. However, stomatal parameters and leave thickness showed high relation with ploidy level and are recommended for evaluating different banana accesses.

**Keywords:** *Musa* sp. Characterization, Morphology, Quantitative anatomy, Flow Cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Diagrama representando os possíveis caminhos evolutivos das bananas comestíveis segundo Valmayor <i>et al.</i> (2000).....	25
FIGURA 1.2	Diagrama representando os possíveis caminhos evolutivos das bananas comestíveis segundo Simmonds e Shepherd (1955) .....	26
FIGURA 2	Fotomicrografias de acessos de bananeira com diferentes níveis de ploidia.....	69
FIGURA 3.1	Histogramas representando acessos diplóide (A), triplóide (B) e tetraplóide (C) de bananeira e o padrão de referência ( <i>Pisum sativum</i> ).....	95
FIGURA 3.2	Histograma representando o acesso Malbut.....	97

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1	Acessos de bananeira provenientes da Embrapa Mandioca e Fruticultura.....	48
TABELA 1.2	Características morfológicas de 12 acessos de bananeira provenientes do programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical micropropagadas após três meses de aclimatização.....	50
TABELA 2.1	Medidas da espessura ( $\mu\text{m}$ ) do limbo na região da nervura central e do quarto feixe vascular de diferentes acessos de bananeira.....	70
TABELA 2.2	Medidas de espessura ( $\mu\text{m}$ ) de alguns tecidos do limbo foliar de acessos de bananeira com diferentes níveis de ploidia.....	74
TABELA 2.3	Densidade estomática, diâmetro polar e equatorial das faces abaxial e adaxial de acessos de bananeira com diferentes níveis de ploidia.....	77
TABELA 3	Conteúdo de DNA nuclear estimado por citometria de fluxo para acessos de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical .....	94

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 2 Descritores Morfológicos para Caracterização de Acessos de Bananeira em Estádio Juvenil.....	41
1 RESUMO.....	42
2 ABSTRACT.....	44
3 INTRODUÇÃO.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS .....	57
CAPÍTULO 3 Caracterização da Anatomia Foliar de Acessos de Bananeira e sua Relação com o Nível de Ploidia e Grupos Genômicos.....	59
1 RESUMO.....	60
2 ABSTRACT.....	62
3 INTRODUÇÃO.....	63
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
6 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS .....	81
CAPÍTULO 4 Estimativa do Conteúdo de DNA de diferentes Acessos de Bananeira pela Técnica de Citometria de Fluxo.....	84
1 RESUMO.....	85
2 ABSTRACT .....	87

3	INTRODUÇÃO.....	88
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	93
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
6	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS .....	103

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

Durante milhares de anos a bananeira tem sido cultivada pelo homem, o que levou ao desenvolvimento de uma imensa quantidade de genótipos selvagens e cultivados que oferecem um potencial de exploração genética ainda desconhecido. Parte desta falta de conhecimento provém das complicadas relações evolutivas que conduziram ao estabelecimento das principais cultivares de bananeira em uso atualmente.

A cultura da bananeira apresenta elevado interesse econômico e social no mundo todo, pois configura-se como uma das mais importantes culturas tropicais. O Brasil é o quarto maior produtor mundial da fruta, tendo produzido 6.972.408 toneladas em 2007, em uma área colhida de 508.845 hectares (ANUÁRIO..., 2009). Os dois principais estados produtores brasileiros são Bahia, com 1.407.741 toneladas, e São Paulo, com 1.238.087 toneladas, em 2009 (ANUÁRIO..., 2010). Como pode ser observada, a produtividade nacional de banana é considerada baixa, o que se deve, entre outros fatores, ao baixo nível tecnológico adotado para o cultivo da bananeira.

O programa de melhoramento genético de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura vem conduzindo esforços na tentativa de obter cultivares resistentes às principais pragas e doenças com boas características agronômicas, uma vez que a maioria das cultivares existentes apresenta porte elevado, além de ser suscetível às principais doenças. Nessa tentativa, grandes esforços financeiros e intelectuais são requeridos para a obtenção de novos híbridos que apresentem características desejáveis. Como resultado deste trabalho, uma série de cultivares foi recomendada, a saber, Caipira, Thap Maeo, FHIA-18, FHIA Maravilha, Pacovan Ken, Japira, Vitória, Caprichosa e Garantida (SILVA; MORAIS-LINO; SANTOS-SEREJO, 2011).

Apesar do imenso investimento que se tem na criação de novas

cultivares de bananeira, atualmente é possível ter retornos financeiros com este tipo de pesquisa graças a Lei Nº 9.456, de 25 de Abril de 1997, ou a Lei de Proteção de Cultivares (BRASIL, 1997). Assim foi instituído o direito a proteção da cultivar que é efetivado mediante a emissão de Certificado de Cultivar. Para tal, torna-se necessário caracterizar as novas variedades, a fim de minimizar os riscos da apropriação indevida dos mesmos e maximizar a eficiência dos programas de melhoramento e a utilização do germoplasma elite. A caracterização, segundo a Lei, é baseada em descritores, que incluem características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares, que sejam herdadas geneticamente.

Os descritores morfológicos são amplamente utilizados para a maioria das culturas, inclusive a da bananeira. Apesar de sua ampla utilização, estes descritores apresentam limitações por sofrerem influência ambiental, perdendo estabilidade, e muitos serem avaliados na fase adulta das plantas, o que requer tempo e espaço físico para tais avaliações.

Por outro lado, a anatomia tem sido utilizada há muito tempo como importante ferramenta para auxiliar estudos taxonômicos. Entretanto, esta metodologia tem sido subutilizada na determinação de cultivares, principalmente na cultura da bananeira, apesar de sua comprovada eficácia. As avaliações anatômicas são de especial interesse, principalmente, quando se deseja realizar estudo comparativo com acessos que apresentam diferentes níveis de ploidia. Isto se deve ao fato de que o aumento do conteúdo de DNA nuclear afeta algumas características fenotípicas, apresentando alterações que podem ser avaliadas mediante a observação da anatomia da planta.

Por fim, a estimativa do conteúdo de DNA pela citometria de fluxo tem sido utilizada na identificação de materiais vegetais e também no estabelecimento da ploidia. Esta técnica mostra-se de grande utilidade, pois permite a avaliação de um grande número de amostras de forma simples e

rápida, apresentando-se como alternativa para a trabalhosa contagem cromossômica na determinação de ploidia de algumas espécies vegetais. Entretanto, os resultados encontrados na literatura ainda são divergentes, fazendo-se necessária melhor padronização das técnicas e busca pela compreensão da natureza genética das variações observadas.

Dentro deste contexto, o presente estudo objetivou caracterizar acessos de bananeira, bem como estabelecer as relações existentes entre a ploidia e entre grupos genômicos destes acessos por meio de características morfológicas internas e externas dos mesmos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Taxonomia e domesticação

As bananas e os plátanos pertencem à família Musaceae Juss., que possui relações filogenéticas ainda não muito bem esclarecidas. Comumente, são reconhecidos três gêneros para a família: *Musa*, *Ensete* e *Musella*. A maior parte das espécies foi agrupada no gênero *Musa*, sendo cerca de 65 ao todo. *Ensete* é um pequeno gênero que possui entre oito e nove espécies. Porém, os grandes desentendimentos entre os taxonomistas estudiosos do grupo dizem respeito ao gênero monoespecífico *Musella*. Alguns especialistas defendem que *Musella* seja tratado como uma secção de *Musa* por sua similaridade com características das brácteas e do pseudocaule com esse gênero. Outros taxonomistas, no entanto, sugerem que a espécie seja inserida em *Ensete* pelas semelhanças compartilhadas com relação à inflorescência (LI et al., 2010).

O gênero *Musa* foi primeiramente estabelecido por Linné em 1753 e posteriormente dividido em três subgrupos por Sagot: o primeiro subgrupo compreendendo as bananeiras gigantes, o segundo sendo o das bananeiras com fruto de polpa comestível e o terceiro subgrupo o das bananeiras ornamentais. Cheesman elevou o primeiro subgrupo ao status de gênero, nomeando como *Ensete*. O autor também propôs uma classificação coerente do gênero *Musa*, o dividindo em quatro secções: *Australimusa* ( $n = x = 10$ ), *Callimusa* ( $n = x = 10$ ), *Rhodochlamys* ( $n = x = 11$ ) e *Musa* ( $n = x = 11$ ) anteriormente chamada *Eumusa* (SIMMONDS; WHEATHERUP, 1990). Posteriormente foi criada a secção *Ingentimusa* ( $n = x = 7$ ) para conter a espécie *Musa ingens*, originária de Papua Nova Guiné (LI et al., 2010).

Estas classificações têm sido constantemente reconsideradas e, com o avanço dos estudos moleculares, novas dúvidas têm sido levantadas no que diz respeito à validade da taxonomia vigente baseada em morfologia e números

cromossômicos. Wong (2002) trabalhando com marcadores AFLP atestam que o número de cromossomos é uma forma coerente de se dividir as secções e sugerem que a secção *Rhodochlamys* seja inserida em *Musa* e que a secção *Australimusa* seja colocada dentro da secção *Callimusa*. Bartos et al. (2005) também faz a mesma sugestão mas ressaltam para a necessidade de serem avaliados os casos individualmente. Li et al. (2010) reconhecem em seus estudos moleculares que o gênero *Musa* é dividido em dois clados: *Musa* (incluindo as secções *Musa* e *Rhodochlamys*,  $x = 11$ ) e *Callimusa* (incluindo as secções *Callimusa*, *Australimusa* e *Ingentimusa*,  $x = 10$  e  $7$ ), não concordando com a divisão atualmente aceita. Deve-se salientar, no entanto, que estes estudos moleculares têm sido conduzidos com amostra limitada de espécies, restando ainda a dúvida do quanto a atual classificação genérica e infragenérica reflete verdadeiramente as relações filogenéticas do grupo.

A secção *Musa* é a mais bem representada geograficamente sendo também a secção que inclui as espécies *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla, que se acredita terem dado origem à maioria das cultivares comestíveis de banana dos dias de hoje. É aceito, atualmente, pela maioria dos pesquisadores que *M. acuminata* seja dividida em oito subespécies (*banksii*, *burmanica*, *burmannicoides*, *malaccensis*, *microcarpa*, *truncata*, *siamea* e *zebrina*). Ude et al. (2002) afirmam em seu estudo que as relações dentro *M. acuminata* são complexas e que muitas das dúvidas com relação a estas classificações advém da falta de confiabilidade em muitos dados morfológicos e citológicos de estudos anteriores ou então pelo uso de diferentes materiais vegetais pelos pesquisadores. Os autores dividiram os materiais avaliados de *M. acuminata* em seu estudo em três grupos apenas, o que os leva a contestar a divisão em subespécies tal como é aceita hoje pelo fato de que esta divisão pode não representar adequadamente as relações genéticas entre estas subespécies. Os autores também encontraram grande diversidade na subespécie *M. acuminata*

*banksii* e, assim como Simmonds e Weatherup (1991) atestam que esta subespécie se encontra em um nível diferente das demais, especulando sobre a validade de se elevar a subespécie ao nível de espécie como *Musa banksii*.

*M. balbisiana*, por sua vez, possui menor diversidade, porém isto talvez seja decorrente do fato da espécie não ter sido estudada em grandes detalhes e por estar pobremente documentada nas coleções de bananeiras. Pillay et al. (2008) questionam que a baixa diversidade encontrada para *M. balbisiana* esteja relacionada a estudos que consideram, exclusivamente, os caracteres morfológicos, tendo sido encontradas, mais recentemente, evidências de maior diversidade para a espécie a partir de estudos moleculares, como no caso de Ude et al. (2002) que encontraram dois grupos distintos quando avaliaram acessos de *M. balbisiana* a partir de marcadores moleculares. Os autores acreditam que mais investigações devem ser feitas a fim de verificar se não haveria necessidade, inclusive, de se criar subespécies dentro de *M. balbisiana*.

Atualmente é aceito que os ancestrais diplóides das duas espécies tiveram origem em duas regiões distintas: a região tropical da Malásia para *M. acuminata* e a região mais ao sul da Índia, caracterizada pela alternância de monções e secas, para *M. balbisiana* (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). Entretanto, a sobreposição da distribuição geográfica de ambas as espécies em algumas regiões e sua autocompatibilidade permitiu o surgimento de híbridos naturais.

A ocorrência natural de híbridos interespecíficos, bem como a ampla utilização da propagação vegetativa dificulta o esclarecimento da taxonomia do gênero *Musa* (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). Entretanto, considera-se um grupo de pré-cultivares diplóides semi-férteis como os ancestrais das bananas comestíveis dos dias atuais. A memória da diversidade conhecida da bananeira reside nas mais de 1.000 cultivares que surgiram por hibridação e mutação durante o curso de milhares de anos de domesticação. As

cultivares podem ser diplóides, triplóides ou tetraplóides sendo a maioria uma combinação de diferentes proporções dos genomas de *M. acuminata* (dito como genoma A) e de *M. balbisiana* (dito como genoma B). *M. schizocarpa* também possui parentesco com importantes cultivares, sendo representada pelo genoma S. Ainda é conhecido outro grupo de cultivares nas ilhas do Pacífico chamado Fe'i, cujas características são o cacho ereto e a polpa laranja. Embora sua composição genômica não esteja perfeitamente compreendida, é aceito que se originem da secção *Australimusa*, denotada pelo genoma T. (ROUX et al., 2008). Acredita-se que as bananas comestíveis do grupo fe'i tenham como ancestral *M. maclayi*.

Enquanto o genoma A é encontrado em todas cultivares, o genoma B é encontrado na maioria e os genomas S e T estão presentes somente em poucos materiais. D'Hont et al. (2000) e Ude et al. (2002) afirmam que dados morfológicos e moleculares situam *M. schizocarpa* muito próxima a *M. acuminata*. Exceção deve ser feita aos resultados encontrados por Bartos et al. (2005) para o conteúdo de DNA nuclear, que afasta *M. schizocarpa* de todas as demais espécies da secção *Musa*. *M. balbisiana* por sua vez situa-se um pouco mais distante tanto de *M. acuminata* quanto de *M. schizocarpa*. De fato, *M. balbisiana* situa-se distante de todos os materiais da secção *Musa* em inúmeros caracteres, como por exemplo, o formato globular das sementes, a sua incrível resistência a estresses abióticos e também nas respostas de estudos com marcadores moleculares como o de Wong et al. (2001, 2002). Por fim, como esperado, o genoma da secção *Australimusa* (genoma T) encontra-se distante dos três genomas referidos à secção *Musa*.

Os materiais cultivados de bananeira diferem dos selvagens, pois são altamente estéreis, produzindo frutos por partenocarpia, ou seja, o fruto desenvolve-se sem necessidade de polinização, fertilização e formação de sementes. A partenocarpia surgiu por mutação ainda não esclarecida no genoma

A, pois diplóides B não apresentam esta característica, mas híbridos contendo os dois genomas sim. Sendo assim, a única forma de reprodução para estes acessos é a vegetativa, o que implica que o sucesso de sua sobrevivência na natureza bem como a sua dispersão geográfica são intimamente dependentes da ação humana. Conseqüentemente, a grande variabilidade encontrada em regiões onde não há registro de cultivares selvagens se deve a mutações somáticas nestes acessos introduzidos, como mudanças em um único nucleotídeo, deleções e inserções de genes e duplicações (OSUJI et al., 1997; PILLAY et al., 2008). Clarke (2001) afirma que o fato de muitas das bananeiras atuais se reproduzirem vegetativamente há muitos séculos, sem recombinação genética as tornam um interessante modelo para estudos genéticos uma vez que certas cultivares tiveram seu genoma “congelado no tempo” por cerca de 8000 anos.

A maioria das cultivares de bananeira é, portanto, constituída de mutantes de ocorrência espontânea que foram selecionados, cultivados, multiplicados e distribuídos vegetativamente por fazendeiros. Inicialmente foram cultivados os mutantes partenocárpicos de *M. acuminata*, que posteriormente deram origem a clones triplóides por alterações no processo meiótico. Como os triplóides se mostraram mais resistentes e produtivos, ganharam a preferência dos produtores e passaram a ser amplamente disseminados (PILLAY et al., 2008). Para fins de classificação é recomendado que se mantenham os genótipos diplóides sem sementes no mesmo grupo taxonômico que seus ancestrais, pois estes materiais ainda conservam as mesmas características morfológicas. Da mesma forma os clones triplóides sem semente originados por restituição cromossômica também devem ser incluídos no mesmo grupo que os ancestrais pelo fato de que a adição de uma repetição de cromossomos por autopoliploidia não é capaz de introduzir qualquer nova informação relevante no genoma do novo clone (VALMAYOR et al., 2000).

Estas informações são confirmadas por análises de AFLP que se mostraram incapazes de separar os acessos AAA dos AA.

O desenvolvimento de *M. balbisiana* deu-se nas áreas mais secas da Ásia, motivo pelo qual acessos com presença de genoma B costumam ser mais resistentes ao déficit hídrico. Valmayor et al. (2000) relatam o aparecimento de triplóides BBB nestas regiões, fato que é desacreditado por Pillay et al. (2008), Roux et al. (2008) e Simmonds e Sheperd (1955), e afirmam que estes clones ainda não foram encontrados na natureza.

