

**INDUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
POLIPLOIDIA EM BANANEIRA (*Musa
acuminata*, Colla)**

LEILA APARECIDA SALLES PIO

2008

LEILA APARECIDA SALLES PIO

INDUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIPLOIDIA EM BANANEIRA
(*Musa acuminata*, Colla)

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração
Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

LEILA APARECIDA SALLES PIO

INDUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIPLOIDIA EM BANANEIRA
(*Musa acuminata*, Colla)

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração
Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2008

Profª. Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA
Pesq. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva	Embrapa/CNPMPF
Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva	Unifenas
Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA

Prof. Dr. Moacir Pasqual
UFLA
(ORIENTADOR)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

Aos meus pais,

Alaôr e Joana, pelo carinho eterno e apoio incondicional;

Esposo,

Marcelo Pio, pelo amor que nos une;

Filho,

Felipe Salles Pio, a luz da minha vida!

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem Maria, por guiarem meus passos, iluminarem meu caminho e abençoarem minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade da realização da pós-graduação e pela contribuição para a minha formação acadêmica.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Moacir Pasqual, pela orientação e ensinamentos, importantes para a minha formação profissional.

Aos pesquisadores Dr. Sebastião de Oliveira e Silva e Dra. Janay de Almeida Santos-Serejo, pela co-orientação e apoio nos momentos em que precisei.

Aos professores Dra. Lisete Chamma Davide, Dr. Eduardo Alves, Dr. Evaristo de Castro e Dr. Adriano Bortolotti, pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas Hermínio, Fabíola, Grazielle, Márcia, Claudinéia, Fred, Luzia, Cida, Filipi, José Marcelo, Caio, Ana Luiza, Juliane, Patrícia, Letícia, Fabiano e Saulo, pela ajuda e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus amigos Vantuil Rodrigues, Antônio Clarete e Antônio Carlos, funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, e Eloísa, funcionária do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pelo convívio e ensinamentos.

A minha família, a minha sogra, Dona Maura; minhas cunhadas; Sandra e Andréa; aos sobrinhos; Vinícius, Vivian, Otávio, Vitor, Mariana, José Otávio e Ágata; que me apoiaram em todos os momentos.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Considerações gerais sobre a bananeira.....	3
2.1.1 Aspéctos sócio-econômicos.....	3
2.1.2 Doenças e pragas	5
2.2 Origem e disseminação.....	6
2.3 Citogenética	7
2.4 Melhoramento genético da bananeira.....	8
2.4.1 Melhoramento genético por hibridação	9
2.4.2 Autotetraplóides.....	10
2.4.3 Obtenção dos poliplóides artificiais.....	11
2.4.3.1 Efeito da poliploidia sobre as bananeiras.....	13
2.4.3.2 Verificação de ploidia.....	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO II. INDUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIPLOIDIA EM <i>Musa acuminata</i> , Colla.....	23
1 RESUMO.....	24
2 ABSTRACT	25
3 INTRODUÇÃO.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
CAPÍTULO III. ANÁLISES DE CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E ULTRAESTRUTURAIS DE PLANTAS MIXOPLÓIDES E AUTOTETRAPLÓIDES DE BANANEIRA.....	56
1 RESUMO.....	57
2 ABSTRACT	58
3 INTRODUÇÃO.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÕES	71

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
-----------------------------------	----

RESUMO

PIO, Leila Aparecida Salles. **Indução e identificação de poliploidia em bananeira (*Musa acuminata*, Colla)**. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a indução e a identificação de poliplóides por meio de análise estomática, da contagem de cromossomos e da citometria de fluxo, bem como o efeito da poliploidia e da mixoploidia nas características anatômicas e ultra-estruturais das cultivares de bananeira Malbut, Ouro, Lidi e Thong Dok Mak. Na indução de poliplóides, os explantes foram tratados com colchicina, nas concentrações de 0, 2,5; 7,5 e 12,5mM, por 24 e 48 horas e com oryzalina, nas concentrações de 0, 10, 30 e 50µM, por 4 e 7 dias. Para a identificação de poliplóides via análise estomática, amostras de folhas jovens de cada planta foram eletromicrografadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram avaliados o tamanho (diâmetro polar x diâmetro equatorial) e a densidade de estômatos. Para análise de citometria de fluxo, foi retirada uma pequena porção de tecido foliar de cada planta, triturada, para a liberação de núcleos e corada com iodeto de propídeo. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados. Para análise citogenética, ápices radiculares foram pré-tratados com solução de 8-HQ 500 mg L⁻¹, por 3 horas e fixados em solução de Carnoy por 24 horas e submetidos a técnicas de esmagamento convencional. A coloração foi feita com solução de Giemsa a 10%. Para a realização da contagem do número de cloroplastídeos por células, do comprimento e da largura dos cloroplastídeos e área dos cloroplastídeos, foram feitas análises de características anatômicas e ultra-estruturais de plantas diplóides, mixoplóides e tetraplóides de três cultivares de bananeira: Lidi, Ouro e TDM. Fragmentos retirados de folhas jovens foram submetidos às técnicas de preparação tradicionais para análise em microscopia eletrônica de transmissão. Foram realizados os cortes em seções semifinas (>100nm) e ultrafinas (<100nm). Os cortes semifinos foram analisados em microscópio de luz. Foram avaliados comprimento e largura de células do parênquima paliçádico e lacunoso, epidermes adaxial e abaxial, espessura do limbo e número de cloroplastídeos. Os cortes ultrafinos foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão e foram observadas características ultra-estruturais dos cloroplastos. O trabalho permitiu a identificação de 4 plantas e 6 mixoplóides pelas três técnicas de identificação utilizadas. As análises estruturais e ultra-estruturais permitem a separação dos diplóides, mas não apresentam diferenças entre tetraplóides e mixoplóides.

*Orientador: Moacir Pasqual – UFLA.

ABSTRACT

PIO, Leila Aparecida Salles. **Autotetraploidy induction and identification in banana (*Musa spp.*)**. 2008. 72p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The aimed study to induct and to identify polyploidys identification through stomatal analysis, chromosome counting and flow cytometry, as well polyploidys and mixoploids effects on the structural and ultrastructural characteristics in banana varieties: Malbut, Ouro, Lidi e Thong Dok Mak. In polyploidys induction, explants were treated with concentrations of colchicine (0, 2.5; 7.5 and 12,5mM) for 24 and 48 hours and with oryzalin (0, 10, 30 and 50µM) for 4 and 7 days. Toward polyploidys identification through stomatal analysis, samples of young leaves from every plant were evaluated by scanning electron microscopy size (polar diameter x equatorial diameter) and stomatal density were evaluated. Toward analysis in flow cytometry, quantity of leave tissue from each plant was cuted and after, triturated (aiming a nucleus liberate) and redden with propidium iodide. A number of 10,000 events was evaluated. Toward cytogenetics analysis, types roots were previous treated with 8-HQ 500 mg L⁻¹ solution for 3 hours and fixed in Carnoy solution for 24 hours and submitted to the conventional crushing techniques. Staining was done with solution of Giemsa (10%). Towards second experiment, analysis of structural and ultrastructural characteristics of diploids plants, mixoploids and tetraploids in 3 banana cultivars: Lidi, Ouro e TDM were carried out. Fragments from young leaves were submitted to the conventional techniques for analysis in transmiion electron microscopy. Thick (>100nm) and thin (<100nm) sections were evaluated in light and transmiion electron microscopy, respectively. Length and breadth of cells from palyçadic and spongy parenchyma, adaxial and abaxial epidermis, leave thickness were measured and chloroplasts numbers were estimated. While to thin sections ultrastructural characteristics of chloroplasts were examined. It was concluded that 4 plants were identified as tetraploids and 6 as mixoploids through three identification techniques. No differences between tetraploids and mixoploids was produced, only structural and ultrastructural characteristics of diploids.

* Adviser: Moacir Pasqual – UFLA.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A cultura da bananeira assume importância social e econômica em mais de 80 países, principalmente em pequenas propriedades (Silva et al., 2002). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de bananas, com 11,7 milhões de toneladas em 2007 e área cultivada de 504,074 mil hectares (11% de toda a área cultivada no Brasil). Em termos de produção, o Brasil perde apenas para a Índia, que produz 70,7 milhões de toneladas (Anuário da Agricultura Brasileira, 2008).

Associado à falta de resistência às principais doenças e pragas, a maioria das variedades comerciais é pouco produtiva e tem porte alto. A cultivar tipo Cavendish (Grande Naine - AAA) é a única de importância para o mercado internacional e ainda não existem variedades comerciais desse tipo que sejam resistentes às sigatokas amarela e negra, doenças que podem causar perdas na produção de até 100%, a depender das condições de cultivo.

Uma das estratégias para a solução dos problemas mencionados é a criação de novas variedades, mediante o cruzamento de diplóides AA com triplóides comerciais, gerando híbridos tetraplóides. Esta tarefa, no entanto, é dificultada pela esterilidade constatada em alguns diplóides e triplóides. As dificuldades resultantes da baixa e, em alguns casos, da ausência da produção de sementes em cruzamentos de bananeira, podem ser contornadas mediante a escolha adequada dos genitores e o uso de tecnologias não convencionais de melhoramento. Estratégias alternativas de melhoramento genético da bananeira, fundamentadas na duplicação de cromossomos, induzidas por tratamentos com agentes antimitóticos (colchicina e orizalina) têm sido propostas como forma de introduzir resistência a doenças, nos híbridos gerados pelos programas de melhoramento genético da cultura (Stover & Buddenhagen, 1986). Acrescenta-se, ainda, que a geração de cultivares com resistência às sigatokas causará

grandes impactos econômicos e ambientais. Esta tecnologia viabilizará a bananicultura nas regiões pobres e promoverá grandes impactos econômicos (redução do custo de produção em aproximadamente 25%) e ambientais ao dispensar o uso de fungicidas, podendo contribuir para o aumento da produtividade em, aproximadamente, 25%.

O presente estudo faz parte de um programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, de Cruz das Almas, na Bahia, que visa à obtenção de triplóides secundários AAA, mediante a indução da duplicação dos cromossomos de bananeiras diplóides que produzem frutos de sabor agradável e o posterior cruzamento do autotetraplóide obtido com um diplóide elite, objetivando futuros lançamentos de novas cultivares no mercado nacional. Com esse intuito, objetivou-se induzir e identificar autotetraplóides nas cultivares Ouro, Lidi, Malbut e Thong Dok Mak de *Musa* spp.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais sobre a bananeira

2.1.1 Aspectos sócio-econômicos

No Brasil, a bananeira é a segunda frutífera de maior importância, depois da laranja, sendo utilizada por milhões de pessoas para vários fins, e é classificada entre as cinco maiores culturas no comércio internacional. Além disso, seu apelo social é de grande relevância, quando comparada com outras frutíferas. É a cultura mais explorada, em termos de pequena propriedade rural, por isso tem grande importância social como fixadora de mão-de-obra no campo e fonte de renda contínua para o pequeno agricultor (Silva et al., 2002).

Estima-se que as exportações mundiais de banana superem US\$ 5 bilhões por ano, o que a torna uma fonte vital de renda para muitos países (United Nations Conference on Trade and Development, 2007).

Mesmo sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais de banana, as exportações nacionais são irrisórias, comparadas às de outros países produtores, como o Equador, que detém 8,22% da produção mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007). Em 2007, os maiores volumes de exportações de banana pelo Brasil foram de 33.715 toneladas para a Argentina, 25.562 toneladas para o Reino Unido e 12.266 toneladas a Itália (Agriannual, 2008). Essa baixa exportação se deve à má qualidade dos frutos, resultante do cultivo sem tecnologia e sem execução das práticas culturais de pós-colheita; à utilização de cultivares de baixa qualidade genética, susceptíveis a pragas e doenças; à falta de planejamento estratégico e ao manejo inadequado dos frutos durante o processo de desenvolvimento da cultura (Silva et al., 2002).

Consumida, quase que na totalidade das vezes, na forma *in natura*, a banana é parte integrante da alimentação das populações de baixa renda, não só pelo valor nutritivo, mas também pelo baixo custo. Uma única banana supre cerca de um quarto da quantidade de vitamina C recomendada diariamente para crianças. Contém, ainda, vitaminas A e B, muito potássio, pouco sódio, nenhum colesterol e mais açúcar que a maçã (Alves et al., 1997).

Souza & Torres Filho (1997) apontam três importantes papéis socioeconômicos desempenhados pela banana: a) fonte de alimentação, b) fixação de mão-de-obra e c) geração de divisas. Em muitos países pobres, a banana, como fonte de alimentação, é tão importante quanto outros produtos amiláceos básicos, como milho, mandioca, arroz e inhame.

Economicamente, a bananeira situa-se entre os cultivos perenes que mais rapidamente proporcionam o retorno do capital investido e apresenta fluxo

contínuo de produção a partir do primeiro ano. Esses aspectos a colocam em vantagem sobre diversas outras frutíferas.

A bananicultura brasileira apresenta diferenças tanto pela diversidade climática dos locais onde é explorada quanto pelo uso de cultivares, a forma de comercialização e as exigências do mercado consumidor. Geralmente, os cultivos são tradicionais, com baixos índices de capitalização e tecnologia, no entanto, existem alguns cultivos tecnificados, em algumas regiões.

As cultivares Prata, Pacovan e Terra são mais comuns no Norte e no Nordeste. As do subgrupo Cavendish, no qual se destacam as cultivares Nanicão e Grande Naine, se revelam como as de maior potencial para exportação, sendo mais cultivadas no Centro-Sul. A região Sudeste revela a presença equilibrada dos dois grupos (Agrianual, 2008).

2.1.2 Doenças e pragas

Como em qualquer espécie cultivada em grandes áreas, a bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários causados por bactérias, vírus, nematóides, insetos e fungos.

Dentre as bacterioses, destaca-se a murcha, ou moko, cujo agente patogênico é *Ralstonia solanacearum*, sobre a qual pouco se conhece em relação a fontes de resistência (Silva et al., 2002). O “bunchy top”, designado pela sigla BBTV, é tido como o maior problema de etiologia viral da cultura (Jones, 2000; Silva et al., 2002; Ploetz et al., 2003), mas ainda não presente no Brasil. O nematóide de maior importância para a bananeira é o *Rodopholus similis* (Silva et al., 2002; Cares, 2003) e a broca-do-rizoma, causada pelo *Cosmopolites sordidus*, é a praga que mais provoca danos (Gold et al., 2001; Silva et al., 2002).

Os fungos, agentes infecciosos de maior importância, causam doenças, como murcha-de-fusarium ou fusariose (mal-do-panamá), cujo agente patogênico é *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* e manchas foliares, causadas pelas sigatokas amarela (*Mycosphaerella musicola*) e negra (*Mycosphaerella fijiensis*). A sigatoka negra é uma doença de importância mundial, por ser extremamente agressiva, e que tem se alastrado pelo país, com focos encontrados recentemente nas regiões produtoras do estado de São Paulo.

Doenças e pragas provocam severas perdas na produção de banana que, a depender das circunstâncias, podem ser de até 100%. Para manter produções razoáveis, o controle químico requer significativo gerenciamento financeiro e investimentos que somente podem ser pagos quando em grandes plantações. Além disso, o uso de pesticidas é inimigo da preservação ambiental e tem se tornado politicamente inaceitável. O futuro do cultivo da bananeira será, portanto, altamente dependente da habilidade dos melhoristas de plantas. O principal objetivo dos maiores programas de melhoramento de bananeiras é o de criar novas variedades com o aumento da resistência ou da tolerância a pragas e a doenças (Persley & deLanfhe, 1987).

2.2 Origem e disseminação

A bananeira (*Musa* spp.) tem sua origem no Continente Asiático e esta região pode ser considerada como centro de origem e ponto inicial de disseminação para o resto do mundo (Stover & Simmonds, 1987). Existem, ainda, centros secundários de origem na África Oriental e nas ilhas do Pacífico, além de um importante centro de diversidade na África Ocidental (Swennen et al., 1995; Dantas et al., 1997).