As principais cultivares de bananeira são, portanto, triplóides, sendo as cultivares com genoma AAA de bananas doces tipo exportação, e as cultivares com genoma AAB e ABB, para consumo *in natura* ou para cozinhar. Existem também diplóides AA e AB para o consumo sem sementes, além dos tetraplóides com todas as possíveis combinações genômicas. Todas estas variações foram encontradas em regiões diferentes na natureza, sugerindo que estas mutações e hibridações que deram origem a estas bananas sem sementes e partenocárpicas ocorreram centenas de vezes. Simultaneamente, as plantas selvagens continuaram a cruzar entre si, gerando continuamente mais diversidade (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). Além disso, ainda existe a presença dos genomas S e T em algumas cultivares como mostrado por D'Hont et al. (2001) que encontraram cultivares AS, AAT e BATB. Estes autores também salientam em seus resultados que os padrões meióticos podem apresentar grandes irregularidades nas bananeiras. Isto é evidenciado pelo fato da cultivar 'Pelipita', considerada ABB, apresentar oito cromossomos A e 25 cromossomos B, ao contrário dos 11 cromossomos A e 22 B esperados como diagnosticado por técnicas de hibridização *in situ*.

A Figura 1.1 representa um esquema para a origem evolutiva das bananas comestíveis que existem hoje com relação as suas ploidias e contribuição dos diferentes grupos genômicos, segundo proposto por Valmayor

et al. (2000). A Figura 1.2 representa o mesmo esquema na visão proposta por Simmonds e Shepherd (1955). Observa-se em ambos os esquemas a ausência da contribuição dos genomas S e T. O primeiro esquema mostra a presença da espécie *Musa paradisiaca*, tendo sido este o primeiro registro descrito para bananeira em 1753 por Linné. Por se tratar de um híbrido entre *M. acuminata* e *M. balbisiana* Simmonds e Shepherd (1955) propuseram que o termo fosse abolido e *M. paradisiaca* deixou de ser considerada como representante das espécies de bananas comestíveis. *M. paradisiaca* neste esquema é utilizada para representar todos os híbridos de todas as ploidias. Salienta-se, na parte mais baixa do esquema, a origem dos híbridos tetraplóides por várias vias possíveis. Na Figura 1.2 observa-se a ausência dos triplóides BBB, uma vez que para Simmonds e Shepherd, assim como para a maioria dos estudiosos, este acesso jamais foi diagnosticado na natureza. Também cabe salientar que, assim como na Figura 1.1, os acessos triplóides podem apresentar uma origem tanto por parte dos genótipos selvagens quanto dos comestíveis.

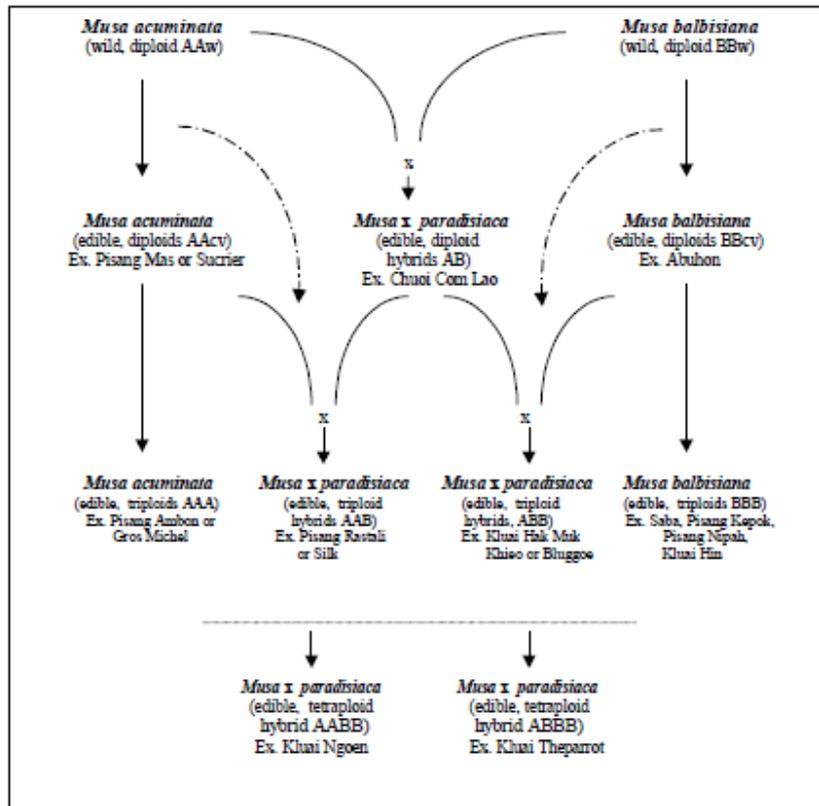


Figura 1.1 Diagrama representando os possíveis caminhos evolutivos das bananas comestíveis segundo Valmayor et al. (2000).

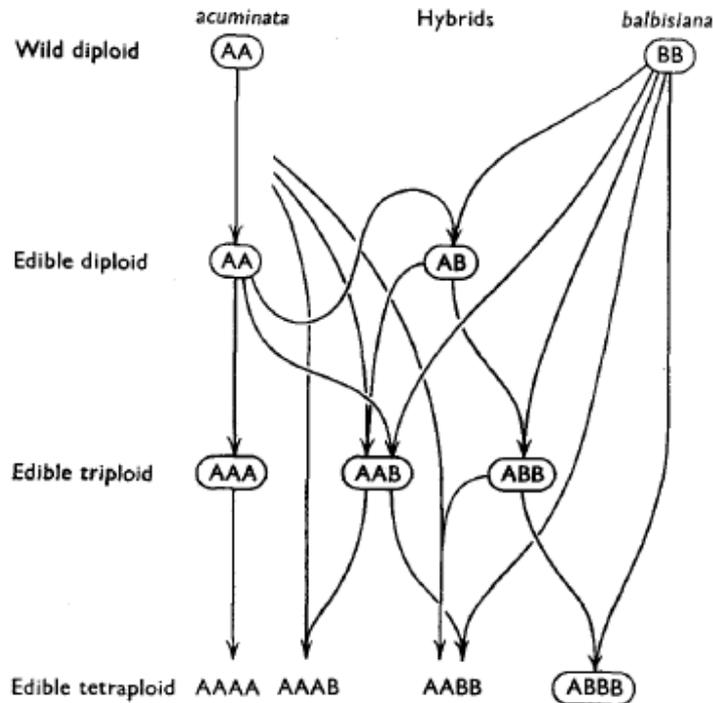


Figura 1.2 Diagrama representando os possíveis caminhos evolutivos das bananas comestíveis segundo Simmonds e Shepherd (1955).

A poliploidia também é um evento de extrema importância no processo evolutivo do gênero *Musa*, como era esperado, uma vez que o fenômeno é considerado a alteração citogenética mais importante na especiação e evolução vegetal. A hibridação seguida da poliploidia é de extrema importância no processo evolutivo, pois ao restaurar o pareamento meiótico, recupera a fertilidade do novo híbrido (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). Os poliplóides podem se originar por duplicação do número dos cromossomos ou, mais comumente, por formação de gametas  $2n$  decorrentes de uma modificação na gametogênese, as vezes por uma falha na meiose, gerando um gameta com a

mesma constituição genética dos parentais (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). Os poliplóides são, em geral, considerados bons colonizadores, podendo ocupar habitats onde anteriormente seus ancestrais diplóides não conseguiram se fixar adequadamente. Taxonomicamente, entretanto, os poliplóides apresentam um problema, como levantado por Schifino-Whittmann (2004): seriam citótipos de nível de plodia diferente, raças cromossômicas de uma mesma espécie, ou seriam espécies diferentes posto que não haveria fluxo gênico entre as diferentes formas?

Embora tenham como centro de origem a Ásia, as bananeiras e os plátanos foram introduzidos na África há cerca de 3.000 anos, e desde então uma incrível biodiversidade destes materiais se desenvolveu no continente. Destacam-se principalmente as terras baixas da África Ocidental e Central na biodiversidade dos plátanos e a região dos Grandes Lagos e as terras altas da África Oriental na biodiversidade das bananas doces. A África Ocidental é a região com maior diversidade de plátanos em todo o mundo, sendo considerado um centro secundário de diversificação deste tipo de banana, da mesma forma que a África Oriental é considerada o centro secundário de diversificação das bananas comestíveis do grupo AAA.

A classificação das bananas comestíveis foi proposta por Simmonds e Shepherd (1955). Os autores reconheceram três grupos morfológicamente distintos. O primeiro possuindo caracteres botânicos predominantes de *M. acuminata* e o segundo possuindo caracteres de *M. balbisiana*. O terceiro grupo possuía características combinadas, sendo considerado, portanto, o grupo de híbridos das duas espécies. Com base em 15 destas características os autores desenvolveram um sistema de classificação onde a cada característica era atribuída uma pontuação variando de 1 a 5, sendo 1 considerado a característica totalmente ligada ao genoma A e 5 totalmente ligada ao genoma B. Por meio deste sistema de pontuações é possível se ter um diagnóstico da contribuição dos

diferentes genomas no clone. Entretanto, o sistema é bastante complicado e requer a contagem de cromossomos, uma técnica laboriosa e demorada. A citometria de fluxo, no entanto, tem contribuído para auxiliar a identificação de ploidia das cultivares de bananeira, facilitando o processo (DOLEZEL; DOLEZELOVA; NOVÁK, 1994). Apesar de amplamente utilizado e dos resultados encontrados estarem de acordo com os novos resultados obtidos a partir de dados moleculares, o sistema possui limitações, pois só é aplicável a acessos diplóides, triplóides e tetraplóides que contenham genoma A e B, ignorando a contribuição dos genomas S e T. Além disso, a ampla variação que existe no complexo *Musa* torna virtualmente impossível criar um sistema de classificação exclusivamente baseado em descritores morfológicos (PILLAY *et al.*, 2008; VALMAYOR *et al.*, 2000).

Como a taxonomia do grupo *Musa* é bastante complexa e diferentes estudos têm apontado respostas conflitantes com relação às origens e relações filogenéticas dos materiais cultivados, é necessário que esforços continuem sendo empreendidos para o esclarecimento das relações evolutivas dentro do gênero. As respostas destes estudos, principalmente os baseados nos recentes avanços das técnicas moleculares podem esclarecer grande parte das atuais dúvidas e, desta forma, beneficiar grandemente os programas de melhoramento genético, uma vez que a compreensão da contribuição dos diferentes genomas é necessária para que os melhoristas possam tomar as decisões corretas na escolha dos genótipos a serem utilizados em seus planos de trabalho.

## **2.2 Melhoramento Genético**

Cerca de 120 países produzem bananas nas regiões tropicais e subtropicais com aproximadamente um terço sendo produzido na África, um terço na Ásia-Pacífico e um terço na América Latina e Caribe. Cerca de 87% da

produção é feita por pequenos produtores para consumo familiar ou venda em pequenos mercados locais enquanto que os 13% restantes, constituídos principalmente por bananas doces para consumo *in natura*, são artigos de exportação (ROUX et al., 2008). Desta forma, a cultura da bananeira é de extrema importância por movimentar grande quantidade de dinheiro, criar inúmeros empregos e servir como importante fonte de alimento em regiões variadas do planeta, especialmente nas mais carentes. Ainda assim, a banana é vista, em muitas circunstâncias como produto agrário de menor valor econômico e interesse para exportações (CLARKE, 2011).

A fim de modificar esta situação, os programas de melhoramento genético da cultura têm empreendido diversos esforços para mudar a visão do produto frente aos mercados de consumo.

Apesar de haver grande quantidade de cultivares de bananeira produzida no mundo, quando se considera a capacidade de resistência a doenças, estresses abióticos e, principalmente a preferência dos consumidores, este número é grandemente reduzido. A maior parte das bananas produzidas e exportadas pertence ao subgrupo Cavendish (AAA) que substituiu o subgrupo Gros Michel, dizimado pelo mal-do-Panamá na primeira metade do século. No Brasil, as principais cultivares pertencem ao subgrupo AAB (ex. Prata, Prata Anã, Maçã) para consumo local e ao grupo Cavendish (ex. Nanica e Grand Naine) para exportação (SILVA et al., 1999). As bananas do subgrupo Cavendish, no entanto, também começam a sofrer importantes ameaças de fungos, vírus e insetos que passam a preocupar os pesquisadores principalmente pela estreita base genética que a cultura apresenta, o que tem levado ao aumento na utilização de defensivos químicos nas plantações (RABOIN et al., 2005). Desta forma, existe um interesse crescente em se fortalecer a base genética da cultura para se obter maior resistência e, se possível, ainda se conseguir melhoria das condições agrônomicas de qualidade e produtividade (OSUJI et al., 1997).

Segundo Osuji et al. (1998) o potencial de crescimento de produção através de melhoramento genético é maior na bananeira do que em qualquer outra cultura. Talvez pelo fato de que as metodologias para melhoramento em bananeira ainda sejam poucas, tendo-se recentemente conseguido avanços para obtenção de informações relacionadas ao genoma da cultura. Entretanto, o melhoramento da bananeira é dificultado por conta da baixa fertilidade apresentada e da triploidia e origem desconhecida da maioria das cultivares (RABOIN et al., 2005)

Como as principais espécies que deram origem às bananeiras cultivadas (*M. acuminata* e *M. balbisiana*) evoluíram em regiões distintas, adquiriram características diferenciadas que contribuem para as qualidades agronômicas da cultura. Como por exemplo, pode-se citar a presença de genes para resistência à seca, doenças e também para a melhoria do valor nutricional como componentes de extrema importância advindos do genoma B, sendo, desta forma, muito importante que se conheça mais sobre a contribuição de cada um dos genomas nos clones utilizados pelos programas de melhoramento (PILLAY et al., 2008).

Atualmente os programas de melhoramento genético de bananeira têm utilizado em larga escala os cruzamentos entre espécies selvagens e cultivares comerciais para o ganho de resistência. Neste sentido são inúmeras as possibilidades de cruzamento e combinação de materiais. Também têm sido utilizadas técnicas de autopoliploidia com agentes antimitóticos como colchicina e orizalina para obtenção de tetraplóides sintéticos para posterior cruzamento com diplóides elite a fim de se obter triplóides de alta qualidade genética (ORTIZ, 1997, SILVA et al., 1999).

A variação somaclonal também se mostra como técnica de interesse nos programas de melhoramento para obtenção de novos clones. A bananeira, naturalmente apresenta taxa de variação somaclonal maior que a maioria das espécies, o que é potencializado pelo cultivo *in vitro*. Estas variações que

ocorrem no genoma, no entanto, podem ser de difícil percepção ou instáveis, não apresentando herdabilidade (SILVA et al., 1999).

Outra ferramenta bastante utilizada e pela qual se pode obter resultados interessantes é a indução de mutação. Através do emprego de agentes químicos ou físicos é possível se promover variabilidade para uma determinada característica de interesse, como resistência a fatores abióticos. Como estas mutações são ao acaso é necessário que estes materiais sejam selecionados *in vitro* e, posteriormente, se acesse o desempenho *in vivo*. Esta técnica também pode ser aplicada para melhoramento da resistência a doenças, realizando o cultivo de vários genótipos com a toxina de um parasita de interesse e seleção dos genótipos que apresentarem melhor resposta nesse meio (SILVA et al., 1999).

Como nos últimos anos tem sido promovido o acesso às informações relacionadas ao genoma da cultura, espera-se que novas metodologias possam ser aplicadas como, por exemplo, a transformação genética. Neste caso é necessário que se identifiquem e selecionem genes de interesse em cultivares ou em espécies selvagens para posterior isolamento destes genes e transferência para cultivares de importância econômica.

### **2.3 Criação e proteção de cultivares**

A bananeira é amplamente cultivada no território brasileiro, principalmente por pequenos produtores que a utilizam como fonte de alimentação e renda (JESUS et al., 2006), contribuindo, assim, para a fixação do homem no meio rural e na geração de emprego no campo.

No Brasil, com exceção de algumas áreas, as plantações são feitas com pouco investimento e baixa tecnologia e as cultivares de bananeira utilizadas apresentam baixa produtividade e alta suscetibilidade às principais pragas que

atingem a cultura (SILVA et al., 1999). Com o objetivo de contornar esta situação, o programa de melhoramento genético da bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura procura sempre lançar novas cultivares no mercado que atendam tanto a uma demanda por maior produtividade quanto resistência às pragas (JESUS et al., 2006).

Segundo Araújo (2010) o lançamento de cultivares melhoradas com maior potencial de produção nas condições em que se desenvolvem apresenta-se como um dos principais segmentos tecnológicos para a agricultura. Segundo o autor, a adoção por maior número de agricultores destas cultivares aprimoradas traria, certamente, acentuada alteração no perfil de rendimento das lavouras brasileiras.

O lançamento de uma nova cultivar, no entanto, exige um longo período de pesquisa e elevado investimento financeiro pelos programas de melhoramento genético. Para que haja estímulo por parte destes programas para continuarem suas pesquisas é necessário que exista um mecanismo de proteção para essas inovações (PESKE; BARROS, 2003). Esta necessidade levou a se pensar uma forma de proteção destas novas variedades, permitindo o controle sob sua produção e comercialização.

Consoante ao que ocorre em outros países e com o intuito de possibilitar aos melhoristas a proteção das variedades resultantes de suas pesquisas, surge no Brasil em 1997 a Lei Nº 9.456 ou Lei de Proteção de Cultivares. Esta lei, de acordo com Araújo (2010) insere-se no campo da propriedade intelectual e do direito do autor, sendo complementar à Lei da Propriedade Intelectual (Lei das Patentes), sancionada no ano anterior. Segundo o mesmo autor, tratou-se de grande inovação possibilitar o direito à propriedade intelectual relacionada à agricultura, algo até então inexistente no país.

Segundo a Lei de Proteção de Cultivares, uma cultivar é definida como “a variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas por margem mínima de descritores”.

Para que possa ser protegida, portanto, a cultivar precisa ser plenamente diferenciável de outras cultivares, apresentar variabilidade mínima nos descritores quando plantada em escala comercial e manter sua homogeneidade ao longo das gerações (SEVERINO et al., 2002). Assim sendo, a lei ainda define o que se compreende por descritores como “características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares, geneticamente herdadas, utilizadas na identificação das cultivares”.

A caracterização morfológica é a maneira mais simples e de menor custo na busca de descritores que possibilitem caracterizar uma cultivar, pois exige a simples visualização do material vegetal e, em caso de características mensuráveis, ferramentas de fácil disponibilidade. Esta caracterização consiste na adoção de descritores botânicos herdáveis, facilmente visíveis e mensuráveis que, a princípio, são expressos em todos ambientes (RADMANN; OLIVEIRA, 2003). Segundo Severino et al. (2002) deve-se levar em consideração a variação existente na base genética estudada, e esta caracterização é fundamental também para acessos a bancos de germoplasma e como ferramenta auxiliar do melhoramento genético.

No entanto, a descrição morfológica apresenta suas limitações, como no caso de cultivares com grandes semelhanças fenotípicas e também com relação a caracteres de herança aditiva, que são altamente influenciados pelo meio (OLIVEIRA et al., 2000). Por esta razão é necessário que as plantas que participam destes estudos estejam submetidas às mesmas condições ambientais.

Os descritores morfológicos para a cultura da bananeira já são bem conhecidos (INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE - IPGRI, 1996) e incluem características da planta adulta, muitas dessas ligadas às estruturas reprodutivas, como número de pencas, número e comprimento dos frutos (AMORIM et al., 2008). O recomendado para a cultura da bananeira é que estes descritores de produção sejam avaliados quando os

frutos estiverem bem preenchidos, de preferência adquirindo coloração amarelada. A grande limitação oferecida por esta exigência reside no fato de que é necessário que se espere um longo tempo até que se possa realizar a caracterização dos acessos baseando-se nesses descritores.

Sendo assim, seria interessante que se procurasse encontrar descritores morfológicos que possibilitassem a identificação de cultivares ainda no estágio juvenil da planta, evitando que haja erros na identificação de cultivares por produtores ou técnicos e, por falta de caracterização prévia, só viessem a descobrir o engano após longo período, acarretando grandes prejuízos.

Para a caracterização morfológica de cultivares de bananeira é necessária, inicialmente, a distinção entre acessos diplóides, triplóides e tetraplóides. Além da contagem cromossômica, algumas características morfológicas podem atestar uma informação precisa sobre o nível de ploidia (SHEPHERD, 1984).

A possibilidade de se separar os acessos de diferentes ploidias ocorre em razão de um fenômeno biológico conhecido como “efeito gigas” (SCHIFFINO-WITTMANN, 2004; VAMOSI, 2007). Com o aumento da ploidia e, conseqüentemente, aumento do volume nuclear, existe menor número de divisões durante a vida do vegetal, o que leva a um aumento no tamanho das células e dos tecidos. Este efeito é observado principalmente em órgãos com padrão de crescimento altamente determinado, como flores e sementes, mas também ocorre em folhas, com o aumento da espessura do limbo foliar e redução da ramificação.

Ainda que a caracterização de cultivares ocorra predominantemente por descritores morfológicos, as desvantagens apresentadas por este sistema têm levado a busca por novas alternativas. Uma dessas alternativas tem sido os descritores de proteínas e, principalmente, os descritores de DNA, baseados no genoma do indivíduo. Este tipo de descritor tem recebido especial atenção pelo

fato de possibilitar a distinção de cultivares morfologicamente similares e geneticamente aparentadas (MILACH, 1998).

Descritores genéticos baseados no polimorfismo do DNA poderão ser utilizados pelo melhorista para criar um padrão genético (*fingerprinting*) próprio de cada cultivar (STAUB et al., 1996), pois não depende da idade da planta, do ambiente, do estado sanitário e do clima. Assim, a identidade genética poderá ser feita em plantas jovens, inclusive micropropagadas, facilitando a identificação, comercialização e o intercâmbio de germoplasma. Além disto, o uso destes descritores possibilita a obtenção de estimativas de distâncias genéticas entre as cultivares, e assim o acesso à variabilidade existente (MILACH, 1998).

Além destes parâmetros morfológicos e moleculares ainda encontram-se entre os descritores recomendados para banana (IPGRI, 1996) aqueles relacionados à ploidia e ao cariótipo do material.

As características mais evidentes do cariótipo são a posição do centrômero e o número e tamanho dos cromossomos. Entretanto, estudos de cariótipo de bananeira têm sido dificultados em função dos cromossomos serem muito pequenos. Sendo assim, a descrição cariotípica desta espécie tem sido restrita ao número cromossômico, uma vez que é praticamente impossível distinguir algum detalhe da estrutura cromossômica (GUIMARÃES et al., 2009). A fim de minimizar este problema, a citometria de fluxo começou a ser utilizada como técnica rápida e rotineira para determinação de ploidia. Esta ferramenta pode ser utilizada desde que a ploidia para a espécie já tenha sido estabelecida por meio de estudos citogenéticos. Crouch et al. (1999), no entanto, afirmam que esta abordagem não pode ser utilizada para estudos mais detalhados, sendo necessário que se recorra a técnicas mais apuradas, como o estudo do cariótipo, para uma precisa determinação do número de cromossomos e outros detalhes da constituição do material genético vegetal.

A citometria de fluxo envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida. Essas partículas interceptam uma a uma um feixe de laser, ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência. A intensidade de dispersão da luz, ou emissão de fluorescência, está relacionada com as propriedades da partícula que se está analisando. Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucos gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear. A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade do material genético. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas. Desta forma é possível estimar o tamanho do genoma, avaliar a ploidia, detectar mixoploidia e aneuploidia, avaliar o ciclo celular, estudar a eliminação cromossômica, separação de células, cromossomos ou organelas dentre outras aplicações (DOLEZEL; BARTOS, 2005)

A citometria de fluxo permite a detecção de pequenas variações no conteúdo de DNA, assim permitindo a detecção de mixoplóides (material contendo variação no conteúdo de DNA). A existência de vários picos com quantidades de DNA variáveis é um indicativo deste fenômeno. Trabalhando-se com o refinamento da técnica, com histogramas de baixíssimos coeficientes de variação (entre 1% e 1,5%), é possível detectar a perda de um único par de cromossomos e, portanto, selecionar, entre um grande número de indivíduos, plantas aneuplóides, isto é, aquelas que apresentam variações numa pequena quantidade de cromossomos.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, E. et al. Variabilidade genética entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1045-1052, ago. 2008.
- ANUÁRIO brasileiro de fruticultura. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2010. 129 p.
- ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2009. 495 p.
- ARAÚJO, J. **A lei de proteção de cultivares**: análise de sua formulação e conteúdo. Brasília: Câmara Federal, 2010. 136 p. (Série Memória e Análise de Leis).
- BARTOS, J. et al. Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 109, n. 1/3, p. 50-57, Feb. 2005.
- BRASIL. Lei n° 9456, de 25 de abril de 1997. Institui a proteção de cultivares e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, ano 85, n. 79, p. 8241-8246, 28 abr. 1997. Seção I.
- CLARKE, T. **Banana genome unpeeled**: fruitful start to banana sequence. Disponível em: <<http://www.nature.com/nsu/010719/010719-22.html>>. Acesso em: 2 mar. 2011.
- CROUCH, J. et al. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 1, n. 1, p. 11-22, 1999.
- D'HONT, A. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 177-183, Mar. 2000.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVÁK, F. Flow cytometry estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *Musa balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, June 1994.

GUIMARÃES, N. et al. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras 'Prata Anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 448-454, mar./abr. 2009.

HESLOP-HARRISON, J.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and future for banana. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 5, p. 1073-1084, Aug. 2007.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for banana (*Musa spp.*)**. Rome, 1996. 55 p.

JESUS, O. et al. Diferenciação molecular de cultivares elite de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1739-1748, dez. 2006.

LI, M. et al. Molecular phylogeny and systematics of the banana family (Musaceae) inferred from multiple nuclear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to genus *Musa*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 57, n. 1, p. 1-10, Oct. 2010.

MILACH, S. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A. et al. (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 43-58.

OLIVEIRA, R. et al. Frequência de híbridos em cruzamentos entre tangerina "Cravo" e laranja "Pêra": análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1895-1903, set. 2000.

ORTIZ, R. Morphological variation in *Musa* germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, n. 5, p. 393-404, May 1997.

OSUJI, J. et al. Identification of the genomic constitution of *Musa* L. lines (bananas, plantains and hybrids) using molecular cytogenetics. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 6, p. 787-793, Aug. 1997.

OSUJI, J. et al. Molecular cytogenetics of musa species, cultivars and hybrids: location of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA and telomere-like sequences. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 1, p. 243-248, Oct. 1998.

PESKE, S.; BARROS, A. Produção de Sementes. In: PESKE, S.; ROSENTHAL, M.; ROTA, G. (Ed.). **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: UFPel, 2003. p. 14-92.

PILLAY, M. et al. Molecular characterization of genomes in Musa and its applications. In: JAIN, S.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular, biology and induced mutations**. New York: Science, 2008. p. 271-286.

RABOIN, L. et al. Diploid ancestors of triploid export banana cultivars: molecular identification of 2n restitution gamete donors and n gamete donors. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 333-341, 2005.

RADMANN, E.; OLIVEIRA, R. Caracterização de cultivares apirênicas de citros de mesa por meio de descritores morfológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1123-1129, set. 2003.

ROUX, N. et al. Genomics of banana and plantain (*Musa* spp.) major staple crops in the tropics. In: MOORE, P.; MING, R. (Ed.). **Genomic of tropical crop plants**. New York: Springer, 2008. p. 83-111.

SCHIFINO-WITTMANN, M. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 151-157, abr./jun. 2004.

SEVERINO, L. et al. Eficiência dos descritores dos cafeeiros (*Coffea arabica* L.) na discriminação de linhagens de “Catimor”. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1487-1492, 2002.

SHEPHERD, K. **Taxonomia e caracterização de cultivares de banana**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1984. 5 p.

SILVA, S. O. et al. **Variabilidade genética e melhoramento da bananeira: recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido; Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br>>. Acesso em: 15 fev. 2011.

SILVA, S. O.; MORAIS-LINO, L. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. Melhoramento genético de bananeira para resistência às doenças. In: CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; SILVA, S. O. (Ed.). **Recomendações técnicas sobre a sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2011. p. 50-56.

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

SIMMONDS, N.; WEATHERUP, S. Numerical taxonomy of the wild bananas. **New Phytologist**, Cambridge, v. 115, n. 3, p. 567-571, July 1991.

STAUB, S. et al. Plant variety protection: a consideration of genetic relationship. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 7, p. 1086-1091, Sept. 1996.

UDE, G. et al. Genetic diversity in *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and some of their natural hybrids using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 8, p. 1246-1252, Apr. 2002.

VALMAYOR, R. et al. **Banana cultivar names and synonyms in Southeast Asia**. Laguna: International Network for Improvement of Banana and Plantain, 2000. Disponível em: <[www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications](http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications)>. Acesso em: 1 mar. 2011.

VAMOSI, J. Pollination, floral display and the ecological correlates of polyploidy. **Functional Ecosystems and Communities**, Kagawa, v. 1, n. 1, p. 1-9, Jan. 2007.

WONG, C. Assessment of the validity of sections in *Musa* (Musaceae) using AFLP. **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 2, p. 231-238, Apr. 2002.

\_\_\_\_\_. Genetic diversity of wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP. **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 6, p. 1017-1025, Aug. 2001.

**CAPÍTULO 2 DESCRITORES MORFOLÓGICOS PARA  
CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE BANANEIRA EM ESTÁDIO  
JUVENIL**

## 1 RESUMO

A avaliação morfológica é a forma mais prática utilizada para caracterização de cultivares. Os descritores morfológicos para a cultura da bananeira estão bem estabelecidos e baseiam-se, principalmente, em caracteres da planta adulta. Atualmente a micropropagação tem sido uma das principais formas para obtenção de mudas na cultura da bananeira, pela rapidez da técnica e obtenção de material de alta qualidade, tanto para produtores comerciais quanto para programas de melhoramento genético. Com o objetivo de possibilitar a identificação de cultivares de bananeira ainda em estágio juvenil, o presente estudo procurou selecionar características que auxiliassem na identificação precoce de acessos de bananeira. Foram utilizados 12 acessos com diferentes graus de ploidia e grupos genômicos. O material foi multiplicado por duas gerações em meio MS e posteriormente aclimatizado em casa de vegetação por 90 dias. Após este período, foram avaliadas características morfológicas quantitativas como altura das plantas, diâmetro do pseudocaule, número, comprimento e largura das folhas, além de características qualitativas, como cor do limbo foliar, orientação da folha, presença de manchas no pseudocaule e no limbo foliar. Com base nos resultados obtidos não foi possível observar clara relação do nível de ploidia e da influência dos grupos genômicos na morfologia do material avaliado. Esta relação, no entanto, é esperada em avaliações do material adulto, onde podem ser distinguidos os efeitos nucleotípicos das alterações de conteúdo de DNA. Entretanto, os dados morfológicos permitem uma caracterização dos acessos avaliados, inclusive com a elaboração de uma chave analítica que possibilita a identificação dos acessos estudados ainda em estágio juvenil, o que auxilia os produtores e também aos técnicos a evitar prejuízos decorrentes da mistura de materiais vegetais durante o manuseio.

**Palavras-chave:** *Musa* sp. Caracterização. Morfologia. Ploidia. Estádio juvenil.

## 2 ABSTRACT

Morphological evaluation is the most useful way for cultivar characterization. The morphological descriptors for banana are well established and they are mainly based in the adult plant characteristics. Currently, micropropagation has been one of the most important tools for obtaining banana plantlets since it is a fast method, resulting in high quality material for producers and breeding programs. The present study searched for characteristics which could enable banana cultivars characterization still in the juvenile phase. Twelve banana accesses with different ploidy levels and genomic groups were used in the study. Plant material was multiplied in vitro for two multiplication cycles in MS medium and transferred for the greenhouse for acclimatization. After 90 days period, evaluations of quantitative characteristics such as plant height, pseudostem diameter, leaf blade length and width and number of leaves. Qualitative characteristics were assessed like leaf color, orientation and presence of blots in the blade and pseudostem. The results showed no clear relation between ploidy level, genomic groups and the morphological features. This relation is expected in the adult plant material, in which the nucleotypic effects of increasing DNA content can be observed. However, the morphological data allowed a characterization of the banana accesses and the elaboration of an analytical key which enables the identification of those accesses. It would certainly help the producers and breeders to avoid losses from incorrect selection of plant material and late detection of the problem.

**Keywords:** *Musa* sp. Characterization. Morphology. Ploidy. Juvenile phase.

### 3 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético da bananeira atualmente tem como objetivo a obtenção de cultivares produtivas capazes de resistirem às doenças como sigatokas, mal-do-Panamá e às pragas como nematóides, bem como apresentarem características agrônômicas de interesse, como porte reduzido e frutos com melhor característica organoléptica. Os programas de melhoramento de espécies de interesse econômico lançam com frequência cultivares que apresentam características desejáveis e que são resultados de longas e intensas pesquisas.

Desta forma, é fundamental que exista a possibilidade de se proteger estas novas cultivares da apropriação genética indevida, sendo que, o primeiro passo para se garantir legalmente esta proteção é a identificação de critérios estabelecidos para descrição de variedades, ou seja, descritores (MILACH, 1998; BRASIL, 1997). Tradicionalmente, os melhoristas têm utilizado características morfológicas para registro e lançamento de novas variedades (MILACH, 1998). A caracterização destes materiais é uma atividade muito útil para escolha dos progenitores adequados dentro dos programas de melhoramento, dependendo do objetivo que o melhorista pretende atingir (AMORIM et al., 2008).