Stover & Simmonds (1987) afirmam que a única fonte de variabilidade em bananeira na África e nas Américas tem ocorrido por meio de mutação

somática e estimam que, no continente asiático, existem em torno de 130 cultivares de bananeira, das quais aproximadamente 40 são consideradas mutantes. Jarret et al. (1992) consideram que as maiores reservas de germoplasma de bananas comestíveis no mundo localizam-se na Nova Guiné e em ilhas próximas.

2.3 Citogenética

Todos os tipos de bananeiras e plátanos são derivados das espécies selvagens diplóides *Musa acuminata* Colla ou de híbridos naturais entre *M. acuminata* (genoma A) e *M. balbisiana* (genoma B), que se encontram dentro da seção *Eumusa* (Simmonds, 1995). Esses híbridos podem apresentar três tipos de ploidia: diplóide $2n = 2x = 22$; triplóide $2n = 3x = 33$ ou tetraplóide $2n = 4x = 44$. Cada cultivar de bananeira deve conter uma determinada combinação de genomas completos das duas espécies parentais. Vários grupos genômicos foram constatados como diplóides AA, AB e BB; triplóides AAA, AAB e ABB e tetraplóides AAAA, AAAB, AABB e ABBB (Stover & Simmonds, 1987; Tezenas du Montcell, 1988).

A maioria das cultivares de bananeira é triplóide e, portanto, quase completamente estéril, desenvolvendo frutos por partenocarpia e propagada assexuadamente, tendo sido selecionadas durante o longo processo de domesticação (Simmonds, 1995; Silva et al., 2002). A base genética desses triplóides é estreita e uma das fontes secundárias de diversificação são as mutações somáticas de cultivares, que são selecionadas e originam novas cultivares (Daniells et al., 2001). Portanto, além do grupo genômico, foi estabelecido o termo subgrupo, para denominar um complexo de cultivares originárias de mutações de uma única cultivar original, como no caso do grupo

AAA, subgrupo Cavendish e subgrupos Prata e Terra, no Brasil (Silva et al., 2002).

Na execução de trabalho de melhoramento, os estudos citogenéticos são auxiliares básicos para a obtenção e ou a explicação de combinações cromossômicas desejáveis, aumentando as chances de sucesso na transferência estável de características genéticas de interesse para as diversas variedades do gênero *Musa*. (Dantas et al., 1993).

2.4 Melhoramento genético da bananeira

Vários são os métodos de melhoramento conduzidos em bananeira: introdução e seleção de clones, melhoramento por hibridação, melhoramento ao nível diplóide, produção de triplóides a partir do cruzamento de tetraplóides com diplóides, melhoramento por mutação, hibridação somática e uso de engenharia genética. Independente da escolha do método adotado, o melhoramento da bananeira busca desenvolver variedades resistentes as sigatocas amarela e negra, ao mal-do-panamá, ao moko, aos nematóides e à broca-do rizoma, reduzir o porte da planta, o ciclo da cultura e aumentar a produtividade (Silva et al., 2000, 2004).

As primeiras tentativas de pesquisa na área de melhoramento genético de bananeira ocorreram no final da década de 1920, em Honduras, Trindade e Jamaica, motivados pela murcha de *Fusarium*, mais conhecida como mal-do-panamá (Shepherd, 1992). O primeiro híbrido tetraplóide (AAAA) foi obtido no início da década de 1930. Esse híbrido foi oriundo do cruzamento de uma cultivar triplóide (Gros Michel – AAA) com um diplóide (AA) selvagem. Tal sistema de hibridação ainda é universalmente utilizado, com resultados satisfatórios.

O melhoramento da bananeira no Brasil foi iniciado em 1982 e teve como objetivos básicos desenvolver as características listadas anteriormente, mediante cruzamentos de diplóides (AA) melhorados com triplóides comerciais, avaliando e selecionando as novas variedades tetraplóides em diferentes regiões produtoras do país.

Em 1993, no Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMT), da Embrapa, iniciaram-se as atividades de melhoramento genético da bananeira, com a realização de coleta de germoplasma, em âmbito nacional e internacional, seguida pela elaboração dos projetos, subprojetos e ações de pesquisa pertinentes (Alves, 1997; Dantas et al., 1993).

2.4.1 Melhoramento genético por hibridação

O melhoramento convencional tem sido dificultado pela ausência de sementes nas cultivares de bananeira, o que pode ser devido à inexistência de pólen viável e ou de polinizadores naturais eficientes (Shepherd, 1992). As cultivares que não produzem sementes, quando polinizadas ou aquelas que produzem em pequena quantidade, podem ser tanto diplóides quanto triplóides, em que a ausência desta característica está relacionada à intensa seleção agrônômica, sendo um reflexo do processo de domesticação da espécie (Shepherd, 1992; Dantas et al., 1999; Silva et al., 2002). Para contornar esse problema, métodos de melhoramento não convencionais, tais como hibridação somática e duplicação do número de cromossomos dos diplóides, vêm sendo usados (Ganry, 1993).

Já que não há incompatibilidade entre espécies de *Musa*, é possível usar a hibridação em programas de melhoramento (Vuylsteke et al., 1993). A hibridação de bananas é, no entanto, complicada pela combinação de diferentes

níveis de ploidia e pela restituição na macrosporogênese associada com a formação de gametas femininos não reduzidos (Van Duren, 1996).

As cultivares de bananeiras plantadas normalmente são clones triplóides propagados assexuadamente, com flores fêmea e macho-estéreis e frutos partenocárpicos (Mak et al., 1996).

No melhoramento genético da bananeira, os genótipos diplóides (AA) deverão contribuir com resistência a diversas doenças existentes, tais como, mal-do-panamá, sigatoka amarela e negra, moko e com outras características desejáveis. O objetivo do melhoramento do germoplasma AA é, portanto, concentrar, em um mesmo genótipo, o maior número possível de características favoráveis, como partenocarpia, elevado número de dedos e pencas, maior comprimento de dedos, boa formação de cachos e resistência a pragas e doenças e aos nematóides para, posteriormente, tentar transferi-las aos triplóides comerciais, mediante a síntese de tetraplóides (Silva, 1996; Silva et al., 1998).

Ortiz (1997) comenta que todas as cultivares de bananeiras presentes em plantações comerciais são, em sua maioria, materiais selecionados em campo por agricultores ou mutantes somáticos espontâneos de cultivares antigas. Mas, esforços recentes na tentativa de obter materiais resistentes ou tolerantes a doenças e pragas resultam em lançamento de híbridos tetraplóides.

2.4.2 Autotetraplóides

Os autotetraplóides resultam da duplicação do número básico de cromossomos de um diplóide, apresentando quatro genomas idênticos. Quando desejada, a duplicação cromossômica somática pode ser induzida por tratamentos químicos apropriados, sendo a colchicina o agente indutor que fornece melhores resultados (Pagliarini, 2001).

Um dos principais aspectos somáticos que distinguem os autotetraplóides é a mudança do tamanho celular e nuclear, resultando, primariamente, em características “gigas”, podendo provocar também outras mudanças na morfologia da planta (Pagliarini, 2001).

O uso de diplóides de bananeiras, resistentes a pragas e doenças, com o genoma duplicado, pode adicionar diversidade genética numa população melhorada. Entretanto, híbridos tetraplóides são, geralmente, inferiores aos triplóides, em termos de resistência ao despençamento e ao arqueamento das folhas, o que pode levar a maiores danos por ventos fortes (Stover & Smmonds, 1987).

A utilização destes tetraplóides induzidos artificialmente servirá, portanto, para o cruzamento dos melhores, com outros diplóides, gerando triplóides secundários que apresentem características de resistência a pragas e a doenças e outras características agronômicas superiores.

2.4.3 Obtenção de poliplóides artificiais

Em plantas, a duplicação de cromossomos pode ser induzida de diversas maneiras. Ferimentos de tecidos com posterior regeneração e choques térmicos eram as técnicas mais antigas (Roth, 1984).

A partir de 1937, a colchicina, um alcalóide extraído principalmente de bulbos da liliácea *Colchicum autumnale*, passou a ser usada na indução de plantas poliplóides (Havas, 1937), sendo, ainda, a substância mais amplamente empregada para a indução de poliploidia em programas de melhoramento genético de culturas agrícolas, espécies florestais e plantas ornamentais (Sharma & Sharma, 1999; Silva et al., 2000).

O mecanismo de ação da colchicina é conhecido. Ela liga-se reversivelmente ao dímero de tubulina α e β , causando mudança conformacional que impede a polimerização do fuso mitótico e, conseqüentemente, bloqueia a célula em metáfase. Como os sítios específicos aos quais a colchicina se liga nos dímeros α e β são inacessíveis quando a tubulina está polimerizada na forma de microtúbulos, tal substância atua na tubulina solúvel, impedindo-a de se polimerizar. Em microtúbulos já formados, a colchicina impede o crescimento destas estruturas durante a divisão celular (Morejohn et al., 1987; Sluder, 1991).

A importância da colchicina está relacionada com a sua ação específica, que leva à duplicação cromossômica. Entretanto, se não for removida em tempo oportuno, pode provocar anomalias cromossômicas, como deleção, quebras, cromossomos atrasados e pegajosos, em conseqüência da despolimerização do fuso. Em concentrações elevadas, a colchicina possui efeitos tóxicos, gerando grande mortalidade nas plantas tratadas. A tolerância à colchicina varia entre as espécies (Wan et al., 1989; Abreu, 2002; Barbosa, 2004).

O maior problema de indução via colchicina resulta do fato de que a substância somente atua eficientemente sobre as células que estão em divisão. Desse modo, a poliploidização, geralmente, não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides. Em conseqüência, surge o problema relativo à reversão parcial ou total à condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, principalmente devido à proliferação das células diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores àquelas das células poliplóides. Por isso, tem variado bastante a forma de aplicação dos indutores de poliploidia, buscando eficiência no tratamento.

A indução de poliplóides com colchicina é o procedimento mais utilizado, entretanto, há poucos relatos a respeito de outros agentes antimitóticos para a indução de poliplóides de bananeira *in vitro* (Hammil et al., 1992; Van Duren et al., 1996; Ganga & Chezhiyan, 2002).

Outro composto à base de herbicidas, como dinitrianilina, proporcionou elevada taxa de poliploidização com menor toxicidade (Wan et al., 1991). Um desses compostos é a orizalina (3,5 dinitro N4, N – dipropylsulphate). Este agente antimitótico induz tetraploidia em concentrações muito menores que as utilizadas para a colchicina (Sree Ramulu et al., 1991; Wan et al., 1991) devido à alta afinidade das dinitroanilinas pela tubulina e à estabilidade do complexo orizalina-tubulina (Hart & Sabins, 1976; Okamura, 1980). Além disso, a interferência da orizalina no sistema de transporte de Ca^{+2} nas organelas afeta a função deste íon na formação do microtúbulo (Weisenberg, 1972), o que pode ser responsável pela eficiência deste antimitótico.

Os dois modos de ação da orizalina, formação do complexo orizalina-tubulina e a interferência no sistema de transporte de Ca^{+2} , devem promover maior despolimerização do microtúbulo, resultando em maiores taxas de indução de tetraploidia em relação à colchicina, que atua somente formando um complexo colchicina-tubulina. A necessidade de utilização de concentrações mais baixas de orizalina é uma vantagem devido ao menor custo envolvido e também à baixa fitotoxicidade, refletida em termos de ocorrência de outras ploidias mais altas que tetraploidia e mixoploidia (Ganga & Chezhiyan, 2002).

2.4.3.1 Efeito da poliploidia sobre as bananeiras

Uma série de efeitos morfofisiológicos é esperada pela poliploidização. O efeito imediato é o aumento do tamanho das células, devido ao volume nuclear maior, levando a uma redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento. O conhecido efeito “gigas” encontra-se comumente em órgãos de padrão de crescimento altamente determinado, como flores e sementes. As características gerais apresentadas por plantas poliplóides incluem folhas e pétalas mais grossas, firmes e de coloração mais escura, estômatos maiores e

menos freqüentes, menor ramificação, retardamento no ciclo mitótico e conseqüente retardamento na floração e na frutificação (Brieger, 1992; Dressler, 1993; Takamura & Miyajima, 1996).

Geralmente, a poliploidização é induzida para contornar a esterilidade cromossômica dos híbridos interespecíficos. Entretanto, ela pode também ser utilizada para induzir a esterilidade. Nesse caso, são induzidos níveis de poliploidia ímpar, em geral triploides ou pentaploides. Indivíduos com poliploidia ímpar são normalmente estéreis (Guerra, 1989).

As plantas de bananeiras com um nível de ploidia não muito elevado (até 6x) são mais interessantes por serem férteis e apenas um pouco mais tardias no desenvolvimento. Isso porque, apesar de as plantas tri e tetraploides serem mais vigorosas que as diplóides normais, ocorre o “efeito de dose” dos genes, em que, até um determinado momento, ganham-se vigor e precocidade, mas, passado este limite, gastam-se muita energia e tempo na duplicação do próprio DNA. Isso retarda os ciclos vitais, que expressa em menor produção de biomassa por unidade de tempo (Dressler, 1993).

Vakili (1962) utilizou colchicina para induzir a poliploidia em bananeira e observou que a droga aumentou a mortalidade, retardou o crescimento das plantas e induziu a duplicação do número cromossômico. Plantas tetraploides ficaram mais altas e mais robustas que as diplóides, porém, com crescimento mais lento, folhas mais inclinadas e sistema radicular menos desenvolvido.

2.4.3.2 Verificação de ploidia

A determinação do nível de ploidia, em plantas submetidas à duplicação cromossômica, pode ser realizada diretamente por meio da contagem do número de cromossomos em células mitóticas e meióticas (Guerra, 1989; Villa, 1995).

No entanto, a análise citogenética exige muita experiência do pesquisador, sendo o procedimento laborioso e demorado, desvantajoso quando se trata de análises em grande número de plantas (Villa, 1995; Magalhães et al., 1996; Sari et al., 1999).

Outro método usado para a identificação do nível de ploidia, também conhecido como método indireto, é a caracterização citoanatômica e morfológica, ou seja, a avaliação de determinadas características da planta, tais como os aspectos morfológicos, diâmetro do grão de pólen, número de cloroplastos por par de células-guarda, tamanho e densidade dos estômatos foliares. Esse método pode ser útil para inferir o número de ploidia de plantas submetidas à indução de poliploidia, sendo a análise estomática a mais citada na literatura (Villa, 1995; Magalhães et al., 1996; Souza & Queiroz, 2004).

No entanto, vários autores enfatizaram que os métodos indiretos podem ser influenciados pelo ambiente e a análise individual de algumas variáveis poderá ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (Magalhães et al., 1996; Sari et al., 1999; Souza & Queiroz, 2004). Além disso, os métodos indiretos possibilitam apenas distinção entre indivíduos poliplóides e diplóides, não sendo útil para detectar, por exemplo, triplóides de tetraplóides (Magalhães et al., 1996; Sari et al., 1999). Mesmo assim, a aplicação de métodos indiretos é importante, uma vez que o descarte das plantas poliplóides possibilitará considerável redução de número de plantas a serem submetidas à análise citogenética, reduzindo custos e acelerando o processo de seleção (Souza & Queiroz, 2004).

A verificação da ploidia pode ser feita também por meio da análise de citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear (Dolezel, 1991). Essa técnica envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida (Côrte-Real et al., 2002). Essas partículas intersectam uma a uma um feixe de laser, ocorrendo um processo de

dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (Dolezel & Bartos, 2005). A intensidade de dispersão da luz, ou emissão de fluorescência, está relacionada com as propriedades das partículas que se está analisando (Dolezel & Bartos, 2005). 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 poucas gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (Galbraith et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas, incluindo estimativa do tamanho do genoma, avaliação de ploidia, detecção de mixoploidia e aneuploidia, avaliação de ciclo celular, estudo de eliminação cromossômica, separação de células, cromossomos ou organelas e outras aplicações. (Dolezel & Bartos, 2005).

A análise de citometria de fluxo permite a detecção de mixoplóides (material contendo variação na quantidade de DNA). A existência de vários picos com quantidades de DNA variáveis é um indicativo de mixoploidia. Adicionalmente, a citometria de fluxo permite a detecção de pequenas variações na quantidade de DNA. Trabalhando-se com um refinamento da técnica, de histogramas com 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 (variações numa pequena quantidade de cromossomos).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. C. de. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimutogênicos**. 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. AGRIANUAL 2008. São Paulo: FNP, 2007. 552 p.