Descritores morfológicos, principalmente os quantitativos, podem ser afetados pelo ambiente, o que poderia dificultar sua utilização, pois, sob certas condições, poderiam sofrer grandes variações. Por outro lado, estes descritores são de interesse para se observar padrões de adaptação de diferentes acessos, disponibilizando informações sobre as diferenças de respostas do *pool* de genes da cultura, o que pode ser útil para produção de futuros híbridos (ORTIZ, 1997).

A maioria dos descritores morfológicos utilizada para a distinção das cultivares de bananeira já está bem estabelecida (INTERNATIONAL PLANT

GENETIC RESOURCE INSTITUTE - IPGRI, 1996) e se baseia em características de plantas adultas muitas delas ligadas às estruturas reprodutivas, como número de pencas e de frutos, número de dias do plantio à floração, comprimento e diâmetro do fruto (AMORIM et al., 2009; LESSA et al., 2009; SANTOS et al. 2006 ).

Contudo, com a expansão da bananicultura no Brasil, os produtores têm exigido maior demanda por mudas destas plantas, que muitas vezes são de caráter duvidoso, tanto relacionado à produtividade quanto as condições fitossanitárias, o que pode aumentar a incidência de pragas nas plantações e reduzir os lucros para os agricultores (BRAGA; SÁ; MUSTAFÁ, 2001).

Desta forma, a micropropagação tem se apresentado como excelente ferramenta para abastecer o mercado produtor com mudas de atestada procedência genética e qualidade fitossanitária, além de ser metodologia muito utilizada pelos programas de melhoramento genético para produção de mudas básicas de novas cultivares (BRAGA; SÁ, MUSTAFÁ, 2001). De fato, quando se compara a proporção da utilização da micropropagação com a propagação convencional, a bananeira se mostra como a cultura de maior relevância (MOHAMED, 2007). Contudo, é necessário rígido controle sobre a fidelidade genética das mudas obtidas por propagação *in vitro* a serem destinadas aos campos de produção, evitando prejuízos aos produtores (NÓBREGA, 2006). Para atender esta necessidade a identificação e certificação dos materiais previamente são fundamentais, por reduzirem possíveis prejuízos para produtores ou melhoristas decorrentes de identificação incorreta de material vegetal.

Para evitar possíveis erros na identificação das bananeiras na fase de muda é que se propôs o presente estudo, que tem como objetivo avaliar as características morfológicas de acessos desta cultura que possam ser utilizados como descritores destes materiais ainda na fase juvenil.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os acessos utilizados para todos os experimentos foram oriundos da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Tabela 1.1). O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e casas de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados explantes constituídos de ápices caulinares de 12 acessos de bananeira de grupos genômicos e níveis de ploidia distintos (Tabela 1.2). Estes explantes foram cultivados *in vitro* em meio MS e mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa de  $36 \mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. O material foi multiplicado em meio MS por duas gerações, cada uma com duração de 30 dias. Posteriormente as plantas foram transferidas para estufa e acondicionados em vasos de 0,5 L com substrato constituído de 1 parte de terra: 1 parte de areia: 1 parte de esterco sendo mantidas sob regime de nebulização intermitente e sombreamento de 50%. Semanalmente foram realizadas regas com meio MS líquido 50% sem adição de açúcar. Após 90 dias de aclimatização, de fevereiro a abril, foram realizadas avaliações das seguintes características morfológicas: a) altura das plantas (AP – cm): realizada com fita métrica; b) diâmetro do pseudocaule (DP- mm): realizado com paquímetro digital na altura da inserção da folha mais basal; c) número de folhas plenamente expandidas e não senescentes (NF); d) comprimento do limbo foliar (CL - cm): medida com fita métrica; e) largura do limbo foliar (LL - cm): medida com fita métrica.

Além destas características, ainda foram avaliadas caracteres morfológicos qualitativos como o aspecto geral da planta (esguias – entrenós longos; compactas - entrenós curtos) cor do pseudocaule, cor do limbo, cor da

nervura central, cor da borda do limbo, orientação da folha, consistência da folha e presença de manchas no limbo.

Os dados avaliados foram submetidos à análise de variância pelo programa Sisvar e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 1.1 Acessos de bananeira provenientes da Embrapa Mandioca e Fruticultura

<i>Acessos</i>	<i>Genoma</i>	<i>Descrição</i>
Malbut	AA	Cultivar introduzida de Nova Guiné
NBA	AA	Cultivar introduzida de Nova Guiné
118	AA	Genótipo selvagem introduzido da Tailândia
Caipira	AAA	Cultivar originária da África, introduzida na França recomendada por ser resistente às sigatokas negra e amarela e ao Mal-do-Panamá
Thap Maeo	AAB	Cultivar introduzida da Tailândia recomendada por ser resistente às Sigatokas negra e amarela e ao Mal-do-Panamá
Prata Anã	AAB	Cultivar originária do Brasil, mutação da cultivar Branca, a mais plantada
Maçã	AAB	Cultivar preferida e originária do Brasil
FHIA-02	AAAB	Híbrido tipo Prata da cultivar Prata Anã, resistente à Sigatoka negra
Bucanero	AAAA	Híbrido da cultivar Lowgate (Gros Michel) resistente à Sigatoka-negra
Princesa	AAAB	Híbrido Tipo Maçã da cultivar Yangambi N° 2 que foi introduzida da França, resistente à Sigatoka amarela e tolerante ao mal-do-Panamá
Garantida	AAAB	Híbrido Tipo Prata da cultivar Prata São Tomé, recomendado pela Embrapa por ser resistente às Sigatokas negra e amarela e ao Mal-do-Panamá
Tropical	AAAB	Híbrido Tipo Maçã da cultivar Yangambi N° 2 que foi introduzida da França, resistente à Sigatoka amarela e tolerante ao Mal-do-Panamá
PA42-44	AAAB	Híbrido Tipo Prata da cultivar Prata Anã resistente às Sigatokas amarela e negra e ao Mal-do-Panamá

Fonte: Silva et al., (1997) e Silva, Pereira e Rodrigues (2008)

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Pelos resultados obtidos é possível observar que não existe uma separação clara dos acessos na qual possa ser feita qualquer inferência ao grupo genômico ou ao nível de ploidia (Tabela 1.2). Esta relação é esperada em avaliações de material adulto, principalmente órgãos de crescimento altamente determinado, como flores e sementes, pois um maior conteúdo de DNA gera um aumento do tamanho das células e, por conseguinte, aumento dos tecidos e órgãos, o chamado efeito “gigas” (VAMOSI et al., 2007). Apesar desta relação também estar presente em órgãos vegetativos, não foi encontrado, neste trabalho, qualquer resultado significativo que confirme esta afirmativa, talvez por razão do material avaliado ser bastante jovem.

Tabela 1.2 Características morfológicas de acessos de bananeira provenientes do programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura micropropagadas após três meses de aclimatização<sup>1</sup>.

<i>Genótipo</i>	<i>Características</i> <sup>2</sup>				
	AP (cm)	CL (cm)	LL (cm)	DP (mm)	NF
Malbut (AA)	26,40 A	26,33 B	10,35 B	13,69 B	4,2 A
NBA (AA)	17,20 B	19,97 C	9,11 B	13,13 B	5,0 A
Caipira (AAA)	25,20 A	30,08 A	11,50 A	14,94 B	4,8 A
Thap Maeo (AAB)	28,60 A	24,44 B	9,94 B	15,26 B	4,8 A
Prata Anã (AAB)	20,80 B	22,44 B	11,17 A	18,35 A	5,2 A
Maçã (AAB)	17,40 B	18,3 C	7,09 C	14,27 B	5,0 A
FHIA-02 (AAAB)	16,20 B	18,92 C	8,87 C	17,72 A	5,4 A
Bucanero(AAAA)	15,60 B	17,59 C	7,81 C	16,97 A	5,2 A
Princesa (AAAB)	27,60 A	24,4 B	9,42 A	14,43 B	4,6 A
Garantida (AAAB)	19,60 B	17,95 C	7,20 C	14,71 B	5,4 A
Tropical (AAAB)	17,40 B	17,94 C	7,53 C	15,33 B	5,0 A
PA42-44 (AABB)	18,00 B	17,59 C	8,51 C	17,1 A	6,0 A
<b>C.V.(%)</b>	14,46	12,29	14,08	12,88	16,57

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>AP – altura da planta, CL – comprimento do limbo, LL – largura do limbo, DP – diâmetro do pseudocaule, NF – número de folhas.

A avaliação morfológica para a caracterização dos genótipo só foi possível mediante criteriosa observação das características descritivas de cada material:

Malbut: plantas altas ( $\bar{x} = 26,4$  cm), aspecto esguio, folhas longas ( $\bar{x} = 26,33$  cm), delgadas e cuja inserção das folhas mais baixas se dá em porções mais elevadas do pseudocaule. A nervura central apresenta coloração verde nas folhas mais jovens e castanha nas folhas mais maduras. O limbo foliar apresenta manchas castanhas em sua extensão e coloração da borda avermelhada.

NBA: plantas esguias, de estatura mediana a baixa ( $\bar{x} = 17,2$  cm). As folhas são longas ( $\bar{x} = 19,97$  cm), mais delgadas nas porções superiores e mais largas nas porções inferiores do pseudocaule. A coloração das folhas é verde

claro brilhante e manchas castanhas são freqüentes. A nervura central é verde e a borda do limbo é de coloração castanha.

Caipira: são plantas altas ( $\bar{x} = 25,2$  cm), com folhas muito longas ( $\bar{x} = 30,8$  cm) de coloração verde médio, com manchas castanhas esparsas pelo limbo em pequena quantidade. As bordas do limbo são de coloração vermelho intenso e a textura é membranácea.

Thap Maeo: plantas altas ( $\bar{x} = 28,6$  cm), esguias, com folhas grandes ( $\bar{x} = 24,44$  cm) e delgadas ( $\bar{x} = 9,94$  cm). A coloração do limbo é de verde médio a escuro e a textura levemente crassa. Apresenta manchas castanhas em quantidade moderada. A nervura central é castanha e a borda do limbo vermelho intenso.

Prata Anã: plantas de estatura mediana ( $\bar{x} = 20,8$ ) e aspecto compacto. As folhas são médias ( $\bar{x} = 22,44$  cm) e largas ( $\bar{x} = 11,17$  cm) de coloração verde escuro opaca. Apresentam manchas castanhas no limbo e nervura central também de coloração castanha. O pseudocaule é bastante espesso ( $\bar{x} = 18,35$  mm) e, assim como os pecíolos, apresenta coloração avermelhada.

Maçã: plantas de estatura baixa ( $\bar{x} = 17,4$  cm), porém de aspecto esguio. As folhas são de comprimento médio ( $\bar{x} = 18,3$  cm) e bastante delgadas ( $\bar{x} = 7,09$  cm), de coloração verde médio e sem manchas no limbo. A nervura central apresenta a mesma cor do limbo.

FHIA-02: são plantas de estatura mais baixa ( $\bar{x} = 16,2$  cm) de aspecto compacto até levemente esguio. As folhas se apresentam longas ( $\bar{x} = 18,92$  cm) e largas ( $\bar{x} = 8,87$  cm) para a baixa estatura das plantas. A cor do limbo é de verde médio a escuro, com manchas castanhas muito pouco freqüentes, ou mesmo

ausente em alguns exemplares. As nervuras centrais são verdes, porém é freqüente assumirem coloração castanha apenas na parte basal do limbo.

Bucanero: são plantas bastante baixas ( $\bar{x}=15,6$  cm), de aspecto compacto, cujas folhas, pequenas ( $\bar{x}=17,54$  cm) se inserem no pseudocaule desde a porção mais basal. O limbo é verde escuro opaco com muitas manchas castanhas em sua extensão. A nervura central é da mesma cor do limbo e a borda apresenta coloração vermelho intenso.

Princesa: plantas altas ( $\bar{x}=27,6$  cm) de aspecto esguio, com folhas longas ( $\bar{x}=24,4$  cm), levemente crassas e apresentam orientação plana em relação ao solo. Não apresenta manchas no limbo e, nas folhas mais maduras, a nervura central apresenta coloração avermelhadas até metade de sua extensão.

Garantida: plantas de estatura média a baixa ( $\bar{x}=19,6$  cm), de aspecto levemente esguio, porém com o pseudocaule apresentando um diâmetro maior, principalmente na porção mais basal, onde tem aspecto intumescido. As folhas são pequenas ( $\bar{x}=17,95$  cm) e delgadas ( $\bar{x}=7,2$  cm), de coloração verde escuro bastante opaco, apresentando manchas castanhas, geralmente próximas a nervura central, que se apresenta predominantemente castanha.

Tropical: plantas de estatura baixa ( $\bar{x}=17,4$  cm), porém de aspecto esguio. As folhas são pequenas ( $\bar{x}=17,94$  cm) de coloração verde médio a escuro e brilhante. Não apresentam manchas no limbo e a nervura central é de coloração castanha.

PA 42-44: plantas baixas ( $\bar{x}=18$  cm) de aspecto compacto e pseudocaule espesso ( $\bar{x}=17,1$  cm). As folhas são pequenas ( $\bar{x}=17,59$  cm) e largas ( $\bar{x}=8,51$  cm), de aspecto crasso, coloração verde escura e presença de

manchas castanhas em sua extensão. A nervura central apresenta coloração castanha mesmo nas folhas mais jovens.

As cultivares que apresentam relações parentais, como Prata Anã, FHIA-02 e PA42-44 mostraram grande semelhança nas respostas, tanto dos dados quantitativos quanto dos dados qualitativos, como baixa estatura, pseudocaule espesso, folhas escuras e com manchas castanhas no limbo. Outro grupo de cultivares relacionadas, compreendendo as cultivares Princesa e Tropical não apresentou semelhança na resposta dos dados quantitativos, porém apresentou semelhança para dados qualitativos como folhas escuras e ausência de manchas no limbo.

De forma geral, caracteres como a altura das plantas, comprimento e largura de folhas apresentaram grande polimorfismo. O diâmetro do pseudocaule, por sua vez, apresentou uma variação menos acentuada nos diferentes acessos avaliados. Já o número de folhas não apresentou qualquer variação. Ortiz (1997) atesta que, para uma característica morfológica ser um descritor de relevância, é necessário que apresente um elevado polimorfismo. O autor cita o número de folhas como sendo uma destas características interessantes. É importante ressaltar que, como em todos os estudos de avaliação morfológica para acessos de bananeira, o autor utilizou plantas adultas. No presente estudo, entretanto, ao utilizar plantas jovens, o número de folhas foi um descritor morfológico ineficiente. O autor ainda salienta, no entanto, que deve ser tomado cuidado ao avaliar estas características morfológicas, pois, muitas vezes, seu alto polimorfismo pode ser uma resposta das interações do vegetal com o ambiente.

Com base na criteriosa avaliação destas características para todos os genótipos foi possível construir uma chave analítica dicotômica que possibilitou diferenciar todos os genótipos estudados ainda em fase juvenil, após três meses de aclimatização. Elaborações de chaves analíticas para identificação de

genótipos e variedades de plantas de amplo interesse comercial são raros, como por exemplo, o trabalho de Almeida, Rochelle e Crocomo (1995) com cana-de-açúcar, e de Seiffert (1984) com as espécies mais comuns de *Brachiaria* usadas em pastagens no país.

Chave para determinação dos genótipos:

1. Plantas esguias cujas folhas se inserem no pseudocaule  
com entrenós longos ..... 2  
Plantas compactas cujas folhas se inserem no pseudocaule  
Com entrenós curtos ..... 3
2. Plantas altas, em média maiores que 20 cm ..... 4  
Plantas baixas, em média menores que 20 cm .....6
3. Pseudocaule e pecíolo verdes ..... 5  
Pseudocaule e pecíolo avermelhados ..... PRATA ANÃ
4. Folhas de grande comprimento, em torno de 30 cm ..... 8  
Folhas em geral menores que 30 cm ..... 9
5. Nervura central da mesma cor do limbo ..... 7  
Nervura central avermelhada ..... PA42-44
6. Nervura central de coloração castanha .....TROPICAL

- Nervura central da mesma coloração do limbo ..... MAÇÃ
7. Folhas verde escuro opacas com manchas  
 castanhas abundantes ..... BUCANERO  
 Folhas verde médio a verde escuro, manchas  
 castanhas pouco abundantes ou até mesmo ausentes..... FHIA 02
8. Nervura central de coloração castanha .....THAP MAEO  
 Nervura central da mesma coloração do limbo .....CAIPIRA
9. Borda do limbo vermelha ..... 10  
 Borda do limbo castanha ..... NBA
10. Apresenta manchas nas folhas ..... 11  
 Não apresenta manchas nas folhas ..... PRINCESA
11. Nervura central predominantemente castanha ..... GARANTIDA  
 Nervura central verde nas folhas jovens e  
 avermelhada nas folhas maduras .....MALBUT

## **6 CONCLUSÃO**

A avaliação dos genótipos estudados permite a caracterização destes com base em características morfológicas da planta ainda em estágio juvenil proveniente de micropropagação e aclimatizada pelo período de três meses.