ALVES, E. J.; OLIVEIRA, M. A.; DANTAS, J. L. L.; OLIVEIRA, S. L. Exigências Climáticas. In: ALVES, E. **A cultura da Banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2 ed. Cruz das Almas: Embrapa CNPMF, 1997. p.35-46,.

BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milho**. 2004. 119. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BRIEGER, A. H. N. **Caracterização morfológica e estudo da anatomia foliar de populações de Epidendrum nocturnum Jacq. (Orchidaceae)**. 1992. 79 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CARES, J. E. Pragas e nematóides de bananeira: manejo integrado. In: MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. **Simpósio Brasileiro sobre bananicultura e Workshop do Genoma Musa**. Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p.112.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M.; LEÃO, C. (2002). Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de levedura. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, v. 71, p. 19-33, abr. 2002.

DANIELLS, J.; JENNY, C.; KARAMURA, D.; TOMEKPE, K. Williams, cultivated varieties AAA. In: SHARROCK, S. (Ed). **Musalogue: a catalogue of Musa germplasm - diversity in genus Musa**. Montpellier: [s.n.], 2001. p. 76.

DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W. dos S.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA, S. de O. e; SOUZA, A. da S. **Citogenética e melhoramento genético da bananeira (*Musa spp.*)**. Brasília: EMBRAPA-CNPMF, 2001. 61p. (EMBRAPA-CNPMF. Documentos, 48).

DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA, S. de O. e; SOUZA, A. da S SOARES FILHO, W. dos S. (1997). Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais** Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1993. p. 27-34.

DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. O.; SOUZA, A. S.; ALVES, E. J.; CORDEIRO, Z. J. M.; SOARES FILHO, W. S. S. Citogenética e melhoramento genético. In: ALVES, E. (Org). **A cultura da Banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Cruz das Almas: Embrapa CNPMF, 1997. p. 107-150.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides, 1993. 314 p.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Pozman, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J. Flowcytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 2, n. 4, p. 143-154, Dec. 1991.

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, Dec. 2005

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/site/340/default.aspx>>. Acesso em: 15 out. 2007.

GANGA, M.; CHEZHIAN, N. Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa spp.*). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 77, n. 5, p. 572-575, Sept. 2002.

GANRY, J. A fine future for bananas. **FruiTrop**, Paris, v. 98, n. 98, 2003.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDON, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, Washington, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, 1983

GOLD, C. S.; PEÑA, J. E.; KARAMURA, E. B. Biology and integrated pest management for the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: *Curculionidae*). **Integrated Pest Management Reviews**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 79-155, 2001.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 142 p.

HAVAS, L. Effects of colchicine and “*vascum album*” preparation on germination of seeds and growth of seedlings. **Nature**, London, v. 139, n. 3513, p. 371-372, 1937

HART, J. W.; SABNIS, D. D. Binding of colchicine and luminocolchicine to components in plant extracts. **Phytochemistry**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 1897-1901, Dec. 1976.

JARRET, R.; GAWEL, N.; WHITTEMORE, A.; SHARROCK, S. PFLP-based phylogeny of *Musa* species in Papua New Guinea. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 84, n. 5/6, p. 579-584, Aug. 1992

JONES, D. R. Introduction to banana, abaca and enset. In: JONES, D. R. (Ed.). **Diseases of banana, abaca and enset**. Wallingford: Cab, 2000. 544p.

MAK, C.; HO, Y. W.; TAN, Y. P.; IBRAHIM, R. .Novaria – un nuevo mutante de banano inducido por radiación gama. **Infomusa**, Montpellier, v. 5, n. 1, p. 35-36, 1996.

MOREJOHN, L. C.; BUREAU, T. E.; BAJER, M.; BAGER, A. S.; FOSKET, D. E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. **Planta**, Berlin, v. 172, n. 2, p. 252-264, Oct. 1987.

OKAMURA, S. Binding of colchicine to asoluble fraction of carrot cells grown in suspension cultures. **Planta**, Berlin, v. 149, n. 4, p. 350, 1980.

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

PAGLIARINI, S. M. Citogenética Aplicada ao Melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; INGLIS, M. C. V. (Eds.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas**. [S.l.:s.n.], 2001. p. 971-910.

PLOETZ, R. C.; THOMAS, J. R.; SLAUBAUGH, W. Diseases of banana and plantain. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Wallingford: CABI, 2003. p. 73-134.

ROTH, P. S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake** 1984. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, n. 3 / 4. p. 265-277, Dec. 1999.

SHARMA, A. K.; SHARMA, A. **Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering**. Amsterdam: Hardwood Academic, 1999. 371 p.

SHEPHERD, K. History and methods of banana breeding. In: **Report of the first external program and management review of the international network for the improvement of banana and plantain**. Washington: CGIAR SECRETARIAT, 1992. p. 108-110.

SLUDER, G. The practical use of colchicines and cocemid to reversibly block microtubule assembly in living cells. In: ADOLFH, K. W. **Advanced techniques in chromosome research**. New York: Marcel Decker, 1991. p. 427-447.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. M. Variedades. In: Borges, A. L.; Souza, L. S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 45-58.

SILVA, S. de O.; ROCHA, S. A.; ALVES, E. J.; CREDICO, M. de; PASSOS, A. R. Caracterização morfológica e avaliação de cultivares e híbrido de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n. 2, p. 161-169, ago. 2000.

SILVA, S. de O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J.; BORGES, A. L.; FANCELLI, M.; OLIVEIRA, M. A. **Avanços do programa de pesquisa em *Musa* no CNPMF, EMBRAPA, Brasil**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMF, 1996. v. 65, 37 p.

SILVA, S.de O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R. S. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. (Org.). **Melhoramento de Frutíferas Tropicais**. Viçosa, MG, v. 1, p. 101-157, 2002.

SILVA, S. de O.; MATOS, A. P. de; ALVES, E. J. Melhoramento genético da bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 693-703, maio 1998.

SIMMONDS, N. W. Bananas. In: SMART, J.; SIMMONDS, N. W. Evolution of crops plants. **Logman Scientific e Technical**. New York: J. Wiley, 1995. p. 370-374.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 516-520, jul./set. 2004.

SOUZA, J da S.; TORRES FILHO, P. Aspectos socioeconômicos. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA –SP/ Cruz das Almas: CNPMF, 1997. p. 507-524.

SREE RAMULU, K.; VERHOEVEN, H. A.; DJKHUIS, P. Mitotic blocking, micronucleation and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos methyl and colchicine in potato. **Protoplasma**, Vienna, v. 160, n. 2/3, p. 65-73, 1991.

STOVER, R. H.; BUDDENHAGEN, I. W. Banana BREEDING: Polyploidy, disease resistance and productivity. **Fruits**, Paris, v. 41, n. 3, p. 175-191, 1986.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. **Banana**. 3th ed. London: Longmans, 1987

SWENNEN, R.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Phenotypic diversity and patterns of variation in West and Central African plantains (*Musa* spp. AAB group *Musaceae*). **Economy Botany**, v. 49, n. 3, p. 320-327, July/Sept. 1995.

TAKAMURA, T.; MIYAJIMA, I. Colchicine induced tetraploid in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 65, n. 4, p. 305-312, 1996.

TEZENAS, D. U.; MONTCELL, H. *Musa acuminata* subspecie bankii status and diversity. In: WORKSHOP ON IDENTIFICATION OF GENETIC

DIVERSITY IN THE GENUS MUSA, 1988, Montpellier. **Proceedings...**
Montpellier: INIBAP, 1988. 12 p.

UNITED NATIONS CONFERENCE TRADE AND DEVELOPMENT. **Market information in the commodities área. Agricultural products: banana.** Geneva: Info Comm, 2007. Disponível em: <<http://r0.unctad.org/infocomm/anglains/banana/market.htm>>. Acesso em: 01 jul. 2007.

VAKILI, N. G. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 54, p. 24-36, Jan. 1967.

VAKILI, N. G. Colchicine-induced polyploidy in *Musa*. **Nature**, London, v. 194, n. 4827, p. 453-454, 1967.

VUYLSTEKE, D. R.; SWENNEN, R. L.; ORTIZ, R. Development and performance of black Sigatoka-resistance tetraploid hybrids of plantain (*Musa* spp., AAB group). **Euphytica**, Wagening, v. 65, n. 3, p. 33-42, 1993.

VAN DUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica**, Wageningen, v. 88, n. 1, p. 25-34, 1996

VILLA, V. B. Análise citomorfoanatômica e eletroférica de híbridos de *Solanum tuberosum* L. X. (*Solanum Tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt). 1995. 76 p. Dissertação (Mestrado em genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived Maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 1, p. 889-892, 1989

WAN, Y.; DUNCAN, D. R.; RAYBURN, A. L.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 81, n. 2, p. 205-211, 1991.

WEISENBERG, R. C. Microtubule formation *in vitro* in solutions staining low calcium concentrations. **Science**, Washington, v. 1977, n. 4054, p. 111-115, 1972.

CAPÍTULO II

INDUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIPLOIDIA EM *Musa acuminata*, Colla

1 RESUMO

PIO, Leila Aparecida Salles. **Indução e identificação de poliploidia em *Musa aciminata*, Colla.** 2008. Cap. 2, p. 23-55. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de induzir e identificar poliplóides por meio de análise estomática, contagem de cromossomos e citometria de fluxo nas cultivares de bananeira Malbut, Ouro, Lidi e Thong Dok Mak. Os explantes foram tratados com concentrações de colchicina (0; 2,5; 7,5 e 12,5 mM), por 24 e 48 horas e orizalina (0; 10; 30 e 50 μ M), por 4 e 7 dias. Para a identificação de poliplóides via análise estomática, amostras de folhas jovens de cada planta foram eletromicrografada em microscopia eletrônica de varredura. Foram avaliados a área (diâmetro polar x diâmetro equatorial) e o número de estômatos. Para análise de citometria de fluxo, foi retirada uma amostra de tecido foliar de cada planta, triturada, para a liberação de núcleos e corada com iodeto de propídeo. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados. Para análise citogenética, ápices radiculares foram pré-tratados com solução de 8-HQ 500 mg L⁻¹, por 3 horas e fixadas em solução de Carnoy, por 24 horas e submetidos a técnicas de esmagamento convencional. A coloração foi feita com solução de Giemsa a 10%. O trabalho permitiu a identificação de 4 plantas tetraplóides e 6 mixoplóides, pelas três técnicas de identificação utilizadas.

* Orientador: Moacir Pasqual – UFLA.

2 ABSTRACT

PIO, Leila Aparecida Salles Pio. **Poliploidy induction and identification in banana (*Musa acuminata*, Colla)**, 2008. Chap. 2, p. 23-55. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The aimed study to induct and to identify polyploidys identification through stomatal analysis, chromosome counting and flow cytometry in banana varieties: Malbut, Ouro, Lidi e Thong Dok Mak. Explants were treated with concentrations of colchicine (0, 2.5; 7.5 and 12,5mM) for 24 and 48 hours and with oryzalin (0, 10, 30 and 50µM) for 4 and 7 days. Toward polyploidys identification through stomatal analysis, samples of young leaves from every plant were evaluated by scanning electron microscopy area (polar diameter x equatorial diameter) and stomatal density were evaluated. Toward analysis in flow cytometry, quantity of leave tissue from each plant was cut and after, triturated (aiming a nucleus liberate) and redden with propidium iodide. A number of 10,000 events were evaluated. Toward cytogenetics analysis, type's roots were previous treated with 8-HQ 500 mg L⁻¹ solution for 3 hours and fixed in Carnoy solution for 24 hours and submitted to the conventional crushing techniques. Staining was done with solution of Giemsa (10%). It was concluded that 4 plants were identified as tetraploids and 6 as mixoploids through three identification techniques.

*Adviser: Moacir Pasqual – UFLA

3 INTRODUÇÃO

O plantio de variedades de bananeira tradicionais no Brasil tem sido um fator de vulnerabilidade às principais pragas e doenças que afetam essa cultura, tais como a sigatoka negra (*Mycospharella fijiensis* Morelet), a sigatoka amarela (*Mycospharella musicola* Leach) e o mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Estratégias alternativas de melhoramento genético da bananeira, fundamentadas na duplicação de cromossomos, induzidas por tratamentos como a colchicina e a orizalina, têm sido propostas como forma de induzir resistência a pragas e a doenças nos híbridos gerados pelos programas de melhoramento genético da cultura (Vakili, 1967; Stover & Buddenhagen, 1986). Além disso, em *Musa*, o alto vigor das plantas está diretamente associado com a ploidia, já que as variedades triploides e tetraploides são bem mais vigorosas que as diplóides. Entretanto, híbridos tetraploides são, geralmente, inferiores aos triploides, em termos de resistência ao despencamento e ao arqueamento das folhas, o que pode levar a maiores danos por ventos fortes (Stover & Simmonnds, 1987).

Em adição a um eficiente sistema para a indução de poliploidização, a produção de autotetraploides requer um método efetivo para a verificação de ploidia. A estimativa de ploidia baseada na análise do tamanho e na densidade de estômatos (Hammil et al., 1992; Van Duren et al., 1996) é um método fácil e simples, que possibilita a identificação entre supostos poliplóides e as testemunhas diplóides de um ensaio, uma vez que a área dos mesmos, normalmente, aumenta com o aumento do número de cromossomos. No entanto, alguns autores enfatizam que a análise estomática nem sempre é eficiente e segura, devido a efeitos genéticos e da análise individual de algumas variáveis, que podem ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (Sari et al., 1999; Souza e Queiroz, 2004).

A contagem de cromossomos constitui um método bastante útil, embora seja mais laborioso e demorado, sendo desvantajoso quando se trata de análises em grande número de plantas (Hammil et al., 1992; Ganga & Chezhiyan, 2002).

Para a verificação de ploidia em larga escala, tem sido realizada a análise do conteúdo de DNA nuclear, utilizando citometria de fluxo (Van Duren et al., 1996; Dolezel et al., 1994). Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (Galbraith et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de induzir duplicação cromossômica com o uso de diferentes concentrações de dois compostos indutores de poliploidização, a orizalina e a colchicina, em quatro cultivares diplóides de bananeira, Lidi, Thong Dok Mak, Malbut e Ouro e identificar os poliplóides. A verificação da ploidia, baseada na característica dos estômatos, foi comparada com a análise em citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear e a contagem de cromossomos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Etapa 1 Micropropagação do material vegetal e tratamento com os agentes antimitóticos

No Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, os explantes recebidos do Centro de Mandioca e Fruticultura da Embrapa (Cruz das Almas, BA), constituídos de

meristemas apicais dos diplóides Lidi, Thong Dok Mak, Ouro e Malbut. Em estágio de estabelecimento *in vitro*, foram multiplicados por duas gerações em meio de proliferação constituído de MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), com o objetivo de obter um número suficiente de brotações. Posteriormente, estas são submetidas aos tratamentos com colchicina (C₂₂H₂₅NO₆) e orizalina (3,5 dinitrpylsulfanilamida).

A colchicina foi utilizada nas concentrações finais de 0; 2,5; 7,5 e 12,5 mM e a orizalina, nas doses de 0; 10; 30 e 50 µM. A inoculação foi feita em meio líquido sob agitação (60 rpm), por 24 e 48 horas, para colchicina e 4 e 7 dias, para orizalina.

Após o tratamento, os explantes foram lavados três vezes com água destilada e transferidos para o meio de proliferação por mais um subcultivo para reduzir a frequência de quimeras e suas progênies. As plantas foram transferidas para meio de enraizamento (MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 0,70% de ágar).

Na fase de proliferação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com intensidade luminosa de 36 µMol. m². s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. O tempo de cada geração foi de trinta dias. Na fase de enraizamento, os explantes foram mantidos nas mesmas condições anteriores por 45 dias.

As plantas enraizadas foram transferidas para estufa e colocadas em tubetes com dimensão de 19 cm de comprimento x 5 cm de diâmetro superior, com substrato composto de 1 parte de substrato vegetal plantmax estaca:1 parte de pó de fibra de coco, adicionado de 150g de PG MIX (14-16-18) e de 150 g de Osmocote (19-6-10), sendo mantidas sob regime de nebulização intermitente e sombreamento de 50%. Após 60 dias, as plantas foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade para 20 litros, com o mesmo substrato.

O esquema fatorial foi o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x4x2, para colchicina (4 diplóides tratados com 4 concentrações de colchicina em dois períodos de exposição, 24 e 48 horas) e para orizalina (4 diplóides tratados com 4 concentrações de orizalina em dois períodos de exposição, 4 e 7 dias). Cada tratamento foi realizado em triplicata e o experimento repetido duas vezes.

Etapa 2- Cálculo da área e densidade de estomática

Foi realizada a coleta de dados de área e de densidade estomática, como forma de correlacionar o efeito da poliploidiação com esses dados. As análises foram feitas um ano após a aclimatização das plantas.

Foram utilizados cinco explantes por tratamento. No momento da aclimatização, foram utilizados números diferentes de plantas em cada tratamento, devido à multiplicação ou à mortalidade das plantas tratadas. Para obter uma amostra representativa da superfície da folha, a porção mediana desprovida de vasos, da parte abaxial das folhas número 1 (folha mais nova completamente aberta), foi coletada e levada para o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da UFLA. Foi retirada uma folha de cada planta.

Foram retirados fragmentos da região mediana da folha, desprovida de nervuras, com, aproximadamente, 0,5 mm², os quais foram fixados em suporte metálico (“stubs”) com fita adesiva de carbono e mantidos em dessecador, por 48 horas. Em seguida, foram recobertos com camada de ouro (20nm), em aparelho BAL-TEC, SCD-050. O material foliar preparado foi observado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO 40, XVP, com aumento de 600 vezes. Para a determinação da área (diâmetro polar x diâmetro equatorial) e da densidade estomática foram escolhidos, aleatoriamente, cinco campos de observações com mesma área (1 mm²) na epiderme da face

abaxial em cada amostra e, em cada uma, foram mensurados cinco estômatos.

O critério utilizado para separar as plantas tetraplóides das diplóides foi o de que todas as plantas que diferiram das testemunhas, em tamanho de estômatos e densidade, foram consideradas tetraplóides.

Etapa 3 - Análise de citometria de fluxo

O material utilizado para a análise foi o mais jovem possível (folhas nº 0). Foi coletada uma folha de cada planta (total de 94 plantas) e retirada uma pequena porção na região mediana. Os fragmentos foram embalados em papel alumínio e em sacos plásticos, identificados e enviados para a Universidade Federal de Juiz de Fora, em caixas de isopor com gelo. As análises foram realizadas no Laboratório de Genética, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das plantas e de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão LB01 gelado para a liberação dos núcleos (Dolezel et al., 1989). A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1mg/1mL de iodeto de propídeo, sendo adicionados, ainda, 5 µL de Rnase a cada amostra. As amostras foram armazenadas em refrigerador e analisadas após 1-2 horas. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson) e os histogramas obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>).

O conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula a seguir:

Amostra, 2C = Canal do pico G1 da amostra X Conteúdo 2C de DNA
DNA Canal do pico G1 de *P. sativum* do padrão (9,09 pg)

Etapa 4 - Análise citogenética

A indução da duplicação cromossômica foi averiguada pela contagem do número cromossômico em meristemas de raízes, para a detecção de poliploidia. As raízes das plantas selecionadas foram pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína 500 mg L⁻¹, por 3 horas. As raízes foram fixadas em solução de Carnoy (3:1), por um período mínimo de 24 horas.

Posteriormente, o material foi submetido à técnica de esmagamento, sendo as raízes lavadas, por três vezes, em água deionizada por um período de 10 minutos. A hidrólise da parede celular foi feita utilizando-se ácido clorídrico (HCl) 1N a 60°C, por 15 minutos. Após essa etapa, as raízes foram imersas em água deionizada gelada por 1 minuto, para a interrupção da reação de hidrólise e, a seguir, colocadas em solução de ácido acético 45%, por 10 minutos.

A extração e a fragmentação do meristema foram feitas sob microscópio estereoscópio e a montagem da lâmina por esmagamento em ácido acético 45%. As lâminas foram secadas ao ar e a retirada da lamínula foi feita com nitrogênio líquido (Barbosa et al., 2004). Em seguida, as lâminas foram imersas por 30 segundos em ácido acético 45% e coradas com Giemsa 10%, por 5 minutos.

A observação e a análise das lâminas foram feitas com uso de microscópio com câmera de captura de imagem, utilizando objetiva de aumento de 100 vezes (imersão em óleo).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de taxa de sobrevivência das plantas de bananeira submetidas aos tratamentos com colchicina e orizalina são apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Um ano após a aclimatização, observou-se que grande número das plantas tratadas não sobreviveu, principalmente aquelas cujas doses dos agentes antimetabólicos foram muito elevadas.

A importância dos agentes antimetabólicos está relacionada com a sua ação específica, que é a duplicação cromossômica. Entretanto, em concentrações elevadas ou períodos de exposição muito longos, essas substâncias possuem efeitos tóxicos, gerando grande mortalidade nas plantas tratadas. A tolerância à colchicina e à orizalina varia entre as espécies e as cultivares.

A aplicação dos agentes antimetabólicos causou oxidações nos tecidos que resultaram na morte dos explantes em boa parte dos genótipos, especialmente aqueles tratados por 48 horas com colchicina (Tabela 1) e 7 dias com orizalina (Tabela 2).

No momento da aclimatização, os diplóides Ouro e Malbut, submetidos aos tratamentos com colchicina, apresentaram maior taxa de sobrevivência, porém, um ano após a aclimatização, pouquíssimas plantas sobreviveram. Lidi foi a mais tolerante aos agentes antimetabólicos a longo prazo (Tabela 1). Após um ano de aclimatização, sobreviveram 30% das plantas tratadas com colchicina.

O diplóide Malbut, submetido aos tratamentos com orizalina, apresentou maior taxa de sobrevivência de plantas no momento da aclimatização, porém, a longo prazo, apresentou taxa de sobrevivência muito baixa. O diplóide Malbut foi o mais sensível e o Lidi o mais tolerante, seguido do Thong Dok Mak (Tabela 2). Cerca de 39% das plantas tratadas com orizalina sobreviveram após um ano de aclimatização.

TABELA 1 Sobrevivência de plantas de 4 diplóides de bananeira submetidas à duplicação cromossômica com colchicina.

Genótipos	Tempo	Concentração	Nº de plantas aclimatizadas	Nº de plantas com 1 ano de aclimatização
Lidi	24 h	controle	4	3
Lidi	24 h	2,5 mM	6	5
Lidi	24 h	7,5 mM	4	0
Lidi	24 h	12,5 mM	4	3
Lidi	48 h	controle	4	1
Lidi	48 h	2,5 mM	6	5
Lidi	48 h	7,5 mM	8	6
Lidi	48 h	12,5 mM	2	1
Subtotal			38	24
Ouro	24 h	controle	17	1
Ouro	24 h	2,5 mM	14	0
Ouro	24 h	7,5 mM	2	0
Ouro	24 h	12,5 mM	5	1
Ouro	48 h	controle	6	1
Ouro	48 h	2,5 mM	9	3
Ouro	48 h	7,5 mM	8	1
Ouro	48 h	12,5 mM	6	0
Subtotal			67	7
Malbut	24 h	controle	4	1
Malbut	24 h	2,5 mM	23	4
Malbut	24 h	7,5 mM	14	2
Malbut	24 h	12,5 mM	15	1
Malbut	48 h	controle	4	1
Malbut	48 h	2,5 mM	8	0
Malbut	48 h	7,5 mM	4	0
Malbut	48 h	12,5 mM	3	0
Subtotal			75	9
Thong Dok Mak	24 h	controle	3	1
Thong Dok Mak	24 h	2,5 mM	17	7
Thong Dok Mak	24 h	7,5 mM	8	2
Thong Dok Mak	24 h	12,5 mM	2	0
Thong Dok Mak	48 h	controle	4	1
Thong Dok Mak	48 h	2,5 mM	8	2
Thong Dok Mak	48 h	7,5 mM	4	4
Thong Dok Mak	48 h	12,5 mM	3	1
Subtotal			49	18
Total			189	58

TABELA 2. Sobrevivência de plantas de 4 diplóides de bananeira submetidas à duplicação cromossômica com orizalina.

Genótipos	Tempo	Concentração	Nº plantas aclimatizadas	Nº de plantas com 1 ano de aclimatização
Lidi	4 dias	controle	5	0
Lidi	4 dias	10 µM	7	4
Lidi	4 dias	30 µM	-	0
Lidi	4 dias	50 µM	3	2
Lidi	7 dias	controle	6	4
Lidi	7 dias	10 µM	14	13
Lidi	7 dias	30 µM	-	0
Lidi	7 dias	50 µM	3	1
Subtotal			38	24
Ouro	4 dias	controle	-	0
Ouro	4 dias	10 µM	-	0
Ouro	4 dias	30 µM	-	0
Ouro	4 dias	50 µM	6	0
Ouro	7 dias	controle	4	1
Ouro	7 dias	10 µM	5	2
Ouro	7 dias	30 µM	2	2
Ouro	7 dias	50 µM	8	0
Subtotal			25	5
Malbut	4 dias	controle	5	1
Malbut	4 dias	10 µM	15	1
Malbut	4 dias	30 µM	20	7
Malbut	4 dias	50 µM	1	0
Malbut	7 dias	controle	9	1
Malbut	7 dias	10 µM	10	7
Malbut	7 dias	30 µM	2	0
Malbut	7 dias	50 µM	-	0
Subtotal			62	17
Thong Dok Mak	4 dias	controle	5	4
Thong Dok Mak	4 dias	10 µM	23	9
Thong Dok Mak	4 dias	30 µM	-	0
Thong Dok Mak	4 dias	50 µM	-	0
Thong Dok Mak	7 dias	controle	2	0
Thong Dok Mak	7 dias	10 µM	-	0
Thong Dok Mak	7 dias	30 µM	5	3
Thong Dok Mak	7 dias	50 µM	1	1
Subtotal			36	17
Total			161	63

Devido à perda de parcelas, não foi possível correlacionar as melhores doses e tempos de exposição aos agentes antimitóticos. No entanto, o dano causado pelas duas toxinas foi claro. A orizalina, que foi usada em baixas

concentrações, deveria ter sido menos tóxica que a colchicina, no entanto, as duas substâncias apresentaram taxa de sobrevivência de plantas semelhantes.

Ao contrário do esperado, no tratamento controle, a taxa de mortalidade das plantas foi grande. Isso pode ter ocorrido devido ao grande período que as plantas foram mantidas em casa de vegetação, dentro de vasos. Se as plantas tivessem sido conduzidas no campo, a taxa de sobrevivência seria maior.

A ocorrência de atraso na regeneração de plantas e de baixa taxa de sobrevivência foi observada por Ganga & Chezhyan (2002). Estes eventos podem estar relacionados com a ocorrência de mixoplóides e altos níveis de ploidia.

As plantas regeneradas apresentaram crescimento mais lento, folhas pequenas e espessas, quando comparadas com o controle, o que pode ser indicativo da obtenção de autotetraplóides.

A duplicação dos cromossomos é resultante da afinidade dos agentes antimitóticos com o fuso, particularmente com a tubulina, inibindo a sua formação e, conseqüentemente, a divisão da célula. Como resultado, o número de cromossomos por célula será duplicado a cada ciclo mitótico, na presença do inibidor (Hugdahl & Morejohn, 1993).

A indução de poliplóides com colchicina é um procedimento utilizado para várias espécies de plantas, entretanto, pouco tem sido relatado a respeito da aplicação de colchicina e outros agentes antimitóticos para a indução de poliplóides de bananeira *in vitro*. A aplicação de colchicina em bananeira resultou na formação de plantas tetraplóides mais altas e mais robustas que as diplóides, porém, com crescimento mais lento e folhas mais inclinadas, e sistema radicular menos desenvolvido (Vakili, 1967; Hammil et al., 1992). Ganga & Chezhiyan (2002) testaram concentrações de dois inibidores da formação do fuso (colchicina e orizalina) e diferentes períodos de tratamentos, para a obtenção de tetraplóides de bananeiras. Os genótipos utilizados responderam

diferentemente aos agentes antimitóticos testados. A capacidade de duplicação cromossômica de ambas as substâncias foi semelhante, entretanto, a concentração de colchicina necessária foi 125 a 200 vezes maior que a orizalina.

A avaliação da ploidia das plantas sobreviventes por meio de análises estomáticas, citometria de fluxo e contagem de cromossomos será descrita para cada diplóide.

Malbut

Apenas 9 (12%) das plantas do diplóide Malbut aclimatizadas sobreviveram aos tratamentos com colchicina. Destas, três apresentaram maiores diferenças em relação aos tratamentos controle, sendo consideradas como possíveis tetraplóides pela análise estomática (2 com 2,5 mM de colchicina, por 24 horas e 1 com 12,5 mM, por 24 horas), conforme Tabela 3. Todas as plantas submetidas aos tratamentos por 48 horas não sobreviveram. As três plantas sobreviventes foram submetidas à análise por citometria de fluxo e foram avaliadas como diplóides.

Cerca de 27% (17 plantas) do diplóide Malbut sobreviveu aos tratamentos com orizalina. Destas, apenas duas plantas submetidas ao tratamento de 10 μ M, por 7 dias, apresentaram maior área e menor densidade estomática, porém, foram classificadas como diplóides pela citometria, conforme Tabela 4.

As análises de contagem de cromossomos não foram realizadas para esse diplóide porque nenhuma planta foi considerada poliplóide pela citometria de fluxo.

TABELA 3. Características anatômicas da epiderme e de citometria de fluxo em plantas de bananeira diplóide Malbut submetidas ao tratamento com colchicina.

Tratamento	Características anatômicas			Citometria de fluxo	
	Área (μm^2)	Densidade estomática ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$)	Ploidia	Posição do pico	Ploidia
0	204,1 a	30,8 c	2n	-	-
0	242,6 b	27,2 b	2n	-	-
2,5 Mm/24h	260,3 c	20,0 a	4n	-	-
2,5 Mm/24h	286,1 d	25,8 b	4n	-	-
2,5 Mm/24h	250,8 c	23,8 b	2n	29	2n
2,5 Mm/24h	237,4 b	21,8 a	2n	-	-
7,5 Mm/24h	255,5 c	30,4 c	2n	-	-
7,5 Mm/24h	264,1 c	25,4 b	2n	37	2n
12,5 Mm/24h	270,6 d	37,8 d	4n	37	2n

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 4. Características anatômicas da epiderme e de citometria de fluxo em plantas de bananeira diplóide Malbut submetidas ao tratamento com orizalina.

Tratamento	Características anatômicas			Citometria de fluxo	
	Área (μm^2)	Densidade estomática ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$)	Ploidia	Posição do pico	Ploidia
0	246,4 a	20,2 b	2n	35	2n
0	210,6 a	23,0 b	2n	-	-
10μM/4dias	285,9 a	35,4 d	2n	34	2n
30μM/4dias	235,7 a	37,8 e	2n	34	2n
30μM/4dias	292,2 a	27,8 c	2n	34	2n
30μM/4dias	239,5 a	21,4 b	2n	-	-
30μM/4dias	261,0 a	39,4 e	2n	33	2n
30μM/4dias	266,4 a	25,4 c	2n	-	-
30μM/4dias	229,9 a	43,2 e	2n	35	2n
30μM/4dias	257,3 a	28,2 c	2n	-	-
10μM/7dias	260,4 a	23,0 b	2n	35	2n
10μM/7dias	239,5 a	22,0 b	2n	33	2n
10μM/7dias	257,3 a	21,2 b	2n	32	2n
10μM/7dias	265,4 a	27,2 c	2n	36	2n
10μM/7dias	292,2 a	32,0 d	2n	35	2n
10μM/7dias	446,7 b	12,8 a	4n	37	2n
10μM/7dias	404,3 b	17,8 a	4n	37	2n

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Ouro

A cultivar Ouro foi a mais sensível aos tratamentos, sobrevivendo apenas 10 plantas tratadas com colchicina (15%) e 5 com orizalina (20%).