A chave analítica dicotômica obtida possibilita identificar estes genótipos desenvolvidos nestas condições antes de sua maturidade, assegurando a certificação do material e evitando erros na identificação.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.; ROCHELLE, L. A.; CROCOMO, O. J. Chave-analítica para determinação de dez variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 16-19, 1995.

AMORIM, E. P. et al. Variabilidade genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1045-1049, ago. 2008.

BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação in vitro de bananeira (*Musa* sp.) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 215-219, abr. 2001.

BRASIL. Lei nº 9456, de 25 de abril de 1997. Institui a proteção de cultivares e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, ano 85, n. 79, p. 8241-8246, 28 abr. 1997. Seção I.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for Banana (*Musa* spp.)**. Rome, 1996. 55 p.

LESSA, L. S. et al. Avaliação agronômica de híbridos diplóides de bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1716-1721, ago. 2009. Número especial.

MILACH, S. C. K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A. et al. (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 43-58.

MOHAMED, A. Morphological and molecular characterization of some banana micro-propagated variants. **International Journal of Agriculture and Biology**, New Jersey, v. 9, n. 5, p. 707-714, 2007.

NÓBREGA, J. P. R. **Produção de mudas de bananeira (*Musa* spp. AAB) em função da poda e doses de nitrogênio e boro**. 2006. 118 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areias, 2006.

ORTIZ, R. Morphological variation in *Musa* germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, n. 5, p. 393-404, Feb. 1997.

SANTOS, S. C. et al. Caracterização morfológica e avaliação de cultivares de bananeira resistentes a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* Morelet) no sudoeste goiano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 3, p. 449-453, maio/jun. 2006.

SEIFFERT, N. F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campina Grande: EMBRAPA, 1984. 74 p.

SILVA, S. O. et al. Germoplasma de banana. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1997. p. 61-84.

SILVA, S. O.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. Bananicultura irrigada: inovações tecnológicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 29, n. 245, p. 78-83, jul. 2008.

VAMOSI, J. A. N. A. et al. Pollination, floral display and the ecological correlates of polyploidy. **Functional Ecosystems and Communities**, Kagawa, v. 1, n. 1, p. 1-9, Apr. 2007.

**CAPÍTULO 3 CARACTERIZAÇÃO DA ANATOMIA FOLIAR DE  
ACESSOS DE BANANEIRA E SUA RELAÇÃO COM O NÍVEL DE  
PLOIDIA E GRUPOS GENÔMICOS**

## 1 RESUMO

A anatomia vegetal tem sido utilizada há muito como ferramenta de importante colaboração para a caracterização taxonômica de espécies, resolvendo impasses na sistemática de muitas famílias botânicas. Da mesma forma, a anatomia pode contribuir na descrição de cultivares, embora tenha sido pouco utilizada para este fim. Importantes culturas apresentam cultivares com diferentes níveis de ploidia, o que pode dificultar a escolha de materiais corretos para os cruzamentos nos programas de melhoramento. Sendo assim, é imprescindível que se conheça adequadamente a ploidia do material com o qual se deseja trabalhar. É reconhecido na literatura que o aumento do conteúdo de DNA nas plantas provoca uma série de efeitos na morfologia externa e interna, conhecidos em seu conjunto como efeito nucleotípico. Desta forma, a avaliação anatômica pode ser utilizada como ferramenta para a determinação da ploidia dos acessos vegetais, evitando a necessidade de empregar a complicada metodologia da contagem de cromossomos. O presente trabalho teve como objetivo, portanto, a caracterização anatômica de acessos de bananeira e a compreensão das relações entre estas características anatômicas e os níveis de ploidia e grupos genômicos. Foram avaliados 13 acessos de bananeira, entre diplóides, triplóides e tetraplóides provenientes de propagação *in vitro*, após 90 dias de aclimatização. Foram coletadas as folhas mais jovens, plenamente expandidas de cinco plantas para cada acesso, fixadas em FAA e conservados em álcool 70%. Foram realizados cortes transversais e paradérmicos das faces abaxial e adaxial e avaliados parâmetros como tamanho e densidade estomática, espessura do limbo foliar, nervura central, das epidermes, hipodermes e parênquimas. Pelos resultados obtidos, a espessura do limbo foliar, o tamanho e a densidade estomática mostram-se, com segurança, serem parâmetros adequados para a caracterização do nível de ploidia dos acessos de bananeira.

**Palavras-chave:** *Musa* sp. Caracterização. Anatomia. Ploidia. Efeito nucleotípico.

## 2 ABSTRACT

Anatomy has been used for a long time as a tool for taxonomic characterization, solving systematic problems in several botanic families. In the same way, anatomy can make a contribution in characterizing cultivars of important crops, despite the fact that it has been underused for this purpose. Some important crops have cultivars with different levels of ploidy and this fact can difficult the choice for the correct plant material at the breeding programs. With this in mind, it is necessary to know the correct ploidy of the plant material to work with. It is know that the increase in DNA content causes several morphological and anatomical effects in plants. The set of these effects is known as nucleotipic effect. It therefore allows the use of anatomical evaluation as a tool for ploidy determination in plant accesses, avoiding the laborious time-consuming methodology of chromosome counting. The present work aimed the anatomical characterization of banana accesses and the comprehension of the relations between anatomical features, ploidy level and genomic groups. Thirteen banana accesses, including diploids, triploids and tetraploids were used. After micropropagation process and acclimatization in greenhouse for a 90 days period, five leaves of each access were sampled and fixed in FAA and alcohol 70%. Transverse and longitudinal sections of the upper and lower leaf surfaces were made and evaluated for the following parameters – stomatal length and density, thickness of leaf and central vein, upper and lower epidermis and hypodermis thickness and palisade and spongy parenchyma thickness. Leaf thickness, stomatal length and density are likely good parameters for ploidy determination in banana accesses.

**Keywords:** *Musa* sp. Characterization. Anatomy. Ploidy. Nucleotipic Effect.

### 3 INTRODUÇÃO

O estudo comparativo da estrutura, anatomia e morfologia das plantas sempre se constituiu como questão central da sistemática, procurando elucidar a diversidade e filogenia dos vegetais (ENDRESS, BASS, GREGORY, 2000). A anatomia vegetal há muito teve seu valor reconhecido na contribuição ao campo da taxonomia. Isto se deve ao fato de que as variações que ocorrem dentro de cultivares, espécies, gêneros e famílias se refletem na histologia dos vegetais (AHMAD et al., 2011).

Contrastando com as avaliações morfológicas, os caracteres anatômicos vegetativos têm sido mais utilizados do que os caracteres florais. Isto se deve ao fato de que, havendo necessidade de novas informações para resolver um impasse taxonômico, ao se avaliar as estruturas internas de folhas, caules e raízes é possível obter uma informação diferente daquela obtida nos órgãos reprodutivos (STUESSY, 2009). Stuessy (2009) salienta que dados anatômicos de flores e frutos geralmente são bem correlacionados com os dados morfológicos, servindo apenas para apurar as informações obtidas, não oferecendo novas visões relativas ao problema taxonômico em questão.

Embora a maior parte da classificação dentro da família Musaceae tenha sido baseada em caracteres referentes às estruturas reprodutivas, alguns caracteres vegetativos deram sua contribuição, como a filotaxia, o tipo de rizoma e a estrutura de tricomas. Embora negligenciadas em taxonomia de níveis superiores (famílias e acima de famílias), as folhas apresentam-se como uma rica fonte de características taxonômicas. Esta negligência nas pesquisas encontra especial ênfase dentre as Monocotiledôneas. Poucas características foliares foram estudadas dentro deste grupo de forma a configurarem relevante material taxonômico (TRIPLETT; KIRCHOFF, 1991).

Nas folhas é possível se avaliar o pecíolo, a lâmina e os cotilédones em busca de informações taxonômicas. Entretanto, a maioria das informações de relevância provém da lâmina foliar. A epiderme e a hipoderme (quando presente) são fontes de inúmeras variações que compreendem conjunto de informações valiosas (STUESSY, 2009). Variações na espessura das paredes celulares e na cutícula, formato das células e organização e presença de cristais são informações relevantes encontradas nestes tecidos. O mesofilo também apresenta características taxonomicamente importantes como o número de camadas dos parênquimas paliádico e lacunoso, sua presença e disposição, a distribuição dos feixes vasculares, presença de fibras, cavidades de ar e cristais.

Mais recentemente, a anatomia quantitativa tem ganhado força no campo da taxonomia, sendo esta ferramenta de especial utilidade por possibilitar a verificação de diferenças que a simples descrição anatômica é incapaz de observar. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de fornecer uma contribuição anatômica à compreensão das relações filogenéticas de diversos taxa, com especial referência na literatura à família Poaceae (ALSCIONI; DENHAN, 2008, DENGLER et al., 1994, HANSEN et al., 2007). A maior parte dos estudos se concentra em gêneros e espécies de interesse econômico, em estudos voltados para programas de melhoramento genético (SARWAR; PRODHAN, 2000; UGA et al., 2009), principalmente relacionados à alguma resposta fisiológica (LORETO; CENTRITTO; CHARTZOULAKIS, 2003; NIKOPOULOS et al., 2002). Também são relativamente comuns os estudos fitopatológicos que envolvem anatomia na busca de compreender como diferentes características anatômicas influenciam na relação do parasito com o vegetal hospedeiro (VEJA et al., 2010). Por fim, uma área do conhecimento que tem se destacado na anatomia quantitativa é a zootecnia, com estudos das espécies forrageiras, com especial consideração aos trabalhos realizados no Brasil (BRITO; RODELLA, 2002; BRITO; RODELLA; DESCHAMPS, 2004).

Outra aplicação bastante usual da anatomia quantitativa tem sido a caracterização de cultivares em culturas que apresentam diferentes níveis de ploidia (BECK; DUNLOP; FOSSEY, 2003; SARI et al.; 1999). Estudos neste campo são de grande interesse para se compreender características adaptativas decorrentes de mudanças no conteúdo de DNA nos vegetais. A ampla ocorrência de poliplóides sugere alguma vantagem adaptativa destes materiais frente a seus progenitores diplóides (HULL-SANDERS et al., 2009), sendo de extrema importância para programas de melhoramento que a ploidia de seus materiais de interesse sejam aferidas precocemente e com precisão (VANDEHOUT et al., 1995).

Há muito se observou que o aumento do conteúdo de DNA gera um aumento do volume celular, que pode ser facilmente evidenciado em algumas estruturas dos vegetais, como no tamanho dos grãos de pólen e sementes, e no tamanho e densidade de estômatos e cloroplastos (ÇELIKLER; BILALOGU, 2001).

A verificação da ploidia de um vegetal é feita, preferencialmente, pela técnica de contagem de cromossomos, uma metodologia extremamente laboriosa e que exige mão de obra qualificada e um grande tempo para execução (SARI et al., 1999). Atualmente a técnica da citometria de fluxo tem se mostrado uma excelente alternativa para determinação da ploidia em espécies e cultivares vegetais. Contudo, a citometria de fluxo é uma técnica ainda cara, exigindo equipamentos e reagentes de alto valor, não sendo acessível para muitas instituições de pesquisa.

Desta forma, em muitos trabalhos, tem se optado pela determinação de ploidia através de características morfológicas e anatômicas, obtendo-se bons resultados. O conjunto destas alterações em características fenotípicas provenientes da variação do conteúdo de DNA é chamado de efeito nucleotípico. O DNA nuclear influencia o fenótipo, primeiramente, através da expressão dos

genes nele contidos, e em segundo lugar por afetar fisicamente a massa e o volume das células. Desta forma, as correlações entre o valor de C e tamanho e massa celular são todos conhecidos como efeitos nucleotípicos (ÇELIKER; BILALOGLU, 2001).

Muito pouca informação é encontrada na literatura com relação à anatomia do gênero *Musa*, principalmente no que se refere à caracterização de cultivares e compreensão do efeito da ploidia e combinação dos diferentes genomas (SUMARDI; WULANDARI, 2010; VANDEHOUT et al., 1995), tanto que os caracteres anatômicos não constam entre os recomendados pelo International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI (1996) como descritores para os cultivares de bananeira. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo oferecer uma contribuição ao estudo da anatomia foliar da bananeira, procurando caracterizar cultivares, e compreender as modificações causadas na histologia do vegetal relacionadas à ploidia e a presença dos diferentes genomas.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e casas de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados explantes constituídos de ápices caulinares de 13 acessos de bananeira de grupos genômicos e níveis de ploidia distintos (Tab. 1) provenientes da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Estes explantes foram cultivados *in vitro* em meio MS e mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa de  $36 \mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. O material foi multiplicado em meio MS por duas gerações, cada uma com duração de 30 dias. Posteriormente as plantas foram transferidas para estufa e acondicionadas em vasos de 0,5 L com substrato constituído de 1 parte de terra: 1 parte de areia: 1 parte de esterco sendo mantidas sob regime de nebulização intermitente e sombreamento de 50%. Semanalmente foram realizadas regas com meio MS líquido 50% sem adição de açúcar.

Após 90 dias de aclimatização foram coletadas cinco folhas mais jovens plenamente expandidas para cada acesso de bananeira. O material foi fixado em FAA e conservado em etanol 70%. As análises foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia.

Amostras coletadas entre o bordo e a nervura central na região mediana foram seccionadas em cortes transversais e paradérmicos (face abaxial e adaxial), submetidos à clarificação em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) e lavagem tríplice em água destilada. As secções transversais foram coradas com solução safrabau (safranina 1% e azul de astra 0,1% 7:3) e as secções paradérmicas coradas com safranina 0,1% e posteriormente montadas em lâminas semipermanentes com água glicerinada. O material foi observado em microscópio Ken-a-vision, fotografado e as medidas foram realizadas no

programa ImageTool (UTHSCSA *Image Tool* version 3.0). Foram avaliadas 16 secções transversais e 20 paradérmicas para cada acesso de bananeira.

Nas secções transversais foram avaliadas as espessuras do limbo na região da nervura central e na região do quarto feixe vascular, espessuras das epidermes superior e inferior, das hipodermes superior e inferior e dos parênquimas paliçádico e lacunoso, além de características descritivas qualitativas. Nas secções paradérmicas foram avaliados os comprimentos e diâmetros polar e equatorial das células-guarda dos estômatos, além da densidade estomática (número de estômatos por mm<sup>2</sup> de superfície foliar). Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância pelo programa Sisvar e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 representa imagens de limbo foliar, epiderme adaxial e abaxial de acessos diplóide (Malbut), triplóide (Prata Anã) e tetraplóide (Princesa) para uma visão geral da Anatomia.

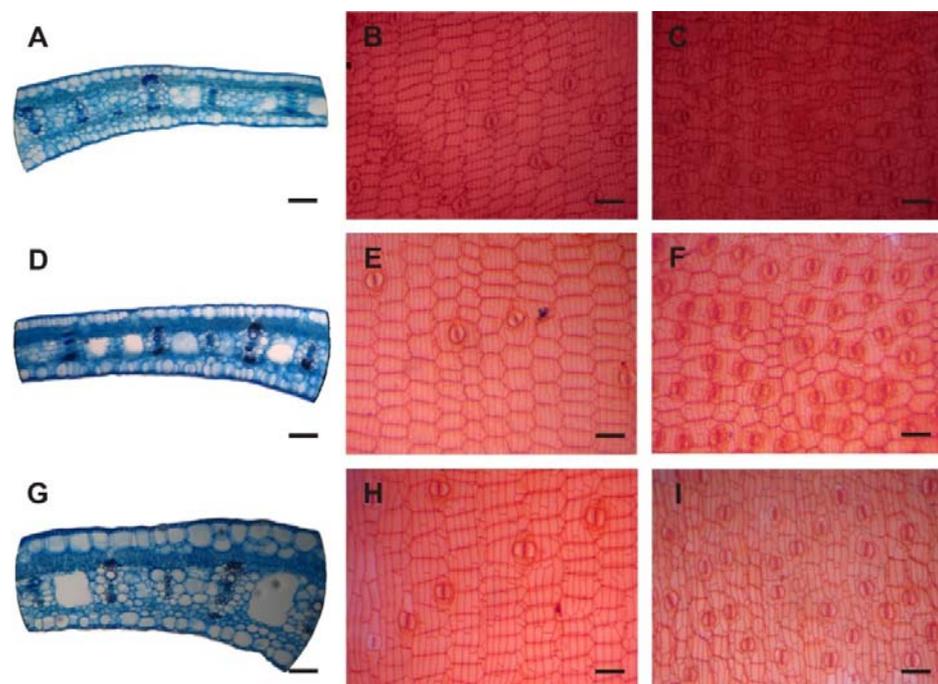


Figura 2 Fotomicrografias de acessos de bananeira com diferentes níveis de ploidia. A, B, C – acesso diplóide Malbut (limbo, face adaxial, face abaxial); D,E,F – acesso triplóide Prata Anã (limbo, face adaxial, face abaxial); G, H, I – acesso tetraplóide Princesa (limbo, face adaxial, face abaxial). Barras A, D e G de 150  $\mu\text{m}$ , demais barras de 100  $\mu\text{m}$ .