Uma planta do tratamento com 2,5 mM de colchicina, por 24 horas, foi classificada como tetraplóide pela análise estomática e citometria de fluxo, porém, pela contagem de cromossomos foi classificada como mixoplóide (Tabela 5). Outras duas plantas foram classificadas como tetraplóides pela análise estomática, porém, a ploidia não se confirmou pela citometria de fluxo.

TABELA 5. Características anatômicas da epiderme, citometria de fluxo e análise citogenética em plantas de bananeira diplóide Ouro submetidas ao tratamento com colchicina.

Tratamento	Características anatômicas			Citometria de fluxo		Análise citogenética	
	Área (μm^2)	Densidade estomática ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$)	Ploidia	Posição do pico	Ploidia	Número de cromossomos	Ploidia
0	260,8 a	7,5 a	2n	-	-	22	2n
0	242,1 a	18,0 b	2n	-	-	-	-
2,5mM/24h	260,9 a	2,6 a	2n	32	2n	-	-
2,5mM/24h	313,7 c	15,0 b	4n	60	4n	31	Mixoplóide
2,5mM/24h	285 b	18,4 b	2n	-	-	-	-
12,5mM/24h	289 b	15,4 b	2n	38	2n	-	-
2,5mM/48h	285,3 b	16,0 b	2n	32	2n	-	-
2,5mM/48h	353,3 c	7,2 a	4n	39	2n	-	-
2,5mM/48h	319,9 c	13,8 b	4n	35	2n	-	-
7,5mM/48h	289 b	13,5 b	2n	-	-	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

No tratamento com orizalina, uma planta diferiu da testemunha em relação à densidade e à área de estômatos (30 μM de orizalina por 7 dias). A ploidia não pôde ser confirmada pela citometria, devido à morte da planta. A análise citogenética não foi realizada.

TABELA 6. Características anatômicas da epiderme e de citometria de fluxo em plantas de bananeira diplóide Ouro submetidas ao tratamento com orizalina.

Tratamento	Características anatômicas		Citometria de Fluxo		
	Área (μm^2)	Densidade Estomática ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$)	Ploidia	Posição do pico	Ploidia
0	277,7 b	12,8 a	2n	-	-
10 μM /7 dias	280,0 b	14,8 a	2n	36	2n
10 μM /7 dias	337 c	16,6 a	2n	36	2n
30 μM /7 dias	324,3 c	15,6 a	2n	36	2n
30 μM /7 dias	219,3 a	21 b	4n	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Lidi

O diplóide Lidi foi o mais tolerante aos tratamentos, tendo maior número de plantas sobreviventes aos dois agentes antimitóticos, sobrevivendo 28 plantas tratadas com colchicina (73%) e 24 com orizalina (63%).

Pelos dados da Tabela 7, pode-se observar que o tratamento com colchicina foi mais eficiente, pois promoveu a poliploidia em 5 plantas (3 com a dosagem de 12,5 mM, por 24 horas e 2 com 7,5 mM por 48 horas).

Uma planta classificada como mixoplóide pela citometria foi confirmada pela contagem de cromossomos (12,5mM/24h), porém, outra (12,5mM/24h) foi identificada como tetraplóide pela análise estomática e citometria de fluxo, mas, pela análise citogenética, foi considerada mixoplóide e, ainda, uma planta (7,5mM/48h) foi classificada como tetraplóide pelas análises citogenética e estomática, e pela citometria de fluxo foi identificada como mixoplóide. As outras duas (12,5mM/24h e 7,5mM/48h) tiveram a tetraploidia confirmada pelas três técnicas, então, é possível afirmar que essas plantas são realmente tetraplóides e as outras três mixoplóides.

TABELA 7. Características anatômicas da epiderme, citometria de fluxo e análise citogenética em plantas de bananeira diplóide Lidi submetidas ao tratamento com colchicina.

Tratamento	Características anatômicas			Citometria de fluxo		Análise citogenética	
	Área (μm^2)	Densidade estomática ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$)	Ploidia	Posição do pico	Ploidia	Número de cromossomos	Ploidia
0	161,1 b	60,6 e	2n	-	-	22	2n
0	160,3 b	49,2 d	2n	-	-	-	-
0	177,0 b	45,8 d	2n	-	-	-	-
0	161,5 b	38,2 c	2n	-	-	-	-
2,5 mM/24h	184,1 c	52,8 e	2n	28	2n	-	-
2,5 mM/24h	220,6 d	43,8 d	2n	27	2n	-	-
2,5 mM/24h	193,3 c	32,8 b	4n	31	2n	-	-
2,5 mM/24h	162,8 b	49,8 d	2n	30	2n	-	-
2,5 mM/24h	167,7 b	47,4 d	2n	33	2n	-	-
7,5 mM/24h	229,3 e	40,2 c	4n	29	2n	-	-
7,5 mM/24h	175,8 b	45,8 d	2n	30	2n	-	-
7,5 mM/24h	162,1 b	39,8 c	2n	29	2n	-	-
7,5 mM/24h	175,1 b	54,0 e	2n	33	2n	-	-
12,5 mM/24h	256,6 f	19,8 a	4n	59	4n	44	4n
12,5 mM/24h	190,2 c	32,6 b	4n	60	4n	31	Mixoplóide
12,5 mM/24h	210,8 d	33,4 b	4n	32 e 60	Mixoplóide	33	Mixoplóide
2,5 mM/48h	194,3 c	43,6 c	2n	27	2n	-	-
2,5 mM/48h	171,5 b	43,4 c	2n	-	-	-	-
2,5 mM/48h	180,5 c	37,2 c	2n	31	2n	-	-
2,5 mM/48h	170,6 b	50,8 d	2n	32	2n	-	-
2,5 mM/48h	183,0 c	43,2 c	2n	-	-	-	-
7,5 mM/48h	230,5 e	39,2 c	4n	60	4n	44	4n
7,5 mM/48h	232,9 e	40,8 c	4n	30 e 60	Mixoplóide	44	4n
7,5 mM/48h	181,2 c	55,0 e	2n	33	2n	-	-
7,5 mM/48h	195,4 c	41,4 c	2n	-	-	-	-
7,5 mM/48h	177,0 b	53,4 e	2n	31	2n	-	-
7,5 mM/48h	202,3 d	38,6 c	2n	-	-	-	-
12,5 mM/48h	104,1 a	39,6 c	2n	30	2n	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Conforme dados da Tabela 8, uma planta tratada com $10\mu\text{M}$ de orizalina, por 7 dias, foi identificada como tetraplóide pelas análises estomática, citometria e de contagem de cromossomos, apresentando maior densidade de estômatos e maior área, contrariando os resultados obtidos até o momento, em que as tetraplóides e as mixoplóides apresentaram maior área de estômatos e menor densidade.

TABELA 8. Características anatômicas da epiderme, citometria de fluxo e análise citogenética em plantas de bananeira diplóide Lidi submetidas ao tratamento com orizalina.

Tratamento	Características anatômicas			Citometria de fluxo		Análise citogenética	
	Área (µm ²)	Densidade estomática (n ^o /mm ²)	Ploidia	Posição do pico	Ploidia	Número de cromossomos	Ploidia
0	128,3 a	28,8 b	2n	30	2n	22	2n
0	182,7 c	28,8 b	2n	33	2n	-	-
0	197,1 c	23 a	2n	-	-	-	-
0	213,8 c	24,2 a	2n	-	-	-	-
10µM/4dias	163,3 b	26,2 b	2n	30	2n	-	-
10µM/4dias	284,5 e	19,8 a	2n	28	2n	-	-
10µM/4dias	234,5 d	43,4 d	4n	29	2n	-	-
10µM/4dias	201,9 c	53,4 e	2n	31	2n	-	-
50µM/4dias	156,6 b	31 b	2n	-	-	-	-
50µM/4dias	281,2 e	27,2 b	2n	-	-	-	-
10µM/7dias	202,2 c	22,4 a	2n	29	2n	-	-
10µM/7dias	182,4 c	38 c	2n	31	2n	-	-
10µM/7dias	161,4 b	43 d	2n	29	2n	-	-
10µM/7dias	194,8 c	37 c	2n	30	2n	-	-
10µM/7dias	187,8 c	44 d	2n	33	2n	-	-
10µM/7dias	185,3 c	43,2 d	2n	31	2n	-	-
10µM/7dias	214,6 c	22,8 a	2n	33	2n	-	-
10µM/7dias	193,8 c	37,8 c	4n	32	2n	-	-
10µM/7dias	217,3 c	42,2 d	4n	34	2n	-	-
10µM/7dias	195,8 c	37,6 c	2n	32	2n	-	-
10µM/7dias	233,5 d	30,8 b	2n	34	2n	-	-
10µM/7dias	199,4 c	36 c	4n	34	2n	-	-
10µM/7dias	237,7 d	45 d	4n	61	4n	44	4n
50µM/7dias	188,7 c	22,4 a	2n	27	2n	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Thong Dok Mak

O diplóide Thong Dok Mak obteve valores intermediários de taxa de sobrevivência, sobrevivendo 18 plantas tratadas com colchicina (36%) e 17 com orizalina (47%).

Pelos dados da Tabela 9, pode-se observar que uma planta tratada com 7,5 mM de colchicina por 48 horas foi classificada como tetraplóide pela análise estomática e contagem de cromossomos, porém, foi considerada como mixoplóide pela citometria de fluxo. Essa planta apresentou grande densidade e pequena área de estômatos, contrariando os demais resultados obtidos.

TABELA 9. Características anatômicas da epiderme, citometria de fluxo e análise citogenética em plantas de bananeira diplóide Thong Dok Mak, submetidas ao tratamento com colchicina.

Tratamento	Características anatômicas			Citometria de fluxo		Análise citogenética	
	Área (µm ²)	Densidade estomática (n ^o /mm ²)	Ploidia	Posição do pico	Ploidia	Número de cromossomos	Ploidia
0	282,5 c	12,4 a	2n	-	-	22	2n
0	258,9 b	17,8 b	2n	-	-	-	-
2,5mM/24h	214,4 a	29,6 d	2n	29	2n	-	-
2,5mM/24h	267,7 b	25,2 c	2n	36	2n	-	-
2,5mM/24h	252,5 b	26,6 c	2n	31	2n	-	-
2,5mM/24h	264,6 b	25,0 c	2n	35	2n	-	-
2,5mM/24h	236,8 a	29,8 d	2n	36	2n	-	-
2,5mM/24h	230,4 a	29,8 d	2n	41	2n	-	-
2,5mM/24h	226,0 a	29,0 d	2n	38	2n	-	-
7,5mM/24h	346,6 d	11,6 a	2n	-	-	-	-
7,5mM/24h	220,4 a	23,4 c	2n	-	-	-	-
2,5mM/48h	263,4 b	30,4 d	2n	-	-	-	-
2,5mM/48h	270,2 b	17,0 b	2n	-	-	-	-
7,5mM/48h	326,1 d	14,6 a	4n	36	2n	-	-
7,5mM/48h	237,3 a	37,8 e	4n	49	Mixoplóide	44	4n
7,5mM/48h	198,4 a	27,8 d	2n	-	-	-	-
7,5mM/48h	241,0 a	26,0 c	2n	-	-	-	-
12,5mM/48h	283,6 c	19,8 b	2n	35	2n	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Nos tratamentos com orizalina, uma planta submetida ao tratamento 10µM por 4 dias apresentou grande densidade de estômatos e pequena área e foi classificada como tetraplóide pela análise estomática e confirmada pela citometria de fluxo e pela contagem de cromossomos. Outra planta submetida ao tratamento 10µM/4dias, foi classificada como diplóide pelas análises estomáticas e de citometria de fluxo, porém, pela contagem de cromossomos foi classificada como tetraplóide, conforme Tabela 10.

TABELA 10. Características anatômicas da epiderme, citometria de fluxo e análise citogenética em plantas de bananeira diplóide Thong Dok Mak, submetidas ao tratamento com orizalina.

Tratamento	Características anatômicas		Citometria de fluxo		Análise citogenética		
	Área (µm ²)	Densidade estomática (n ^o /mm ²)	Ploidia	Posição do pico	Ploidia	Número de cromossomos	Ploidia
0	273,2 e	32,4 b	2n	-	-	22	2n
0	202,3 c	27,6 b	2n	-	-	-	-
0	209,1 c	35,2 c	2n	-	-	-	-
0	372 g	15,2 a	2n	-	-	-	-
10µM/4dias	235,9 d	27,6 b	2n	34	2n	-	-
10µM/4dias	302,8 f	27,2 b	2n	36	2n	-	-
10µM/4dias	215,1 c	30,4 b	2n	30	2n	-	-
10µM/4dias	258,0 d	31,8 b	2n	-	-	-	-
10µM/4dias	253,8 d	31,4 b	2n	31	2n	44	4n
10µM/4dias	206,8 c	30,0 b	2n	-	-	-	-
10µM/4dias	241,3 d	30,0 b	2n	32	2n	-	-
10µM/4dias	172,4 b	38,2 c	4n	-	-	-	-
10µM/4dias	127,9 a	58,0 d	4n	60	4n	44	4n
30µM/7dias	244,0 d	29,0 b	2n	30	-	-	-
30µM/7dias	242,6 d	19,2 a	2n	-	-	-	-
30µM/7dias	228,4 c	36,4 c	2n	34	2n	-	-
50µM/7dias	226,3 c	18,2 a	2n	37	2n	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Van Duren et al. (1996) induziram duplicação cromossômica em um diplóide de *Musa acuminata* e verificou que 56,2% de plantas com estômatos de 29-40 mm de comprimento e densidade de menos de 60 estômatos por mm² eram tetraplóides.

Conforme diversos autores, o aumento do nível de ploidia é diretamente proporcional ao número e ao tamanho de estômatos (Valkili, 1962; Wan et al., 1991; Souza & Queiroz, 2004). Porém, neste trabalho, foi verificado que, na maioria das vezes, plantas que apresentaram maior área e menor densidade de estômatos em relação à testemunha foram consideradas como possíveis poliplóides. No entanto, foi observado também plantas do diplóide Lidi, com maior área e maior densidade de estômatos (Tabela 8) e o diplóide Thong Dok Mak com maior densidade estomática e área igual ao da testemunha (Tabela 9) e ainda com menor área e maior densidade de estômatos (Tabela 10) também

foram pré-selecionadas como poliplóides. Devido a essa variação, o critério utilizado para a classificação de poliplóides pela análise estomática foi que plantas diferentes da testemunha, tanto para mais quanto para menos, foram classificadas como poliplóide por essa análise. Além disso, todas as plantas foram analisadas por citometria de fluxo para confirmar a ploidia e aquelas que foram classificadas como poliplóides pelas análises anteriores foram ainda analisadas citogeneticamente.

Na Figura 1 estão representadas eletromicrografias de varredura da superfície abaxial de uma planta diplóide e uma tetraplóide.

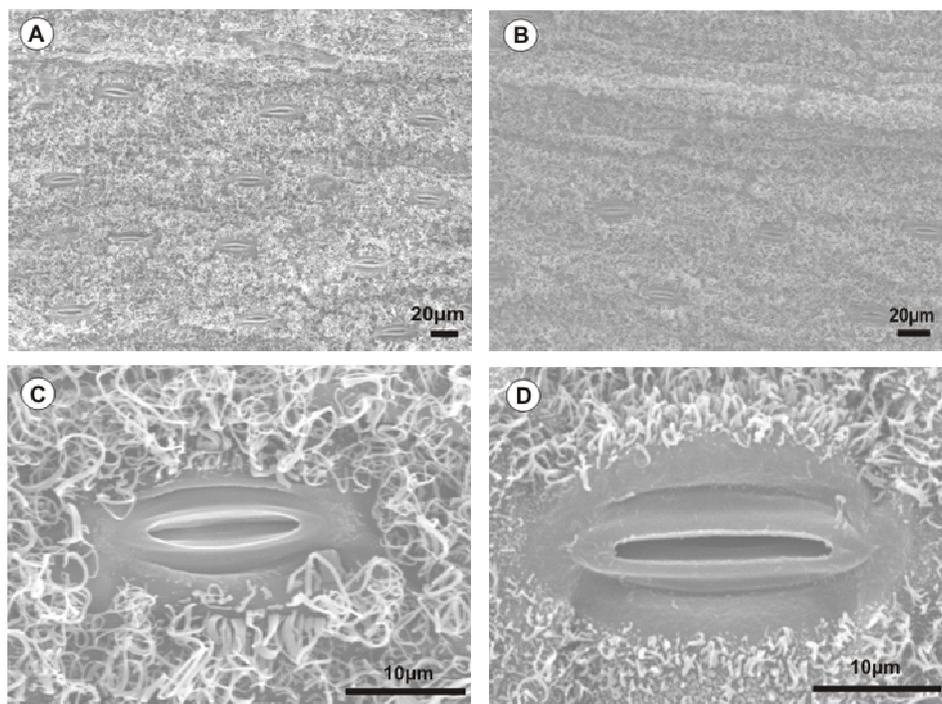


FIGURA 1. Eletromicrografia de varredura da superfície abaxial, mostrando estômatos de folhas de bananeira, cultivar Lidi, submetidas ao tratamento com colchicina, diplóide (A e C) e tetraplóide (B e D).

Motonobu et al. (1997) e Kim & Kim (2003) observaram que o número de estômatos em crisântemo e *Cymbidium*, respectivamente, foi diretamente proporcional ao nível de ploidia e que o tamanho dos estômatos não variou entre as plantas de diferentes níveis de ploidia. Porém, Vichiato (2005) detectou que plantas tetraplóides de *Dendrobium nobile* apresentaram maior frequência estomática porque o tamanho de suas células epidérmicas foi menor em relação às diplóides.

Alguns autores enfatizam que a análise estomática nem sempre é eficiente e segura, devido aos efeitos genéticos e da análise individual de algumas variáveis, que podem ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (Vandenhout et al., 1995; Magallanes et al., 1996; Van Duren et al., 1996; Souza e Queiroz, 2004; Madon et al., 2005). Apesar disso, a pré-verificação, baseada em características de estômatos, foi muito útil na identificação de uma população formada por mixoplóides e tetraplóides para reduzir o tamanho da população após a passagem *in vitro* (Van Duren et al., 1996).

Pela análise de citometria de fluxo, a ploidia de grande quantidade de plantas (várias centenas) pode ser medida por dia, produzindo resultados confiáveis porque o conteúdo de DNA não é influenciado por fatores externos, tais como intensidade luminosa, desenvolvimento de lâmina foliar e conteúdo de água no tecido da planta.

Os gráficos com as posições dos picos de uma planta diplóide e uma tetraplóide podem ser vistos na Figura 2. Conhecendo-se a posição relativa entre os picos de um material diplóide em relação a um padrão de referência, podem-se detectar materiais poliplóides.

A maioria das plantas classificadas como tetraplóides pela análise estomática foi confirmada pela citometria, outras também com características de tetraplóides foram confirmadas como mixoplóides. Ao todo, 6 plantas foram

classificadas como tetraplóides e 3 como mixoplóide, pela citometria de fluxo. Nenhuma planta diplóide pela análise estomática foi considerada como tetraplóide pela citometria. Isso é importante porque é possível separar as plantas em dois grupos: diplóides e mixoplóides + tetraplóides.

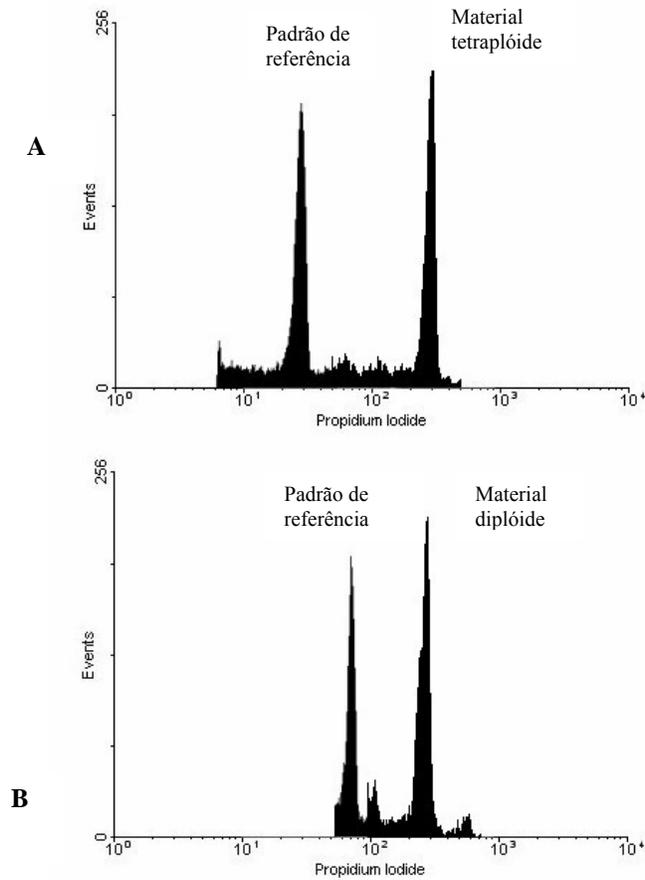


FIGURA 2. Detecção de poliploidia por citometria de fluxo. Em (A) a posição do pico do material analisado no canal 300 e o padrão de referência está no canal 30. Isso é um diagnóstico de que esse material é poliplóide, ou seja, possui o dobro da quantidade de DNA do material diplóide, sendo, portanto tetraplóide. Em (B), o pico do material analisado (diplóide) posiciona-se no canal 300 em relação ao pico do padrão de referência no canal 70.

A quantidade de DNA tem sido estudada em vários gêneros de importância econômica, como *Zea* (Rayburn et al., 1989), *Pennisetum* (Passos et al., 1994; Martel et al., 1997), *Hordeum* (Vogel et al., 1999), *Oryza* (Buso et al., 2000), *Brachiaria* (Pinheiro et al., 2000) e *Triticum* (Kubalaková et al., 2002).

Van Duren et al. (1996) utilizaram a citometria de fluxo para a identificação de bananeiras autotetraplóides induzidas por duplicação cromossômica a partir de materiais diplóides. O fenômeno de mixoploidia foi comum neste trabalho.

Outros exemplos da aplicação da citometria de fluxo na indução de duplicação cromossômica podem ser encontrados em diversos trabalhos (Thibault, 1998; Pinheiro et al., 2000; Roy et al., 2001; Petersen et al., 2002).

A contagem de cromossomos foi realizada em 15 plantas, sendo 5 diplóides e 10 poliplóides. Um resumo dos resultados de todas as análises realizadas encontra-se na Tabela 11.

TABELA 11. Análise citogenética, estomática e de citometria de fluxo de diplóides de bananeira Thong Dok Mak, Ouro e Lidi, com diferentes ploidias.

Tratamento	Análise citogenética	Citometria de fluxo	Análise estomática
TDM – colchicina - controle	2n	2n	2n
TDM – orizalina - controle	2n	2n	2n
Lidi – colchicina - controle	2n	2n	2n
Lidi – orizalina - controle	2n	2n	2n
Ouro – colchicina - controle	2n	2n	2n
TDM – colchicina- 7,5mM/48h	Mixoplóide	Mixoplóide	4n
Lidi – colchicina- 12,5mM/24h	Mixoplóide	Mixoplóide	4n
Ouro – colchicina- 2,5mM/24h	Mixoplóide	4n	4n
Lidi – colchicina- 12,5mM/24h	Mixoplóide	4n	4n
Lidi – colchicina- 7,5mM/48h	4n	Mixoplóide	4n
TDM – orizalina- 10µM/4 dias	4n	2n	2n
Lidi – colchicina- 12,5mM/24h	4n	4n	4n
TDM – orizalina- 10µM/4 dias	4n	4n	4n
Lidi – colchicina- 7,5mM/48h	4n	4n	4n
Lidi – orizalina- 10µM/4 dias	4n	4n	4n

Uma metáfase de células de um autotetraplóide com cromossomos de plantas de bananeira Thong Dok Mak pode ser vista na Figura 3.

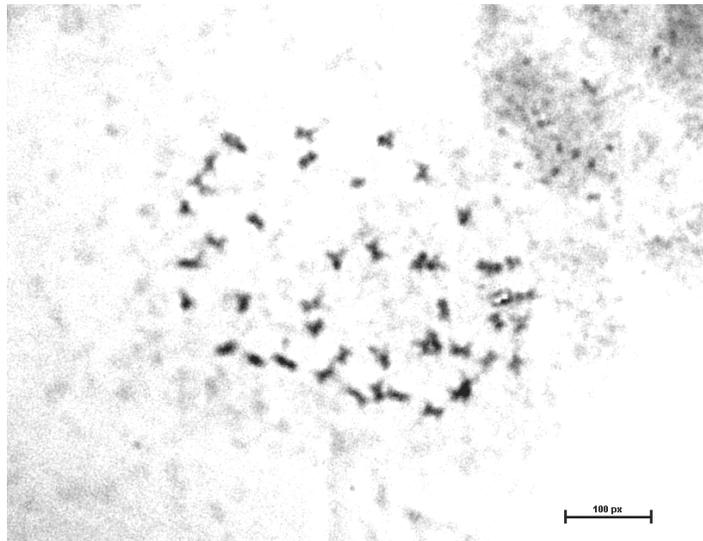


FIGURA 3 Metáfase mitótica de bananeira, Thong Dok Mak, com 44 cromossomos.

Pelos dados da Tabela 11 é possível observar que houve algumas variações de ploidia pelos três métodos utilizados. A análise citogenética foi feita utilizando-se meristemas de raízes, enquanto que as análises estomáticas e de citometria de fluxo foram feitas em folhas jovens das plantas. Como são tecidos diferentes, é comum que plantas tratadas com agentes antimitóticos apresentem células com ploidia diferentes, em locais diferentes na planta. Esse material é considerado mixoplóide (material com variação no número cromossômico). Vários autores (Binsfeld et al., 2000; Barbosa, 2004; Koutolis et al., 2005; Poutaraud & Girardin, 2005) relataram o efeito diferencial de antimitóticos, quando diferentes tecidos alvo e períodos de tratamentos são utilizados.

Como o crescimento e o desenvolvimento de uma folha são comandados por vários meristemas funcionando simultânea ou seqüencialmente, em

trabalhos de poliploidização, é evidente a dificuldade em se fazer com que a colchicina ou a orizalina afete todos esses meristemas, localizados em diferentes pontos topográficos da gema e funcionando em momentos diferentes, mesmo considerando apenas uma gema isolada (Rhoth 1984). Além disso, essas substâncias agem de forma eficiente somente em células que estão em divisão, portanto, a duplicação dos cromossomos pode não acontecer em todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides (Dolezel et al., 1994; Wan et al., 1989; Carvalho et al., 2005). Por esse motivo, a planta tratada poderá sofrer reversão parcial ou total da condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, principalmente devido à proliferação às células diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores àquelas células poliplóides.

Uma hipótese para se explicar a ocorrência de mixoploidia, neste trabalho, pode ser a eliminação cromossômica. Abreu (2002, 2006) e Barbosa (2004), trabalhando com a indução de duplicação cromossômica em híbridos triplóides de capim-elefante e milho observaram o fenômeno de mixoploidia na maioria das plantas analisadas. Segundo estes autores, houve grande variação no número cromossômico nas metáfases analisadas. As conclusões foram de que estas variações eram provenientes de eliminação cromossômica. Algumas alterações na mitose são características de eliminação cromossômica, tais como não orientação de cromossomos na metáfase, segregação tardia na anáfase, degradação de cromatina ou fragmentação de cromossomos e formação de micronúcleos (Singh, 2002).

A maioria das plantas classificadas como tetraplóides foi submetida ao tratamento com colchicina. Petersen et al. (2003) e Maldon et al. (2005) também verificaram que a colchicina foi mais eficiente que a orizalina na indução de duplicação cromossômica em *Miscanthus sinensis* e *Elaeis guineensis*, respectivamente.

Assim, a possibilidade de indução de autotetraplóides na cultura da bananeira tem um impacto significativo em programas de melhoramento, objetivando a transferência de valiosas características presentes em acessos diplóides e não facilmente disponíveis devido à natureza genômica de bananeiras cultivadas.

Neste trabalho, não foi possível definir os métodos de duplicação cromossômica. Devido ao grande número de plantas perdidas na fase de aclimatização, não foi possível comparar as dosagens e os tempos de exposição dos agentes antimitóticos e a interação com os diplóides estudados.

O maior problema observado durante a condução dos experimentos foi a morte da maioria das plantas, causada por vários motivos: toxidez dos agentes antimitóticos; longo tempo em casa de vegetação (mais de 2 anos), até a realização de todas as análises e poda drástica do material para a indução de rejuvenescimento, já que, para a análise de citometria de fluxo, foi necessária a utilização de folhas jovens.

Para a continuação deste trabalho, é recomendável que a análise de citometria de fluxo seja realizada na fase *in vitro*, na qual o material estará bem jovem. A partir desses resultados, poderá descartar as plantas diplóides, diminuindo a população para análises posteriores.

6 CONCLUSÕES

Pelas análises citogenética, estomática e de citometria de fluxo, são confirmadas 4 plantas tetraplóides e 6 mixoplóides.

O maior número de plantas tetraplóides e mixoplóides é obtido utilizando-se colchicina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. C. (2002). **Mixoploidia em híbridos de capim elefante x milho tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ABREU, J. C.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, nov. 2006.

ALVES, E. S.; GIUSTI, P. M.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P. H. N.; GUIMARÃES, E. T.; LOBO, D. J. A. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 561-566, out./dez. 2001.

BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho**. 2004. 119 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BINSFELD, P. C.; PETERS, J. A.; SCHNABL, E. H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e indução de micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, n. 3, p. 263-272, dez. 2000

BUSO, G. S. C.; PENTEADO, M. I. O.; POZZOBON, M. T.; PENALOZA, A.; DEL, P. S.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E. **Citometria de fluxo, contagem cromossômica e RAPD na identificação de genomas e espécies de *Oryza***. [S.l.]: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 44 p. (Boletim de Pesquisa, 10)

CARVALHO, J. F. R.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 69-75, Jan. 2005.

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 31, n. 2, p. 113-120, 1998.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVAK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Ashford, v. 36, n. 5, p. 351-357, 1994.

GANGA, M.; CHEZHIYAN, N. Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 572-575, Sept. 2002.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDON, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, Washington, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, May 1983.

HAMIL, S.D; SMITH, M.K.; DODD, WA. (1992).*In vitro* induction of banana autotetraploides by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Colling Wood, v. 40, n. 6, p. 887-896, 1992.

HANSEN, A. L.; GERTS, A.; JOERSBO, M.; ANDERSEN, S. B. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, n. 2, p. 231-237, 1992.

KIM, M. S.; KIM, J. Y. Chromosome doubling of a Cymbidium hybrid whit colchicine treatment in meristem culture. **Proceedings of NIOC**. Nagoya, p.37-40, 2003.

KOUTOLIS, A.; ROY, A.T.; PRICE, A.; SHERRIFF, L.; LEGGETT, G. (2005).DNA ploidy level of colchicines-treated hops (*Humulus lupulus* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 263-268, June 2005.

KUBALAKOVA, M.; VRANA, J.; CIHALIKOVA, J.; SIMKOVA, H.; DOLEZEL, J. Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 8, p. 1362-1372, June 2002.

MADON, M.; CLYDE, M. M.; HASMIM, H.; MOHD YUSUF, Y.; MAT, H.; SARATHA, S. Poliploidy induction of oil palm though colchicine and oryzalin

treatments. **Journal of Oil Palm Research**, Kuala Lumpur, v. 17, p. 110-123, 2005.

MAGALLANES, M. G. R.; PINTO, C.A.B.P., DAVIDE, L. C. Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 4, p. 480-484, out./dez. 1996.

MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S.; SARR, A. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar./Apr. 1997.

MOTONOBU, E.; KIM, J. S.; INADA, I. Production and characteristics of chromosome doubling plants of small flowered garden Chrysanthemum, *Dendranthema x gradiflorum* Ramat. Kitam. Cv. YS by colchicine treatment of cultured shoot tips. **Journal Japan Society Horticulturae Science**, Tokyo. V. 65, n. 4, p. 528-833, 1997.