Com relação às medidas realizadas, a Tabela 2.1 apresenta os resultados para espessura do limbo medidos na nervura central e na região do quarto feixe vascular contado a partir da nervura central.

Tabela 2.1 Medidas da espessura ( $\mu\text{m}$ ) do limbo na região da nervura central e do quarto feixe vascular de diferentes acessos de bananeira.

Acessos	Genoma	Nervura	Limbo
Malbut	AA	168,38 D	137,18 D
NBA	AA	142,39 F	142,20 D
Caipira	AAA	155,44 E	150,80 C
Thap Maeo	AAB	210,66 B	192,59 A
Prata Anã	AAB	163,16 D	170,45 C
Maçã	AAB	170,71 C	151,59 C
FHIA 02	AAAB	258,19 A	197,88 A
Bucanero	AAAA	192,50 C	205,47 A
Princesa	AAAB	202,37 C	177,02 B
Garantida	AAAB	198,00 C	202,35 A
Tropical	AAAB	176,44 D	201,06 A
102	AAAB	165,18 D	155,89 C
PA42-44	AAAB	218,09 B	178,96 B
C.V.(%)		4,90	6,48

Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados observados para a espessura da nervura central apesar de mostrarem diferenças significativas ( $P > 0,0001$ ) não representou um bom parâmetro para separar os acessos de bananeira de acordo com a ploidia. A cultivar tetraplóide 'FHIA 02' apresentou a maior espessura para nervura central, com um valor de 258,19  $\mu\text{m}$ , bem acima o observado para os demais acessos. O restante dos acessos tetraplóides apresentou uma variação muito grande no parâmetro avaliado, com valores entre 218,09  $\mu\text{m}$  para a cultivar PA42-44 e 165,18  $\mu\text{m}$  para o genótipo 102.

Estes valores apresentaram sobreposição com os valores observados para os acessos triplóides e até mesmo diplóides, como Malbut que apresentou espessura da nervura de 168,38  $\mu\text{m}$ .

A medida da espessura do limbo aferida na altura do quarto feixe de vasos se mostrou um parâmetro adequado para caracterização dos acessos de acordo com a ploidia. A análise estatística mostrou diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ) e separou os acessos em quatro grupos diferentes, sendo os dois primeiros grupos com as maiores medidas de espessura de limbo foliar formados pelos acessos tetraplóides, um grupo intermediário formado pelos acessos triplóides e um grupo com menores valores de espessura de limbo para os acessos diplóides.

Ao contrário do observado para a medida de espessura da nervura central, não houve sobreposição de valores entre os acessos de diferentes ploidias, com exceção para a cultivar triplóide Thap Maeo, que apresentou um valor característico de uma cultivar tetraplóide e a cultivar tetraplóide 102, que apresentou um valor característico para as cultivares triplóides.

Pelos resultados observados tanto para a espessura do limbo na nervura central quanto no quarto feixe, não foi possível inferir nenhuma relação da presença dos genomas A e B com uma alteração na espessura do limbo foliar.

De forma geral, as cultivares triplóides, apesar do relativamente limitado número de acessos avaliados, mostraram uma grande variação nos valores observados, tendo a cultivar Thap Maeo apresentado valores elevados e a cultivar Caipira valores baixos para o parâmetro espessura do limbo foliar.

Como esperado, a espessura do limbo foliar mostrou relação com a ploidia. Jellings e Leech (1984), entretanto, avaliando diferentes cultivares de trigo observaram que nem sempre os valores da espessura da folha e dos tecidos se correlacionavam adequadamente para todos os acessos estudados. As autoras propuseram, então, que o efeito nucleotípico combina-se com o efeito genético,

criando uma “identidade” anatômica para cada genótipo, ou seja, a imposição dos efeitos genéticos sobre os principais efeitos relacionados ao tamanho do genoma modula a estrutura interna da folha.

Um aspecto interessante dos estudos anatômicos quantitativos é a sua relação com aspectos fisiológicos. Segundo Jellings e Leech (1982) estudos da bioquímica e metabolismo das células do mesófilo e dos cloroplastos só devem ser realizados após a investigação da anatomia foliar da espécie. As autoras salientam que, em estudos comparativos de padrões estruturais da folha e mudanças no funcionamento, um cuidado extra deve ser tomado, analisando-se a estrutura anatômica como um complexo de componentes interligados e não somente partes separadas.

Um exemplo interessante da relação da estrutura anatômica com características fisiológicas são os estudos realizados para analisar a capacidade fotossintética em cultivares que apresentam diferentes níveis de ploidia. A literatura é relativamente rica neste assunto e os resultados bastante contraditórios. Em um primeiro momento é esperado que, com o aumento do tamanho das células em níveis de ploidia maiores, ocorra um acréscimo na assimilação de CO<sub>2</sub>, entretanto esta relação não é observada em todas as culturas. Romero-Aranda et al. (1997) trabalhando com cultivares de *Citrus* com diferentes níveis de ploidia encontrou um aumento no volume celular, de conteúdo de clorofila e de enzimas da rota fotossintética quando comparando as cultivares tetraplóides com as diplóides, porém este acréscimo nestes parâmetros em nada influenciou a capacidade de assimilação do CO<sub>2</sub>. Os autores, assim como Jellings e Leech (1982, 1984) afirmam que, pelos resultados observados na literatura, existe um infinidade de outros fatores que influenciam a relação entre ploidia, características anatômicas e respostas fisiológicas, sendo impossível prever uma correlação entre estes elementos para todas as espécies. Por exemplo, um aumento no volume celular e no conteúdo de clorofila não será

suficiente para aumentar a taxa fotossintética em cultivares com maiores níveis de ploidia se ocorrer um aumento na resistência à difusão do CO<sub>2</sub>. Infelizmente, a literatura carece de informações referentes às relações da anatomia e comportamento fisiológico na cultura da bananeira.

A Tabela 2.2 apresenta os resultados das medidas obtidas para alguns dos tecidos observados no limbo foliar. Foram avaliadas as espessuras das epidermes abaxial (E. Ab.) e adaxial (E. Ad.), das hipodermes abaxial (H. Ab.) e adaxial (H. Ad.) e dos parênquimas paliçádico (P.P.) e lacunoso (P.L.).

Tabela 2.2 Medidas de espessura ( $\mu\text{m}$ ) de alguns tecidos do limbo foliar de acessos de bananeira com diferentes níveis de ploidia<sup>1</sup>.

<i>Genótipo</i>	<i>Características</i> <sup>2</sup>					
	E. Ab.	E. Ad.	H. Ab.	H. Ad.	P.P.	P.L.
Malbut	6,42 C	7,10 C	20,85 D	21,05 C	26,37 D	21,44 B
NBA	6,94 C	8,07 B	19,22 D	24,17 C	28,99 D	22,04 B
Caipira	6,31 C	6,69 C	26,05 C	26,03 B	29,31 D	20,90 B
ThapMaeo	7,23 C	8,60 B	37,55 A	23,79 C	36,90 B	28,04 A
Prata Anã	7,33 C	9,44 A	24,71 C	31,08 B	45,18 A	24,64 A
Maçã	7,74 B	8,13 B	22,10 D	23,39 C	31,68 C	21,06 B
FHIA 02	7,75 B	9,69 A	23,17 D	23,89 C	43,57 A	25,33 A
Bucanero	8,37 B	9,97 A	31,85 B	27,05 B	37,51 B	22,39 B
Princesa	7,34 C	9,89 A	23,87 D	27,36 B	33,43 C	17,57 B
Garantida	7,88 B	10,61 A	25,88 C	42,01 A	40,20 B	23,21 B
Tropical	9,42 A	10,79 A	27,25 C	28,57 B	43,37 A	26,94 A
102	7,07 C	8,38 B	27,98 C	28,38 B	33,62 C	19,03 B
PA42-44	6,58 C	7,75 B	23,88 D	29,71 B	40,40 B	21,87 B
C.V.(%)	15,46	14,31	17,64	12,66	13,04	17,68

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>E. Ab. – Epiderme abaxial, E. Ad. – Epiderme adaxial, H. Ab. – Hipoderme abaxial, H. Ad. – Hipoderme adaxial, P.P. – Parênquima paliçádico, P.L. – Parênquima lacunoso.

Pelos resultados obtidos pode-se observar que a espessura das epidermes abaxial e adaxial não apresentou uma relação com o nível de ploidia dos acessos avaliados. Com relação à espessura da epiderme abaxial, a cultivar tetraplóide Tropical se destacou de todos os demais acessos com o maior valor. No restante dos acessos houve sobreposição em todos os níveis de ploidia tendo,

por exemplo, o genótipo NBA apresentou uma epiderme mais espessa (6,94  $\mu\text{m}$ ) que a cultivar tetraplóide PA42-44 (6,58  $\mu\text{m}$ ). Os valores para espessura da epiderme adaxial se apresentaram um pouco menos sobrepostos, entretanto, não foram capazes de caracterizar os acessos de acordo com a ploidia. Sumardi e Wulandari (2010) também não encontraram em seu estudo com cultivares de bananeira da Indonésia relação entre ploidia e espessura da epiderme.

A epiderme adaxial se mostrou mais espessa que a epiderme abaxial para todos os acessos de bananeira avaliados. Uma hipótese para explicar este fato é de que plantas cultivadas em regiões tropicais são submetidas a um elevado nível de irradiância. Sabe-se que as células da epiderme apresentam pigmentos não-fotossintetizantes, como as antocianinas, e estes pigmentos ao absorverem o excesso de irradiância, evitam que ocorram danos aos fotossistemas e, por conseguinte, produção de espécies reativas de oxigênio (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1992).

A epiderme foliar, segundo Ahmad et al. (2010) é um dos caracteres anatômicos mais importantes para estudos taxonômicos, tendo sua contribuição esclarecido dúvidas sobre a sistemática de muitas famílias botânicas. Sendo assim, a epiderme também pode ser uma importante ferramenta para caracterização de cultivares, como no estudo realizado por Wilkins e Sabanci (1990) que utilizaram características da epiderme foliar para diferenciar cultivares de azevém perene com diferentes níveis de ploidia, porém com períodos de floração semelhantes. Apesar de todos os resultados de trabalhos que encontraram na medida da epiderme foliar uma característica taxonômica importante, o presente estudo não confirmou estes dados para bananeira.

As espessuras das hipodermes abaxial e adaxial, assim como as epidermes, não apresentaram uma correlação com a ploidia dos acessos avaliados. Tanto para hipoderme abaxial quanto na adaxial houve sobreposição dos valores das médias para todos os níveis de ploidia. A hipoderme, no entanto, apresenta

um valor taxonômico importante em muitas espécies, como salientado por Payne e Peterson (1973). Como anteriormente mencionado, alguns acessos apresentaram hipodermes com uma camada de células e outros acessos com duas camadas neste estudo. Este tipo de informação pode ser fundamental quando se deseja caracterizar cultivares que apresentam grandes semelhanças.

A espessura do parênquima lacunoso não apresentou uma correlação com os níveis de ploidia dos acessos avaliados. Por sua vez, a espessura do parênquima paliçádico foi capaz de diferenciar os genótipos diplóides dos demais acessos. Interessante notar que a cultivar triplóide Caipira não apresentou diferença estatística com relação aos genótipos diplóides, fato este repetido em outros parâmetros avaliados como espessura das epidermes, hipodermes, parênquimas e espessura da nervura central.

A proporção da espessura dos parênquimas clorofilianos (paliçádico + esponjoso) no limbo é, em média, 33,91%. As cultivares tetraplóides Princesa e Bucanero apresentaram valores inferiores, com médias de 28,81% e 29,15%, respectivamente, e a cultivar triplóide Prata Anã apresentou um valor superior, com média de 40,96% da espessura do limbo sendo formada por clorênquima. Apesar de os parênquimas paliçádico e lacunoso serem os tecidos fotossintetizantes por excelência, não é possível inferir uma maior capacidade fotossintética para os acessos com maior proporção destes tecidos, pois, como já foi observado anteriormente, esta correlação não é positiva para todas as culturas.

A Tabela 2.3 representa os resultados obtidos para a densidade estomática (D. Ab. e D. Ad.) e diâmetros polar (P.) e equatorial (E.) para as faces adaxial e abaxial dos acessos de bananeira.

Tabela 2.3 Densidade estomática, diâmetro polar e equatorial das faces abaxial e adaxial de acessos de bananeira com diferentes níveis de ploidia<sup>1</sup>.

<i>Genótipos</i>	<i>Características</i> <sup>2</sup>					
	D. Ab.	D. Ad.	P. Ab	E. Ab	P. Ad.	E. Ad.
Malbut	119,57 A	31,57 A	21,52 E	12,36 D	23,74 D	11,23 E
NBA	82,43 B	23,57 B	22,37 E	14,63 C	23,74 D	12,78 D
Caipira	73,29 C	15,86 D	25,01 D	15,07 C	31,34 C	15,04 C
ThapMaeo	60,57 D	24,00 B	29,80 C	15,64 C	32,06 C	17,63 B
Prata Anã	73,43 C	29,57 A	30,63 C	15,36 C	32,08 C	16,74 B
Maçã	88,86 B	15,57 D	28,25 D	16,11 C	31,65 C	16,05 B
FHIA 02	73,43 C	22,14 B	32,38 B	19,48 A	37,36 A	19,69 A
Bucanero	64,71 D	22,29 B	35,27 A	17,89 B	39,08 A	18,81 A
Princesa	58,00 D	15,86 D	33,81 A	17,67 B	37,48 A	17,60 B
Garantida	65,14 D	19,43 C	30,95 C	18,44 B	33,84 B	17,23 B
Tropical	54,43 D	19,86 C	34,34 A	19,50 A	37,74 A	18,74 A
102	69,43 C	18,43 C	30,79 C	17,54 B	34,95 B	17,36 B
PA42-44	75,86 C	23,14 B	32,67 B	19,33 A	37,10 A	19,65 A
C.V.(%)	15,44	19,78	7,60	11,69	7,84	10,13

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> D. Ab. – Densidade estomática abaxial, D. Ad. – Densidade estomática adaxial, P. Ab. – Diâmetro polar abaxial, P. Ad. – Diâmetro polar adaxial, E. Ab – Diâmetro equatorial abaxial, E. Ad. – Diâmetro equatorial adaxial.

Com relação aos estômatos, as folhas de bananeira são caracterizadas como anfihipoestomáticas, apresentando estômatos nas duas faces, porém em

maior quantidade na face abaxial. Como esperado, a densidade estomática apresentou uma correlação negativa com a ploidia dos acessos de bananeira. Isto se deve ao fato de que um dos efeitos nucleotípicos verificados com o aumento da ploidia é o aumento do tamanho dos estômatos e, por conseguinte, a redução de sua densidade. A densidade estomática da face abaxial mostrou resultados bastante robustos com relação à ploidia dos acessos verificados, sendo encontradas as maiores densidades nos acessos com menor ploidia, com especial referência ao genótipo Malbut, e as menores densidades observadas nos acessos tetraplóides. Duas exceções, no entanto, foram encontradas: a cultivar triplóide Thap Maeo, que apresentou uma densidade estomática comparada à dos acessos tetraplóides e a cultivar triplóide Maçã, que apresentou uma densidade bastante elevada, comparada à do genótipo diplóide NBA. As cultivares triplóides apresentaram sobreposição com valores de acessos tetraplóides e diplóides em várias características anatômicas avaliadas, dificultando um pouco a compreensão dos efeitos de ploidia na anatomia em bananeira.

As medidas de comprimento dos diâmetros polar e equatorial, por sua vez, mostraram uma relação adequada com a ploidia dos acessos avaliados, podendo ser consideradas um parâmetro adequado para a avaliação de ploidia e genoma em materiais de bananeira. Em geral, os acessos diplóides, triplóides e tetraplóides foram satisfatoriamente separados pela combinação da avaliação dos parâmetros de medida estomáticos.

Simmonds (1948) e Vandehout et al. (1995) avaliando a relação de características anatômicas e ploidia de acessos de bananeira, sugerem que as medidas sejam realizadas na face adaxial da folha, pela facilidade de contagem e medidas, uma vez que a face adaxial apresenta menor quantidade de estômatos. Entretanto, Vandehout et al. (1995) não encontraram uma boa relação da ploidia com a densidade estomática. No presente estudo, os resultados encontrados na face adaxial também não revelaram ser um bom parâmetro para avaliação da

ploidia. Talvez o número reduzido de estômatos encontrado nas amostras avaliadas da face adaxial, apesar de tornar o trabalho mais fácil, não evidencie bons resultados, sendo recomendado que estas avaliações de densidade sejam feitas também na face abaxial.

Os autores acima mencionados relatam que, geralmente, são encontrados alguns resultados discrepantes quando avaliada a relação da ploidia com efeitos nucleotípicos, acreditando que exista um efeito genético que atua sobre estas características, sendo significativa a contribuição do genótipo no resultado final e, por isto, muitas vezes alguns acessos apresentam valores diferentes do esperado.