PASSOS, L.; LABERT, G.; GALBRAITH, D. Separação de acessos de capim elefante com base no teor de DNA genômico, medido por citometria de fluxo. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Coronel Pacheco: EMBRAPA – CNPGL, 1994. p. 211.

PETERSEN, K. K.; HAGBERG, P.; KRISTIANSEN, K. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, n. 5, p. 445-450, Oct. 2002.

PETERSEN, K. K.; HAGBERG, P.; KRISTIANSEN, K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 137-146, May 2003.

PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; VALLE, C. B.; PENTEADO, M. I. O.; CANEIRO, V. T. C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 3, p. 274-278, Jan. 2000.

POUTARAUD, A.; GIRARDIN, P. Influence of chemical characteristics of soil on mineral and alkaloid seed contents of *Colchicum autumnale*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 101-108, Sept. 2005.

- RAYBURN, A. L.; AUGER, J. A.; BENZINGER, E. A.; HEPBURN, A. G. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. By flow cytometry. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 40, n. 220, p. 1179-1183, Nov. 1989.
- ROTH, P. S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. 1984. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- ROY, A. T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Report**, New York, v. 20, p. 489-495, Sept. 2001.
- SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, n. 3-4, p. 265-277, Dec. 1999.
- SINGH, R. J. **Plant Cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 463 p.
- SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 516-520, jul./set. 2004.
- STOVER, R. H.; BUDDENHAGEN, I. W. **Banana Breeding**: polyploidy, disease resistance and productivity. **Fruits**, Paris, v. 41, n. 3, p. 175-191, Mar. 1986.
- STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. **Banana**. 3th ed. London: Longmans, 1987.
- TRIBAULT, J. Nuclear DNA amount in pure species and hybrid willows (*Salix*): a flow cytometric investigation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 1, p. 157-165, Jan. 1998.
- VOGEL, K. P.; ARUMUGANATHAN, K.; JENSEN, K. B. Nuclear DNA content of perennial grasses of the Triticeae. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 3, p. 661-667, May/June 1999.
- VAKILI, N. G. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. **American Journal of Botany**, New York, v. 54, n. 1, p. 24-36, Jan. 1967.

VAKILI, N.G. Colchicine-induced polyploidy in *Musa*. **Nature**, London, v. 194, n. 4827, p. 453-454, 1962.

VANDERNHOUT, H.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; BAI, K. V. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 83, n. 2, p. 117-122, 1995.

VAN DUREN, M.; MORPURGO, R., DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica**, Wageningen, v. 88, n. 1, p. 25-34, 1996.

VICHIATO, M. R. M. Indução de tetraplóides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobili* LINDL. (Orchidaceae). 2004. 77 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 6, p. 889-892, 1989.

WAN, Y.; DUNCAN, D. R.; RAYBURN, A. L.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics** Berlin, v. 81, n. 2, p. 205-211, 1991.

CAPÍTULO III

ANÁLISES DE CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E ULTRA- ESTRUTURAIS DE PLANTAS MIXOPLÓIDES E AUTOTETRAPLÓIDES DE BANANEIRA

1 RESUMO

PIO, Leila Aparecida Salles. Análises de características anatômicas e ultra-estruturais de cultivares de bananeira mixoplóides e autotetraplóides. **In: _____**. **Indução e identificação de poliploidia em *Musa acuminata* Colla**. 2008. Cap. 3, p. 57-72. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da autotetraploidia e da mixoploidia nas características anatômicas e ultra-estruturais das cultivares de bananeira Malbut, Lidi e Thong Dok Mak. Foram feitas análises em plantas diplóides, mixoplóides e tetraplóides. Fragmentos retirados de folhas jovens foram submetidos às técnicas de preparação tradicionais para análise em microscopia eletrônica de transmissão. Foram realizados os cortes em seções semifinas (>100nm) e ultrafinas (<100nm). Foram avaliados comprimento e área de células do parênquima paliçádico e lacunoso, epidermes adaxial e abaxial, espessura do limbo e o número de cloroplastídeos. Os cortes ultrafinos foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão e foram observadas características ultra-estruturais dos cloroplastídeos. Observou-se que diferentes características anatômicas da epiderme foliar, assim como do mesofilo e da ultra-estrutura dos cloroplastídeos, sofreram modificações que permitam a separação dos diplóides, mas não apresentam diferenças entre tetraplóides e mixoplóides.

*Orientador: Moacir Pasqual – UFLA.

2 ABSTRACT

PIO, Leila Aparecida Salles. Analysis structural and ultrastructural characteristics in mixoploids and autotetraploidy banana varieties. In: _____. **Autotetraploidy induction and identification in banana (*Musa spp.*)**. 2008. Chap. 3, p. 57-72. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The aimed study to induct and to verification in autotetraploidys and mixoploids effects on the structural and ultrastructural characteristics in banana varieties: Malbut, Lidi e Thong Dok Mak. Were analyzed diploids, mixoploids and tetraploids plants. Fragments from young leaves were submitted to the conventional techniques for analysis in transmittion electron microscopy. Thick (>100nm) and thin (<100nm) sections were evaluated in light and transmittion electron microscopy, respectively. Length and area of cells from palyçadic and spongy parenchyma, adaxial and abaxial epidermis, leave thickness were measured and chloroplasts numbers were estimated. While to thin sections ultrastructural characteristics of chloroplasts were examined. It was concluded that differences between tetraploids and mixoploids was produced, only structural and ultrastructural characteristics of diploids.

* Adviser: Moacir Pasqual – UFLA

3 INTRODUÇÃO

A determinação do nível de ploidia em plantas submetidas à duplicação cromossômica pode ser realizada diretamente por meio da contagem dos cromossomos em células mitóticas e meióticas (Guerra, 1989; Villa, 1995).

No entanto, a análise citogenética exige muita experiência do pesquisador, sendo um procedimento laborioso e demorado, desvantajoso quando se trata de análises em grande número de plantas (Magallanes et al., 1996; Sari et al., 1999).

Outro método usado para a identificação do nível de ploidia, também conhecido como método indireto, é a caracterização citoanatômica e morfológica, como diâmetro do grão de pólen, número e tamanho de cloroplastídeos, tamanho de células, espessura das folhas, etc. (Villa, 1995; Magalhães et al., 1996; Souza & Queiroz, 2004).

Trata-se de métodos relativamente rápidos e fáceis para a avaliação do nível de ploidia e permitem estimativas de correlações estatísticas (Souza & Queiroz, 2004). A associação entre o nível de ploidia e as características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliplóides, principalmente porque essas características estão relacionadas com o aumento do tamanho das células, como resultantes da poliploidização (Lleras & Medri, 1978; Medri & Lleras, 1981; Villa, 1995; Magallanes et al., 1996; Souza & Queiroz, 2004).

No entanto, vários autores enfatizam que os métodos indiretos podem ser influenciados pelo ambiente e a análise individual de algumas variáveis poderá ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (Magallanes et al., 1996; Sari et al., 1999; Souza & Queiroz, 2004). Além disso, os métodos indiretos possibilitam apenas distinção entre indivíduos poliplóides e diplóides, não sendo útil para separar, por exemplo,

triplóides de tetraplóides (Magallanes et al., 1996; Sari et al., 1999). Mesmo assim, a aplicação dos métodos indiretos é importante, uma vez que o descarte das plantas diplóides possibilitará considerável redução do número de plantas a serem submetidas à análise citogenética, reduzindo custos e acelerando o processo de seleção (Souza & Queiroz, 2004).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar plantas diplóides, mixoplóides e tetraplóides induzidos em três cultivares de bananeira (Lidi, Thong Dok Mak e Ouro), mediante análises de características anatômicas e ultra-estruturais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Plantas de bananeira, cultivares Lidi, Ouro e Thong Dok Mak, diplóides, tetraplóides e mixoplóides, já identificadas quanto ao nível de ploidia, via análise estomática, citometria de fluxo e citogenética foram obtidas no Departamento de Agricultura da UFLA. Os experimentos foram realizados dois anos após a indução da poliploidia com colchicina e orizalina.

Fragmentos de 0,5 cm² foram retirados da folha nº 1 (folhas mais jovens completamente abertas) de cada material analisado e fixados em uma solução composta de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,0%), em tampão cacodilato, pH 7,2, 0,05M + CaCl₂ 0,001M por, aproximadamente, quatro horas em temperatura ambiente.

Posteriormente, esses fragmentos foram lavados em tampão cacodilato

0,05M (três vezes por 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M, por 4 horas. Em seguida, iniciou-se a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%, por 10 minutos e 3 vezes, por 10 minutos, em 100%). Logo depois, o material foi incluído em gradiente crescente de acetona e resina Spurr 30%, por 8 horas, a 70%, por 12 horas e 2 vezes a 100%, em intervalos de 24 horas, sendo os tecidos emblocados em resina pura e colocados em estufa, a 70°C, por 48 horas, para a polimerização. Os blocos obtidos foram desbastados com lâminas de aço, para a retirada da resina excedente.

Foram realizados os cortes em seções semifinas (>100nm) e ultrafinas (<100nm), em ultramicrotomo Reichert-Jung, utilizando navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados com anel de ouro, colocados em lâminas de vidro, coloridos com azul de toluidina (1g azul de toluidina, 1g borato de sódio e 100mL de água purificados por meio de filtro Millipore 0,2µm) e montados permanentemente em meio Permount. Essas lâminas foram analisadas em microscópio com sistema de captura de imagem no Laboratório de Citogenética da UFLA e as medições foram realizadas por meio do softwer Sigma Scan Pro 5 em 10 células da primeira camada do parênquima paliçádico e lacunoso. Foram avaliados área (comprimento x largura) e comprimento das células do parênquima paliçádico e lacunoso, área e comprimento das células das epidermes adaxial e abaxial, espessura do limbo e o número de cloroplastídeos.

Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro (*golden slot grids*) e secos em raques de alumínio cobertos com formvar (Rowley & Moran, 1975). As seções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 minutos cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 102 a 80Kv.

As características observadas para as análises ultra-estruturais dos cloroplastídeos foram realizadas em 10 células da primeira camada do

parênquima paliçádico e lacunoso, em todos os tratamentos estudados.

Os ensaios foram conduzidos seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Os tratamentos foram representados por 3 cultivares: Lidi, 6 plantas (1 diplóide, 2 mixoplóides e 3 tetraplóides); Thong Dok Mak, 5 plantas (1 diplóide, 3 mixoplóides e 1 tetraplóide) e Ouro, 2 plantas (1 diplóide e 1 mixoplóide).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico Sisvar 4.3. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças significativas, a 5% de probabilidade, entre a maioria dos tratamentos, tanto para as características anatômicas como para as ultra-estruturais estudadas. Observou-se que diferentes características anatômicas da epiderme foliar, assim como do mesofilo e da ultra-estrutura dos cloroplastídeos, sofreram variações em função dos diferentes níveis de ploidia, tanto no parênquima paliçádico quanto no lacunoso.

Para a cultivar Lidi, houve diferenças significativas nas variáveis área das células do parênquima paliçádico, epiderme adaxial, espessura do limbo e comprimento de células dos parênquimas e das epidermes (Tabela 1). Foi observado que a planta diplóide apresentou menor área de células e menor espessura do limbo e menor comprimento de células do parênquima lacunoso, paliçádico e das epidermes em relação às poliplóides.

TABELA 1. Área e comprimento de células dos parênquimas paliçádico e lacunoso, epidermes abaxial e adaxial e espessura do limbo foliar de plantas de bananeira, cultivar Lidi com diferentes níveis de ploidia.

Ploidia	Células do parênquima paliçádico		Células do parênquima lacunoso		Células da epiderme abaxial		Células da epiderme adaxial		Espessura do limbo (μm)
	área (μm^2)	comp. (μm)	área (μm^2)	comp. (μm)	área (μm^2)	comp. (μm^2)	área (μm^2)	comp. (μm)	
2n	228,9 a	19,2 a	171,7 a	10,7 a	123,9 a	10,5 a	69,5 a	11,6 a	162,4 a
Mixopl	272,9 a	32,5 b	182,1 a	16,5 b	162,4 a	17,1 c	117,7 b	18,1 c	188,2 b
Mixopl	322,9 a	30,1 b	221,0 a	17,3 b	131,0 a	14,4 b	121,5 b	17,4 c	170,3 a
4n	359,1 b	36,1 c	294,7 a	19,8 b	123,0 a	14,8 b	107,3 b	15,6 b	169,4 a
4n	414,1 b	35,2 c	201,7 a	17,2 b	100,1 a	19,8 c	101,1 b	15,2 b	194,9 b
4n	305,8 a	29,1 b	247,1 a	17,7 b	118,9 a	18,2 c	103,7 b	17,5 c	257 c

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para a cultivar Thong Dok Mak, todas as variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas entre as plantas estudadas. Nas variáveis área das células do parênquima paliçádico e espessura de limbo, foi possível separar as plantas diplóides, que apresentaram menor tamanho de células e de espessura de limbo e menor número de cloroplastídeos. As plantas mixoplóides apresentaram valores intermediários para essas características e a tetraplóide apresentou valores mais elevados. O comprimento das células das plantas diplóides foi menor em todos os tratamentos (Tabela 2) e, para as variáveis comprimento de células do parênquima paliçádico e epiderme adaxial, também foi possível separar as mixoplóides da tetraplóide.

TABELA 2. Área e comprimento de células dos parênquimas paliçádico e lacunoso, epidermes abaxial e adaxial e espessura do limbo foliar de plantas de bananeira, cultivar Thong Dok Mak com diferentes níveis de ploidia.

Ploidia	Células do parênquima paliçádico		Células do parênquima lacunoso		Células da epiderme abaxial		Células da epiderme adaxial		Espessura do limbo (μm)
	área (μm^2)	comp. (μm)	área (μm^2)	comp. (μm)	área (μm^2)	comp. (μm^2)	área (μm^2)	comp. (μm)	
2n	148,8 a	23,8 a	98,7 a	12,9 a	75,7 a	11,6 a	77,4 a	9,4 a	119,0 a
Mixopl.	259,4 b	28,7 b	115,2 a	15,9 b	99,7 a	14,2 b	60,5 a	13,8 b	155,8 b
Mixopl.	245,4 b	33,5 b	199,5 b	16,0 b	97,8 a	20,3 c	129,9 b	15,6 b	162,4 c
Mixopl.	238,9 b	32,6 b	212,1 b	18,2 b	141,5 b	16,8 c	87,5 a	15,9 b	176,3 d
4n	347,3 c	35,2 c	324,4 c	16,8 b	143,5 b	17,3 c	135,8 b	20,7 c	190,8 c

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para a cultivar Ouro, as variáveis área de células do parênquima paliçádico e epiderme abaxial, e espessura do limbo apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, tendo o material diplóide apresentado valores inferiores para essas características. Também foi possível separar comprimento de células do parênquima paliçádico e epiderme abaxial, em que as plantas diplóides também apresentaram valores inferiores (Tabela 3).

TABELA 3. Área e comprimento de células dos parênquimas paliçádico e lacunoso, epidermes abaxial e adaxial e espessura do limbo foliar de plantas de bananeira, cultivar Ouro, com diferentes níveis de ploidia.

Ploidia	Células do parênquima paliçádico		Células do parênquima lacunoso		Células da epiderme abaxial		Células da epiderme adaxial		Espessura do limbo (μm)
	área (μm^2)	comp. (μm)	área (μm^2)	comp. (μm)	área (μm^2)	comp. (μm^2)	área (μm^2)	comp. (μm)	
2n	158,2 a	24,1 a	138,2 a	14,6 a	104,5 a	14,8 a	67,1 a	15,1 a	128,6 a
Mixopl.	206,8 b	29,3 b	162,7 a	14,6 a	131,7 a	16,6 b	115,3 b	15,0 a	146,6 b

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Por meio da análise de área e de comprimento de células de folha e espessura do limbo em plantas com diferentes níveis de ploidias, foi possível separar diplóides de poliplóides e, para a cultivar TDM, também foi possível separar as mixoplóides da tetraplóide, em relação ao tamanho das células dos parênquimas.

Nas análises ultra-estruturais dos cloroplastídeos, para a cultivar Lidi, houve diferença significativa para diâmetro vertical e área dos cloroplastídeos em células do parênquima paliçádico e diâmetro horizontal e vertical de cloroplastídeos de células do parênquima lacunoso. Os cloroplastídeos de células do parênquima paliçádico das plantas diplóides apresentaram menor tamanho em relação às demais, porém, o número de cloroplastídeos no parênquima lacunoso não apresentou diferenças significativas (Tabela 4).

TABELA 4 Características dos cloroplastídeos de células dos parênquimas paliçádico e lacunoso de folhas de plantas de bananeira, cultivar Lidi, com diferentes níveis de ploidia.

Ploidia	Parênquima paliçádico				Parênquima lacunoso			
	Ø horizontal (µm)	Ø vertical (µm)	Área (µm ²)	Nº clorop./ célula	Ø horizontal (µm)	Ø vertical (µm)	Área (µm ²)	Nº cloropl /célula
2n	6,4 a	1,9 a	9,9 a	4,9 a	5,5 a	2,6 a	13,5 a	3,4 a
Mixopl.	5,4 a	3,3 c	15,9 b	8,4 c	6,9 b	3,3 a	16,7 a	4,0 a
Mixopl.	7,5 a	2,8 b	16,4 b	6,9 b	5,9 a	3,2 a	14,7 a	5,0 a
4n	6,8 a	2,5 b	14,7 b	6,2 b	5,5 a	2,5 b	11,1 a	3,7 a
4n	6,6 a	2,9 b	14,3 b	9,0 c	6,1 b	2,9 a	12,5 a	4,4 a
4n	7,6 a	2,7 b	13,8 b	5,5 a	6,6 b	3,5 a	15,8 a	4,4 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para a cultivar Thong Dok Mak, houve diferença significativa entre os tratamentos em todas as variáveis analisadas. As células dos parênquimas paliçádico e lacunoso apresentaram cloroplastídeos menores em relação às demais. O número de cloroplastídeos foi menor na planta diplóide, maior na

tetraplóide e apresentou valores intermediários nas mixoplóides, nos dois parênquimas, sendo possível separar diplóides, tetraplóides e mixoplóides por essa característica (Tabela 5).

TABELA 5 Características dos cloroplastídeos de células dos parênquimas paliçádico e lacunoso de folhas de plantas de bananeira, cultivar Thong Dok Mak, com diferentes níveis de ploidia.

Ploidia	Parênquima paliçádico				Parênquima lacunoso			
	Ø horizontal (µm)	Ø vertical (µm)	Área (µm ²)	Nº cloropl/ célula	Ø horizontal (µm)	Ø vertical (µm)	Área (µm ²)	Nº cloropl/ célula
2n	4,7 a	1,7 a	5,2 a	5,2 a	3,3 a	1,8 a	7,4 a	2,4 a
Mixopl.	6,8 b	1,9 a	9,8 b	6,1 b	5,5 b	3,2 b	7,7 a	3,4 b
Mixopl.	7,0 b	2,5 b	12,3 b	6,6 b	6,1 c	4,9 c	12,6 b	4,5 b
Mixopl.	7,8 b	3,3 c	19,6 c	7,5 b	5,5 b	3,6 b	13,7 b	3,8 b
4n	7,8 b	2,6 b	16,04 c	8,5 c	5,0 b	3,2 b	12,5 b	6,9 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para a cultivar Ouro, apenas o diâmetro horizontal e a área dos cloroplastídeos do parênquima paliçádico e o diâmetro horizontal de cloroplastídeos do parênquima lacunoso apresentaram diferenças significativas. Para essas variáveis, a planta diplóide também apresentou cloroplastídeos menores em relação à mixoplóide. O número de cloroplastídeos foi menor na planta diplóide no parênquima paliçádico (Tabela 6).

TABELA 6. Características dos cloroplastídeos de células dos parênquimas paliçádico e lacunoso de folhas de plantas de bananeira, cultivar Ouro, com diferentes níveis de ploidia.

Ploidia	Parênquima paliçádico				Parênquima lacunoso			
	Ø horizontal (µm)	Ø vertical (µm)	Área (µm ²)	Nº cloropl/ célula	Ø horizontal (µm)	Ø vertical (µm)	Área (µm ²)	Nº cloropl /célula
2n	4,4 a	2,6 a	8,7 a	3,0 a	4,9 a	2,6 a	10,1 a	2,1 a
Mixopl.	6,2 b	3,0 a	16,0 b	4,4 b	7,1 b	2,7 a	15,1 a	3,0 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em todas as cultivares, o tamanho dos cloroplastídeos sofreu variações em função dos diferentes níveis de ploidia, tanto no parênquima paliádico quanto no lacunoso. Plantas tetraplóides e mixoplóides apresentaram cloroplastídeos maiores em relação às diplóides.

Segundo Pagliarini (2001), um dos principais aspectos somáticos que distinguem os autotetraplóides é a mudança do tamanho celular e nuclear, resultando, primariamente, em características “gigas”. Esse efeito morfofisiológico se deve, provavelmente, à dosagem gênica dobrada das células.

Devido ao efeito gigas, pode haver também aumento do tamanho de organelas celulares, como os cloroplastídeos, podendo provocar também outras mudanças na morfologia da planta. A morfologia dos cloroplastídeos também sofreu variações em relação aos diferentes níveis de ploidia. As plantas tetraplóides e mixoplóides apresentaram mudanças no tamanho e na estrutura dos cloroplastídeos, como pode ser observado na Figura 1. Na Figura 1C estão representados cloroplastídeos de uma planta diplóide, com tamanho e formato normais, enquanto que as Figuras 1A e B representam cloroplastídeos de plantas mixoplóides e 1D tetraplóide, com maior tamanho e morfologia diferenciada.

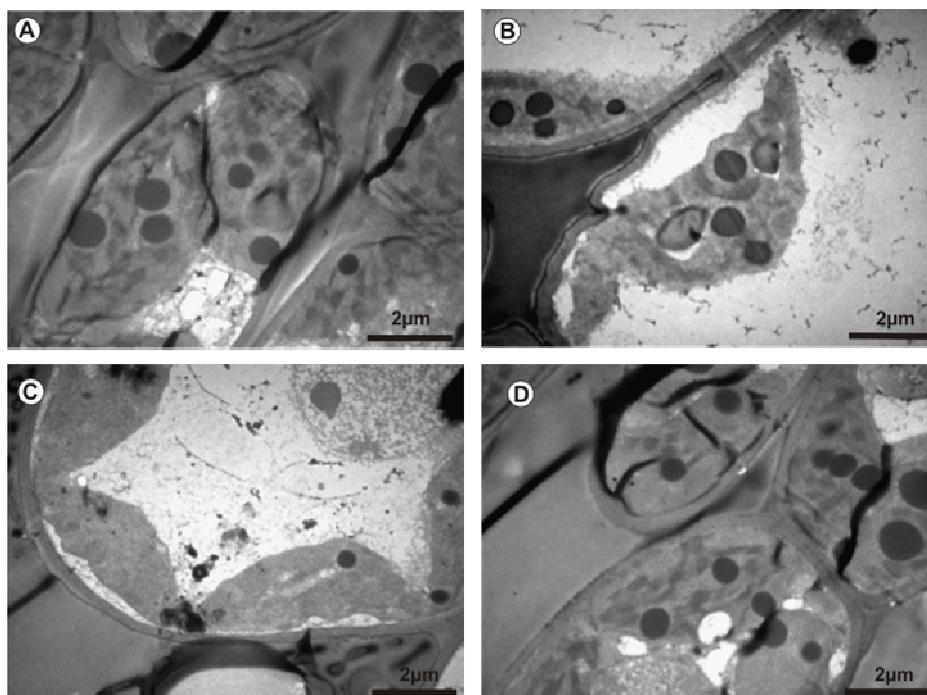


FIGURA 1. Eletromicrografia de transmissão de cloroplastídeos presentes em células do parênquima paliçádico mostrando diferentes tamanhos em folhas de bananeira, cultivar TDM A e B - mixoplóide, C - diplóide e D- tetraplóide.

Pela Figura 2 é possível observar as diferentes formas dos cloroplastídeos em plantas mixoplóides das três cultivares estudadas.

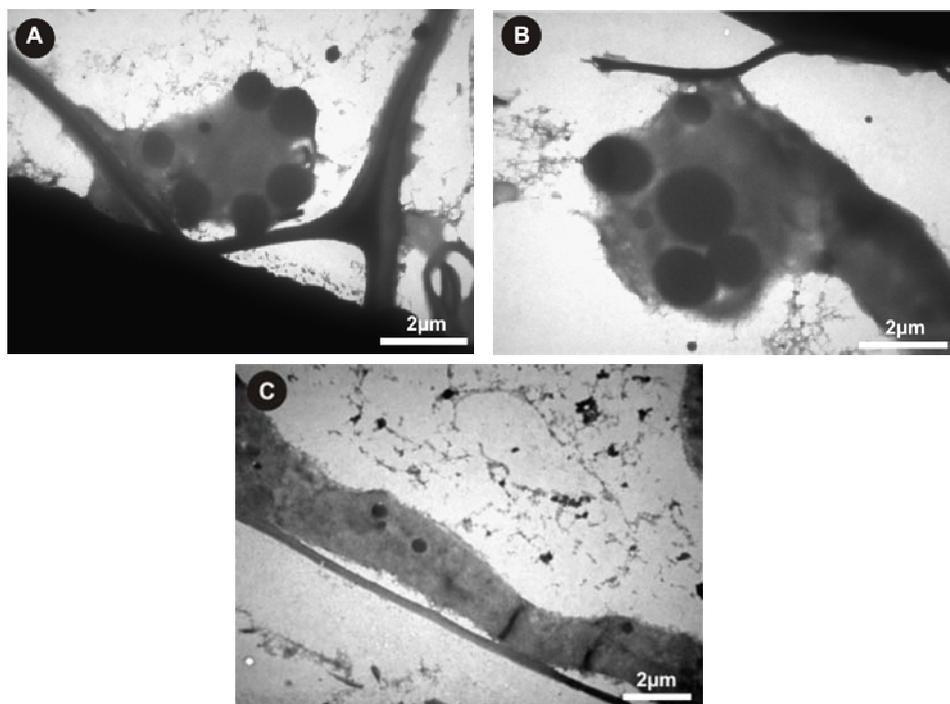


FIGURA 2. Eletromicrografia de transmissão mostrando diferentes formas dos cloroplastídeos nas células do parênquima paliçádico de lâminas foliares de bananeira, cultivares Lidi (A), Ouro (B) e TDM (C) mixoplóides.

Foi verificado também que as mudanças que ocorreram no número de cromossomos proporcionam alterações não só no tamanho e na morfologia dos cloroplastídeos, mas também no arranjo dos mesmos nas células. Em plantas normais, no parênquima paliçádico, os cloroplastídeos podem estar aglomerados, formando uma haste próxima às paredes periclinais ou podem estar aderidos longitudinalmente às paredes anticlinais, funcionando como um tubo para passagem da luz para o parênquima lacunoso situado logo abaixo do parênquima paliçádico, isso em uma folha dorsiventral. Os cloroplastídeos no parênquima lacunoso podem, também, se orientar de acordo com a quantidade e a qualidade de luz penetrada. Em todos os tratamentos, os cloroplastídeos foram

observados próximos à parede celular (Figura 3B). Somente em algumas plantas mixoplóides observaram-se alguns cloroplastídeos dispersos no meio intracelular (Figura 3A).

Nas Figuras 3C e 3D, foi possível observar que ocorreu também um aumento na espessura da parede celular de uma planta tetraplóide (C) em relação à diplóide (D).

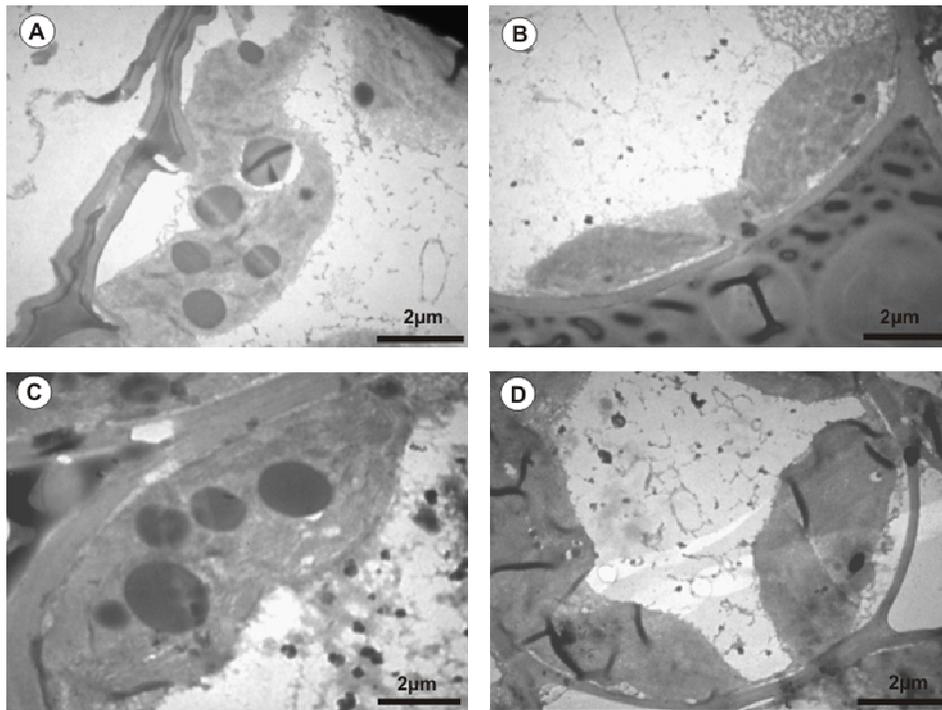


FIGURA 3. Eletromicrografia de transmissão mostrando cloroplastídeos no meio intracelular, de uma planta mixoplóide (A) e junto à parede celular, planta diplóide (B) e espessura da parede em célula tetraplóide (C) e diplóide (D) do parênquima paliçádico de lâminas foliares de bananeira, cultivar Lidi.

Foram observadas vesículas de lipídeos, caracterizadas por círculos escuros nos cloroplastídeos de plantas em todos os níveis de ploidia, porém, eles são maiores e em maior número em poliplóides, como pode ser observado nas Figuras 1, 2 e 3.

A morfologia e o tamanho e o número dos cloroplastídeos, bem como a espessura e da parede celular, variaram em função dos diferentes níveis de ploidia, em todas as cultivares estudadas, podendo, então, separar diplóides de poliplóides pelas características analisadas e, em algumas delas, também é possível separar mixoplóides de tetraplóides.

6 CONCLUSÕES

As plantas mixoplóides e tetraplóides de *Musa* spp possuem maior espessura do limbo foliar, maior área e comprimento de células do parênquima paliçádico e lacunoso em relação às diplóides.

Os cloroplastídeos das células do parênquima paliçádico e lacunoso variam quanto à morfologia, ao número e ao tamanho, em função dos diferentes níveis de ploidia. Plantas tetraplóides apresentam maior tamanho de cloroplastídeos.

A parede celular de plantas tetraplóides e mixoplóides é mais espessa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 142p.

LLERAS, E.; MEDRI, M. E. Comparação anatômica entre folhas diplóides e poliplóides do híbrido *Hevea brasiliensis* X *benthamiana*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 8, n. 4, p. 565-575, dez. 1978.

MAGALLANES, M. G. R.; PINTO, C. A. B. P.; DAVIDE, L. C. Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.)

obtidos por cruzamentos interespecíficos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 4, p. 480-484, out./dez. 1996.

PAGLIARINI, S. M. **Citogenética Aplicada ao Melhoramento**. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; INGLIS, M. C. V. (Eds.) **Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas**. [S.l.:s.n.], 2001. p. 971-910.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wring wrinkle – free sections on formvar – coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amssterdam, v. 1, n. 1, p. 151-155, 1975.

SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, n. 3-4, p. 265-277, Dec. 1999.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 516-520, 2004.

VILLA, V. B. **Análise citomorfoanatômica e eletroférica de híbridos de *Solanum tuberosum* L. X. (*Solanum Tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt)**. 1995. 76 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.