Simmonds (1948) acredita que a avaliação estomática seja uma ferramenta valiosa para a determinação de ploidia em acessos de bananeira, sugerindo que, ao invés de se procederem inúmeras e trabalhosas contagens cromossômicas que sejam realizadas, primeiramente, as contagens estomáticas e só então algumas contagens cromossômicas dentro dos grupos de diferentes ploidias para confirmação, de preferência nos materiais que apresentarem informações duvidosas. Procedendo desta forma, seriam obtidos resultados confiáveis, em um menor período de tempo e com menor gasto de recursos e mão de obra.

## **6 CONCLUSÃO**

As relações de aumento do conteúdo de DNA celular e características anatômicas não apresentam uma correlação perfeita para todos os itens avaliados. Desta forma, com base nos resultados avaliados, recomenda-se utilizar para estudos de anatomia e ploidia em bananeira os valores de espessura de limbo e tamanho e densidade estomática.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, F. et al. Foliar epidermal anatomy as an aid to the identification of grasses in tribe Aveneae (subfamily Pooideae, Poaceae) from salt range of Pakistan. **Journal of Medicinal Plant Research**, New Jersey, v. 5, n. 1, p. 81-87, Feb. 2011.
- ALISCIONI, S.; DENHAM, S. Rachis of the genus *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): anatomy and taxonomic significance of the primary branches of the inflorescences. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, London, v. 15, n. 1, p. 60-76, Jan. 2008.
- BECK, S.; DUNLOP, L.; FOSSEY, A. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). **Botanical Journal of Linnaen Society**, London, v. 141, n. 2, p. 177-181, Feb. 2003.
- BRITO, C. A. de; RODELLA, R. Caracterização morfo-anatômica da folha e do caule de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 221-228, mar./abr. 2002.
- BRITO, C. A. de; RODELLA, R.; DESCHAMPS, C. Anatomia quantitativa da folha e do colmo de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 3, p. 519-528, maio/jun. 2004.
- ÇELIKLER, S.; BILALOGLU, R. Nucleotipic effects in different genotypes of *Vicia faba* L. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 25, n. 4, p. 205-219, June 2001.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, n. 6, p. 599-626, June 1992.
- DENGLER, N. et al. Quantitative leaf anatomy of C3 and C4 grasses (Poaceae): bundle sheath and mesophyll surface area relationships. **Annals of Botany**, London, v. 73, n. 3, p. 241-255, June 1994.

- ENDRESS, P.; BAAS, P.; GREGORY, M. Systematic plant morphology and anatomy: 50 years of progress. **Taxon**, Utrecht, v. 49, n. 3, p. 401-434, 2000.
- HANSEN, D. et al. Clone-specific differences in *Phragmites australis*: effects of ploidy level and geographic origin. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 269-279, June 2007.
- HULL-SANDERS, H. et al. Effects of polyploidy on secondary chemistry, physiology, and performance of native and invasive genotypes of *Solidago gigantea* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 96, n. 4, p. 762-770, Aug. 2009.
- INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE.  
**Descriptors for Banana (*Musa spp.*)**. Rome, 1996. 55 p.
- JELLINGS, A.; LEECH, R. Anatomical variation in first leaves of nine Triticum genotypes, and its relationship to photosynthetic capacity. **New Phytologist**, Cambridge, v. 96, n. 3, p. 371-384, Mar. 1984.
- \_\_\_\_\_. The importance of quantitative anatomy in the interpretation of whole leaf biochemistry in species of Triticum, Hordeum and Avena. **New Phytologist**, Cambridge, v. 92, n. 1, p. 39-48, Sept. 1982.
- LORETO, F.; CENTRITTO, M.; CHARTZOULAKIS, K. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 595-601, Apr. 2003.
- NIKOLOPOULOS, D. et al. The relationship between anatomy and photosynthetic performance of heterobaric leaves. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, n. 1, p. 235-243, May 2002.
- PAYNE, W.; PETERSON, K. Observations on hypodermis of ferns. **American Fern Journal**, Washington, v. 63, n. 2, p. 34-42, 1973.
- ROMERO-ARANDA, R. et al. Leaf characteristics and net gas exchange in diploid and autotetraploid Citrus. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 2, p. 153-160, Feb. 1997.
- SARI, N. et al. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, n. 3/4, p. 265-277, Dec. 1999.

SARWAR, A.; PRODHAN, A. Variation in stem anatomy of rice cultivars. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 32, n. 2, p. 259-264, Apr. 2000.

SIMMONDS, N. Genetical and cytological studies of *Musa*. X Stomatal size and plant vigour in relation to polyploidy. **Journal of Genetics**, Balgalore, v. 49, p. 57-68, 1948.

STUESSY, T. **Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data**. Columbia: Columbia University, 2009. 539 p.

SUMARDI, I.; WULANDARI, M. Anatomy and morphology of five Indonesian banana cultivars (*Musa* spp.) of different ploidy levels. **Biodiversitas**, Surakarta, v. 11, n. 4, p. 167-175, 2010.

TRIPLETT, J.; KIRCHOFF, B. Lamina architecture and anatomy in the Heliconiaceae and Musaceae (Zingiberales). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 4, p. 887-900, Apr. 1991.

UGA, Y. et al. Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. **Breeding Science**, Tokyo, v. 59, n. 1, p. 87-93, Feb. 2009.

VANDERHOUT, H. et al. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 83, n. 2, p. 117-122, Mar. 1995.

VEGA, C. de et al. Anatomical relations among endophytic holoparasitic angiosperms, autotrophic host plants and mycorrhizal fungi: a novel tripartite interaction. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 97, n. 5, p. 730-737, May 2010.

WILKINS, P.; SABANCI, C. Genetic variation in leaf epidermal cell size and shape in *Lolium perenne*. **Euphytica**, Wageningen, v. 47, n. 3, p. 233-239, June 1990.

**CAPÍTULO 4 ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE DNA DE  
DIFERENTES ACESSOS DE BANANEIRA PELA TÉCNICA DE  
CITOMETRIA DE FLUXO**

## 1 RESUMO

A citometria de fluxo tem se destacado nas últimas décadas como uma técnica confiável para a determinação do conteúdo de DNA em espécies vegetais. Baseando-se nesta tecnologia é possível determinar a ploidia em espécies de um mesmo gênero ou em cultivares de uma mesma espécie. A determinação da ploidia é muito importante, principalmente em programas de melhoramento genético quem envolvem poliplóides, a fim de possibilitar a escolha adequada dos materiais vegetais com os quais se deseja trabalhar. A relação do conteúdo de DNA de acessos de bananeira e sua ploidia ainda permanece controversa na literatura, assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o conteúdo de DNA de acessos de bananeira com diferentes níveis de ploidia. Foram avaliados seis acessos tetraplóides, quatro triplóides e quatro diplóides. Foram trituradas entre 50-60 mg de folhas frescas juntamente com o padrão interno (*Pisum sativum*) no tampão LB01 e posteriormente as amostras foram filtradas em gaze e filtro de 50  $\mu\text{m}$ . Adicionaram-se 5  $\mu\text{L}$  de RNase e 25  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídeo. Para cada amostra foram analisados 10 mil núcleos, com três repetições. Os resultados obtidos para o conteúdo de DNA permitem estimar o tamanho dos genomas A e B, sendo o primeiro cerca de 11% maior que o segundo. Entretanto, em razão da elevada sobreposição de valores que os acessos apresentam, não foi possível encontrar uma boa relação entre o conteúdo de DNA e a ploidia dos materiais. Isto pode ocorrer por várias razões, entre estas, questões referentes à técnica em si, ou ao próprio material vegetal, cuja propagação vegetativa pode ter interferido grandemente na quantidade de DNA, assim como o isolamento geográfico de certos genótipos e as variações do conteúdo próprias dos processos moleculares, como mutações e adaptações aos fatores ambientais.

**Palavras-chave:** *Musa* sp. Caracterização. Conteúdo de DNA. Ploidia. Citometria de fluxo.

## 2 ABSTRACT

Flow cytometry has received great attention in DNA content determination studies in the last decades. Several applications have been developed based on the technique's potentialities. One of the major applications of flow cytometry has been ploidy determination in species and cultivars. Ploidy determination is very important, especially in breeding programs, to allow the correct choice of plant material for work. The relation between DNA content and ploidy level still has some controversies in literature, so the present work had the aim of evaluate DNA content in banana accesses with different ploidy levels. Data were evaluated from six tetraploid accesses, four triploids and four diploids. 50-60 mg of leave material were crushed with material from internal standard (*Pisum sativum*) in LB01 buffer and then filtered through gauze and 50  $\mu\text{m}$  filter. It was added 5  $\mu\text{L}$  of RNase and 25  $\mu\text{L}$  of propide iodate. For each sample 10 thousand nuclei were analyzed with three repetitions. The DNA content results allowed separating genome A and B. Genome A appeared to be 11% major than genome B. However, the high values overlapping could not elucidate properly the relation between DNA content and ploidy level. Several reasons could explain this fact, like technique issues or the plant material itself. Banana's vegetative propagation can influence in the DNA content as well as the geographical isolation of certain genotypes, and the variation of DNA content caused by molecular processes like mutations and environmental adaptations.

**Keywords:** *Musa* sp. Characterization. DNA content. Ploidy. Flow cytometry.

### 3 INTRODUÇÃO

A quantidade de DNA nuclear pode variar até 80.000 vezes dentro dos organismos eucariontes, porém esta variação não necessariamente está ligada ao número de genes ou com o aumento da complexidade do organismo. Esta constatação levou a formulação de um conceito conhecido como paradoxo C, uma vez que C é o símbolo utilizado para definir a quantidade de DNA do genoma haplóide de um organismo (GREILHUBER et al., 2005).

Assim sendo, o conteúdo de DNA de diferentes espécies vegetais pode variar imensamente, como tem sido apresentado na literatura. Os dados de inúmeros estudos mostram diferenças de até 600 vezes, como no caso do conteúdo de DNA de *Arabidopsis thaliana*, que compreende 0,2 pg até o genoma da liliácea *Fritillaria assyriaca* Baker, que atinge 127,4 pg (BENNET; LEITCH, 1997). E estes valores podem ser até maiores, pois constantemente são publicadas listagens com novos resultados. Estas grandes variações são encontradas dentro de gêneros e até mesmo espécies. A variação dentro de um gênero pode ser decorrente de diferenças na ploidia, presença de heterocromatina ou cromossomos extranumerários. Porém, espécies com a mesma ploidia podem apresentar quantidades de DNA bastante variadas como é o caso dos diplóides de *Vicia* que apresentam diferenças de até seis vezes no tamanho do genoma (GREILHUBER, 2005).

Existe, atualmente, uma grande controvérsia nesta área da ciência no que diz respeito aos resultados encontrados nos primeiros estudos sobre o conteúdo de DNA e os estudos mais atuais. Isto se deve, principalmente, ao refinamento que as técnicas e aparelhos têm sofrido ao longo dos anos, gerando dados mais precisos e que hoje vão de encontro ao que consta na literatura mais antiga (OCHATT; PATAT-OCHATT; MOESSNER, 2011).

A informação gerada pela determinação do conteúdo de DNA, bem como do nível de ploidia pode ser usada em uma grande variedade de áreas da ciência como ecologia, fisiologia, desenvolvimento, paleontologia, biologia molecular, sistemática e evolução. Mais recentemente, estudos têm apontado esta ferramenta como sendo de grande relevância para a compreensão da biodiversidade do genoma (BENNET; LEITCH, 1997).

Com o intuito de se determinar a ploidia e, posteriormente, o conteúdo de DNA dos vegetais, várias técnicas foram desenvolvidas ao longo do tempo. Ochatt, Patat-Ochat e Moessner (2011) faz uma revisão destas metodologias e aqui serão citados os principais pontos. Inicialmente os estudos para determinação de ploidia eram realizados exclusivamente com base em estudos de cariótipo mediante a contagem de cromossomos em metáfase. Porém, esta é uma técnica laboriosa, que consome tempo e que necessita de pessoal treinado e tecidos adequados. Outras técnicas indiretas também foram propostas e utilizadas como, por exemplo, a densidade e tamanho de estômatos nas folhas, tamanhos de grãos de pólen e de células. Entretanto, estas técnicas não se mostraram confiáveis se utilizadas isoladamente.

Nos últimos anos uma técnica que tem sido consagrada para a determinação do conteúdo de DNA e, por conseguinte, o nível de ploidia, é a citometria de fluxo. A citometria tem conquistado espaço na área vegetal pela facilidade com que a técnica oferece informações valiosas sobre inúmeros aspectos relacionados ao genoma, bem como a características celulares.

A citometria de fluxo é um processo no qual características físicas e/ou químicas de uma única partícula podem ser medidas. Nesta técnica, as medidas são feitas enquanto inúmeras partículas em suspensão passam individualmente através de um foco de luz, gerando pulsos de luz refletida e fluorescência, que são coletadas e convertidas em pulsos de corrente elétrica por sensores ópticos. Esta medida em fluxo permite análises em alta velocidade ( $10^2$ - $10^3$  partículas/s),

com seleção aleatória de partículas de uma população inteira sem nenhuma tendência. Desta forma, populações grandes podem ser avaliadas em um curto espaço de tempo e presenças de subpopulações podem ser detectadas (DOLEZEL; BARTOS 2005).

O primeiro trabalho com o uso da citometria de fluxo em vegetais data de 1973, quando Heller verificou sinais de fluorescência de núcleos isolados de *Vicia faba*. Porém, principalmente em razão da laboriosa técnica de isolamento de núcleos proposta por Heller, a citometria de fluxo foi deixada de lado em estudos na área vegetal.

Somente uma década depois os cientistas voltaram a aplicar a citometria de fluxo nos estudos com vegetais, na busca da estimativa do conteúdo de DNA. Primeiramente foram testados protocolos utilizando a célula inteira, os quais logo foram descartados pelo fato de as paredes celulares serem autofluorescentes e as células completas apresentarem formatos irregulares, o que prejudica a resposta do aparelho. Posteriormente as pesquisas focaram em protocolos eficientes para eliminar as paredes e quantificar o DNA a partir dos protoplastos, que são esféricos e se comportam de forma adequada no líquido utilizado. Entretanto, esta técnica também não se mostrou promissora, em razão da série de compostos fluorescentes (principalmente clorofilas) que se apresentam no citoplasma e mascaram a resposta esperada para a quantificação do DNA (DOLEZEL e BARTOS, 2005).

Por fim, em 1983 foram propostos dois protocolos para o isolamento do núcleo: um por Puite e Tenbroeke e o outro por Galbraith e colaboradores.

Apesar da eficiência e boa qualidade dos histogramas, o primeiro protocolo de Puite e Tenbroeke se mostrou muito laborioso e demorado, além de não se aplicar a todas as espécies ou tecidos, o que acabou levando a técnica de Galbraith a ser adotada amplamente, pela sua simplicidade: a suspensão de núcleos era obtida triturando uma pequena quantidade de tecido fresco em um

tampão hipotônico suplementado com um detergente não-iônico (DOLEZEL e BARTOS, 2005).

Desde então, a citometria de fluxo tem sido explorada em múltiplas aplicações. As mais conhecidas são os estudos de determinação de conteúdo de DNA de espécies, a análise de ploídias e todas as implicações destas informações.

A citometria de fluxo também tem sido bastante empregada com o propósito de compreender a variação de conteúdo de DNA intraespecífico. A relação do conteúdo de DNA e a seleção por determinadas cultivares dentro de uma espécie é discutida por Greilhuber (2005) onde o autor especula que, pelo fato do tamanho do DNA interferir no tamanho das células e no ciclo celular, plantas com genoma menor apresentariam desenvolvimento mais curto e, por conseguinte, estariam sendo selecionadas ao longo da evolução da agricultura.

Os materiais selvagens e cultivados de banana e plátano apresentam uma variação em seu nível de ploidia, podendo ser diplóides ( $2n = 2x = 22$ ), triplóides ( $2n = 3x = 33$ ) e tetraplóides ( $2n = 4x = 44$ ). Simmonds e Shepperd (1955) exploram as possibilidades dos caminhos evolutivos que levaram ao surgimento da diversidade dentro do complexo *Musa*. Os autores relatam que é provável que os atuais materiais tenham tido origem por hibridização intra e interespecífica natural das espécies diplóides *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*. Estes autores definiram uma série de características morfológicas que diferenciavam *M. acuminata* de *M. balbisiana* e atribuíram valores para estas características, a fim de descobrir a contribuição de cada genoma na formação dos híbridos.

Dentro deste contexto de diversidade do complexo *Musa*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o conteúdo de DNA de genótipos e cultivares de bananeira, comparar com o grau de ploidia conhecido destes

materiais e compreender sobre a contribuição dos diferentes genomas no conteúdo de DNA.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis acessos tetraplóides, quatro triplóides e quatro genótipos diplóides, com diferentes níveis de ploidia e combinações dos genomas A e B. Este material vegetal é oriundo da Embrapa Mandioca e Fruticultura e foi cultivado *in vitro*, posteriormente aclimatizado em casa de vegetação por 90 dias. Após este período foram coletadas as amostras para realização das análises de citometria de fluxo.

Foram utilizados aproximadamente 50 – 60 mg de folhas jovens de cada planta analisada, juntamente com uma amostra correspondente do padrão interno, neste caso, a ervilha (*Pisum sativum* – 9,09 pg de DNA). Este material foi triturado com auxílio de um bisturi, em placa de Petri, contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação de núcleos. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze com o auxílio de pipeta plástica e então filtrada em filtros de malha de 50 µm. Esta suspensão foi mantida em um recipiente com gelo para que não houvesse deterioração dos núcleos. Em seguida foram adicionados à suspensão 25 µL do fluorocromo iodeto de propídeo e 5 µL de RNase a cada amostra. Foram analisados 10 mil núcleos para cada amostra, com três repetições. A análise foi realizada no citômetro FACSCalibur quatro cores (Becton Dickinson) e os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8. O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scot-Knott a 5% de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 apresenta os resultados encontrados para o conteúdo de DNA de 15 acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Tabela 3 Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para acessos de bananeira com diferente níveis de ploidia.

<b>Acessos</b>	<b>Grupo Genômico</b>	<b>Conteúdo de DNA (pg)</b>
Tropical	AAAB	1,99 A
102	AAAB	1,95 A
PA42-44	AAAB	1,86 B
Princesa	AAAB	1,86 B
FHIA 02	AAAB	1,78 C
Caipira	AAA	1,54 D
Bucanero	AAAA	1,52 D
Prata Anã	AAB	1,40 E
Garantida	AAAB	1,35 E
Malbut	AA	1,23 F
NBA	AA	1,22 F
Thap Maeo	AAB	1,21 F
Maçã	AAB	1,16 F
118	AA	1,10 G
Butuhan	BB	1,03 H

Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os coeficientes de variação encontrados para os picos G1 variaram de 0,45 a 2,06 %, caracterizando um excelente resultado, inferior ao encontrado em trabalhos bastante citados com bananeira, como o de Dolezel, Dolezelova e Novák (1994) cujos coeficientes ficaram entre 2,5 e 4,5%. Segundo Galbraith et al. (2002) coeficientes de variação de até 5% são aceitáveis.

Quando triturados, corados e avaliados juntamente os histogramas de distribuição de fluorescência geraram dois picos maiores, representando os picos G1 de *Musa* e *Pisum*. A razão entre estes dois picos foi utilizada como base para calcular o conteúdo de DNA das amostras de bananeira. A Figura 3.1 representa um exemplo de histograma para acessos diplóide (A), triplóide (B) e tetraplóide (C).

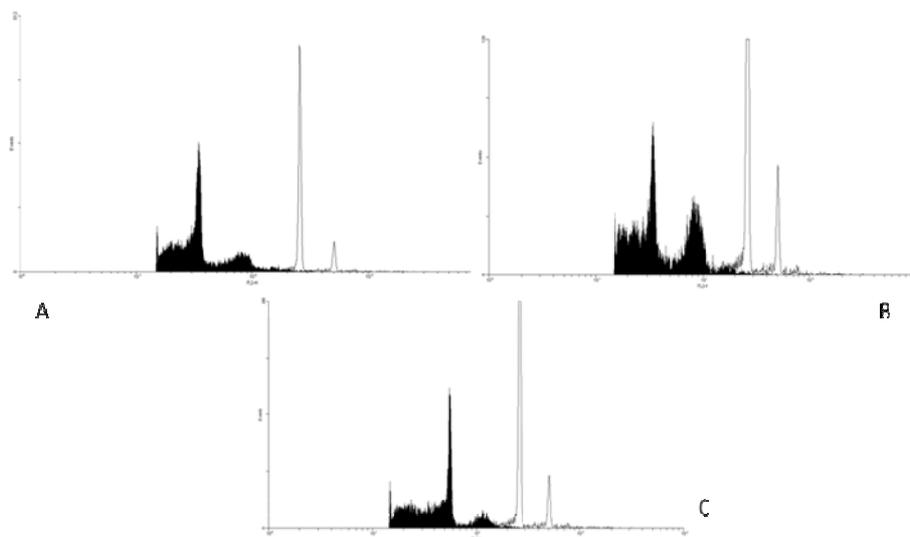


Figura 3.1 Histogramas representando acessos diplóide (A), triplóide (B) e tetraplóide (C) de banana (em preto) e o padrão de referência (*Pisum sativum*) em branco.

O conteúdo 2 C de DNA nuclear dos genótipos diplóides variou de 1,03 a 1,23 pg. Nos acessos triplóides a variação ficou entre 1,16 e 1,54 pg e nos tetraplóides entre 1,35 e 1,99 pg. (Tabela 3). A análise de variância mostrou diferenças significativas entre a maioria dos acessos avaliados ( $P < 0,001$ ).

Os resultados mostram que o menor conteúdo de DNA foi encontrado no diplóide de *M. balbisiana*, Butuhan, com 1,03 pg. Jesus (2010) trabalhando com 284 acessos de bananeira encontrou valores um pouco maiores para os diplóides BB, com média de 1,25 pg, mas assim como no presente estudo, o genótipo Butuhan foi o que apresentou o menor conteúdo de DNA entre todos os diplóides. O resultado de quantidade de DNA encontrado neste trabalho para *M. balbisiana* corrobora com estudo de Jenny (1990 citado por D'HONT et al. 2001) que estabelece o valor 2C de 1,03 pg como sendo característico para o genoma B.

Para os acessos diplóides de *M. acuminata* os valores foram significativamente maiores, ficando entre 1,10 e 1,23 pg. Jesus (2010) encontrou valores similares, com média de 1,25 pg. O valor encontrado para o conteúdo de DNA do genótipo 118 diferiu estatisticamente dos demais genótipos AA, Malbut e NBA. Estes valores encontrados em geral para o material diplóide concordam com os observados em vários outros estudos prévios como os de Asif, Mak e Othman (2001), Dolezel, Dolezelova e Novák (1994), Kamaté et al. (1999), Lysák et al. (1999). Jenny (1990 citado por D'HONT et al. 2001) estabelece como 1,11 o valor 2C característico para o genoma A.

Interessante salientar que Jesus (2010) classificou o genótipo Malbut como sendo um mixoplóide enquanto o presente estudo o coloca claramente como um diplóide (Figura 3.2).

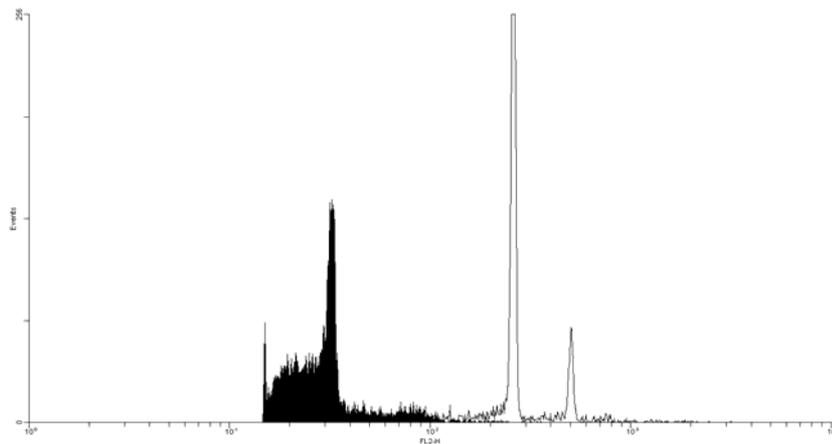


Figura 3.2 Histograma representando o acesso diplóide AA Malbut.

Como era esperado, a estimativa do conteúdo de DNA nuclear pela técnica de citometria de fluxo foi capaz de diferenciar o tamanho dos genomas A e B. Em média, o genoma A apresentou-se 11% maior que o genoma B. Este valor se mostrou na média entre os valores encontrados por Dolezel, Dolezelova e Novák (1994) que foi de 10%, e por Lysák *et al.* (1999) que foi de 12%. Assim, Mak e Othman (2001) também encontraram valores superiores aos 10% e Kamaté *et al.* (2001) encontraram um valor de 15% de diferença entre o tamanho dos genomas A e B. De Jesus (2006) não diagnosticou diferenças significativas entre os conteúdos de DNA nuclear para os genomas A e B.

Diferenças na quantidade de DNA também têm sido observadas dentro de *M. acuminata*. Assim como Lysák *et al.* (1999) o presente trabalho encontrou variação significativa entre alguns dos acessos diplóides AA. Esta variação, no entanto, mostrou-se abaixo do esperado, uma vez que a literatura descreve

grandes variações intraespecíficas em espécies cultivadas (GREILHUBER, 2005). Conteúdos diferentes de DNA nos acessos AA podem ser resultantes do isolamento geográfico criado entre muitas das cultivares de bananeira utilizadas nos trabalhos de quantificação de conteúdo de DNA. Até que ponto estas variações encontradas na literatura seriam artefatos criados pela técnica ou seriam realmente questões de plasticidade genômica ainda merecem maior atenção por parte dos especialistas.

Para os acessos triplóides, os valores encontrados apresentaram grande diferença estatística. A cultivar Maçã (AAB) apresentou conteúdo de DNA de 1,16 pg e o cultivar Thap Maeo (AAB) de 1,21 pg. Ambos os valores não se apresentaram estatisticamente diferentes dos valores observados nos diplóides AA.

A cultivar Prata Anã (AAB) apresentou conteúdo de DNA de 1,40 pg e não diferiu estatisticamente do cultivar tetraplóide Garantida. A cultivar Caipira (AAA) apresentou conteúdo de DNA de 1,54 pg e não diferiu estatisticamente da cultivar tetraplóide Bucanero (AAAA).

Os valores encontrados para os cultivares triplóides diferem bastante daqueles observados por Kamaté *et al.* (2001), Lysák *et al.* (1999) e Jesus (2006). Os primeiros autores encontraram conteúdos variando entre 1,64 e 2,23 pg, sendo este último valor bastante discrepante dos demais, enquanto os valores encontrados por Lysák *et al.* (1999) ficaram entre 1,73 e 1,90 pg. Jesus (2010) encontrou valores de 1,86 até 1,99 pg.

Considerando acessos triplóides com diferentes constituições genômicas, Lysák *et al.* (1999) relatam que o valor esperado para os diferentes grupos é de 1,66 a 1,68 pg para acessos BBB, de 1,72 a 1,76 pg para acessos ABB, de 1,78 a 1,84 para acessos AAB e de 1,84 a 1,91 pg para acessos AAA.

No presente estudo foram avaliados acessos triplóides de dois grupos – AAB e AAA – e os resultados foram de 1,21 a 1,40 pg e 1,54 respectivamente.

Comparando os resultados com os obtidos por Jesus (2010) com dois dos cultivares triplóides deste estudo, observam-se conteúdos de DNA bastante diferentes. O autor encontrou 1,94 pg de DNA para a cultivar Thap Mao e 1,98 para a cultivar Caipira.

As cultivares triplóides apresentaram uma diferença maior no conteúdo genômico do que os acessos diplóides, sendo que a diferença entre o maior e o menor conteúdo foi de 33%. Esta diferença acentuada para o material triplóide não foi observada por Lysák *et al.* (1999), cujos dados apresentaram diferenças de apenas 10% entre o conteúdo de DNA dos triplóides avaliados, mesma diferença encontrada para os diplóides. Entretanto Kamaté *et al.* (2001) encontraram uma diferença de cerca de 39% entre o maior e o menor conteúdo de DNA nos cultivares triplóides. Lysák *et al.* (1999) especula que diferenças menores no conteúdo de DNA são esperadas quando se avalia um número menor de materiais, porém neste estudo foram avaliados quatro acessos triplóides enquanto no estudo dos referidos autores foram avaliados dez acessos. Acredita-se, portanto, que estas diferenças tenham como principal causa a origem dos materiais e seu processo evolutivo, incluindo o isolamento geográfico e o uso de formas vegetativas de propagação.

As cultivares tetraplóides apresentaram uma variação ainda maior no conteúdo de DNA, sendo que a diferença entre o maior e o menor valor foi de 47%. Jesus (2010) cita que uma maior variação encontrada no conteúdo de DNA entre os acessos tetraplóides do que entre os triplóides (0,13 e 0,28 pg respectivamente), provavelmente por este germoplasma resultar de diferentes cruzamentos. O autor diz que essa diferença é esperada pelo fato de haver uma maior possibilidade de combinações entre os genomas em acessos tetraplóides.

Os valores encontrados para o conteúdo de DNA dos acessos tetraplóides por Jesus (2010) variaram entre 2,28 e 2,56. Kamaté *et al.* (2001)

avaliaram apenas dois acessos AAAA e encontraram valores um pouco menores, de 2,37 e 1,94, mais próximos aos encontrados neste estudo.

Como observado por Lysák *et al.* (1999) o conteúdo de DNA para os acessos tetraplóides neste estudo encontram-se na faixa próxima ao esperado para acessos triplóides. Porém os resultados encontrados por Jesus (2006) para os acessos triplóides ficam acima dos valores propostos pelos primeiros autores. Diferenças nestes conteúdos de DNA têm sido comumente encontradas e acredita-se que possam ser resultantes de questões técnicas como preparação das amostras, uso de diferentes citômetros de fluxo ou padrões internos.

No presente estudo, assim como no Jesus (2006) foi utilizado como padrão interno a ervilha (*Pisum sativum*), que possui um conteúdo de 2C de DNA de 9,09 pg. Dolezel e Bartos (2005) colocam a ervilha como uma excelente alternativa de padrão interno por possuir um conteúdo de DNA cujo valor situa-se no meio do valor médio para a maioria dos conteúdos de DNA vegetal, podendo, desta forma, ser utilizada para avaliar tanto plantas com um pequeno genoma quanto plantas com um genoma grande. Além disso, o genoma nuclear das ervilhas é estável e o preparo de suspensões de núcleos a partir das suas folhas não libera compostos que interferem na coloração pelo iodeto de propídeo.

Como relatado na literatura, os limites de valores para o conteúdo de DNA de *Musa* com diferentes ploidias se encontram muitas vezes sobrepostos e, comumente, uma cultivar apresenta um conteúdo diferente daquilo que é esperado pela sua ploidia e combinação genômica. Lysák *et al.* (1999) especulam que o principal motivo pelo qual isto acontece é o fato de que estes diferentes materiais passam pelo processo de isolamento geográfico e pela propagação vegetativa, que são fatores extremamente relevantes para promoverem alterações no tamanho do genoma da planta. Segundo Çelikler e Bilaloglu (2001), variações como estas no conteúdo de DNA podem ser decorrentes de baixa

replicação da heterocromatina, decréscimo na quantidade de seqüências altamente repetidas e mutações ou adaptações em reação a fatores ambientais. Desta forma, plantas que exibem uma mesma origem, uma mesma ploidia e uma mesma razão entre a contribuição do genoma A e B podem apresentar conteúdos de DNA bastante distintos.

## **6 CONCLUSÃO**

Os valores encontrados para a estimativa do conteúdo de DNA em bananeira permitem, de forma geral, uma separação dos diferentes acessos de acordo com o seu nível de ploidia. Contudo, a sobreposição de valores dificulta a interpretação dos dados, principalmente nas cultivares tetraplóides. Sendo assim, o uso da citometria de fluxo para determinação de ploidia em acessos de bananeira deve ser utilizado com critério e mais esforços devem ser empreendidos na busca da compreensão das razões para a grande variação de conteúdo de DNA na cultura.

## REFERÊNCIAS

- ASIF, M.; MAK, C.; OTHMAN, Y. Characterization of indigenous *Musa* species based on flow cytometric analysis of ploidy and nuclear DNA content. **Caryologia**, Firenze, v. 54, n. 2, p. 161-168, 2001.
- BENNET, M.; LEITCH, I. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: 583 new estimates. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 2, p. 169-196, Feb. 1997.
- ÇELIKLER, S.; BILALOGLU, R. Nucleotipic effects in different genotypes of *Vicia faba* L. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 25, n. 4, p. 205-219, June 2001.
- D'HONT, A. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 177-183, Feb. 2000.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 3, p. 99-110, Mar. 2005.
- DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVÁK, F. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *Musa balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, June 1994.
- GALBRAITH, D. et al. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J.; AZMI, A.; TUTOIS, S. (Ed.). **Current protocols in cytometry**. New York: J. Wiley, 2002. p. 7.6.2.
- \_\_\_\_\_. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4061, p. 1049-1050, June 1983.
- GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size in Angiosperms: identifying its existence. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 91-98, Jan. 2005.

GREILHUBER, J. et al. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'c-value' to describe nuclear DNA contents. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 255-260, Jan. 2005.

JESUS, O. de. **Caracterização molecular de acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa**. 2010. 138 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.

KAMATÉ, K. et al. Nuclear DNA content and base composition in 28 taxa of Musa. **Genome**, Ottawa, v. 44, n. 4, p. 622-627, Aug. 2001.

LYSÁK, M. et al. Flow cytometry analysis of nuclear DNA content in Musa. **Theoretical and Applied Genetic**, Berlin, v. 98, n. 8, p. 1344-1350, Sept. 1999.

OCHATT, S.; PATAT-OCHATT, E.; MOESSNER, E. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 3, p. 329-341, Mar. 2011.

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