

**ANTIMITÓTICOS NA INDUÇÃO DE
TETRAPLÓIDES EM BANANEIRA**

FILIFE ALMENDAGNA RODRIGUES

2010

FILIFE ALMENDAGNA RODRIGUES

**ANTIMITÓTICOS NA INDUÇÃO DE TETRAPLÓIDES EM
BANANEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

Rodrigues, Filipe Almendagna.

Antimitóticos na indução de tetraplóides em bananeira / Filipe
Almendagna Rodrigues. – Lavras : UFLA, 2010.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. *Musaceae*. 2. *Musa acuminata*. 3. Cultura de tecidos vegetais.
4. Duplicação de cromossomos. 5. Citometria de fluxo. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.7723

FILIFE ALMENDAGNA RODRIGUES

**ANTIMITÓTICOS NA INDUÇÃO DE TETRAPLÓIDES EM
BANANEIRA**

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

APROVADA em 23 de Fevereiro de 2010.

Pesq. Dra. Aparecida Gomes de Araujo UFLA

Pesq. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva Embrapa/CNPMPF

Prof. Dr. Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, pois sem “Ele” seria praticamente impossível continuar minha caminhada. A minha mãe, Sebastiana Maria Aparecida Almendagna Rodrigues (Cidinha), que, onde quer que esteja, está olhando por mim, e sem ela hoje eu não estaria aqui. Aos meus parentes, em especial aos meus padrinhos Nair e Abnel, que me acolheram no momento que mais precisei, e que sempre confiaram em mim. Aos meus irmãos, Fábio e Fabrício, que sempre lutaram por um futuro melhor.

OFEREÇO E DEDICO

“Eu não conheço a chave para o sucesso, mas a chave do fracasso é tentar agradar a todos”.

(Bill Cosby)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, instituição na qual me graduei em Agronomia, que me proporcionou conhecimentos fundamentais para a realização de meus trabalhos acadêmicos e também extremamente importantes em trabalhos futuros.

Ao professor Moacir Pasqual, além de orientador, foi a pessoa que me deu a oportunidade de trabalhar no laboratório, e por ter confiado em mim durante todos esses anos.

À EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical pela parceria realizada junto à Universidade Federal de Lavras.

Ao pesquisador Sebastião de Oliveira e Silva pela co-orientação e apoio durante a realização deste trabalho, além da amizade e confiança.

À Pesquisadora Aparecida Gomes de Araujo pela amizade e contribuição dada na realização da dissertação.

À professora Lisete Chamma Davide pela co-orientação.

Ao CNPq pela concessão de bolsas de estudos para o Mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Doutorandos, Mestrandos e alunos de Iniciação Científica.

À Marli, secretária de Pós-graduação/Fitotecnia-UFLA.

Aos amigos de Alojamento da UFLA (Brejão), local onde passei toda minha graduação e aprendi a conviver com outras pessoas, em especial a Felipe, Fred, Helton e Gustavo, grandes amigos que fiz.

Aos amigos e companheiros da República Tokaia, Roguinho, Renan e Giuliano, que me acolheram durante todo meu Mestrado.

Às meninas da República Boazona, Adriana, Talita, Camila, Tamires e Letícia.

Aos amigos e laboratoristas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFLA, Vantuil, Claret, Antônio Carlos, Evaldo e Luiz, profissionais extremamente capazes, dedicados e prestativos.

Muito obrigado meus amigos, pelos momentos que foram essenciais para o meu crescimento profissional.

BIOGRAFIA

FILIPPE ALMENDAGNA RODRIGUES, filho de Azarias Silva Rodrigues e Sebastiana Maria Aparecida Almendagna Rodrigues (falecida), nasceu em 30 de setembro de 1982, no município de São Lourenço-MG.

Em Lavras-MG, no ano de 2004, iniciou suas atividades no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e, em 2005, a Iniciação Científica, sendo bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante 30 meses, realizando sua monografia de conclusão de curso com a cultura de bananeira. Obteve o título de Engenheiro Agrônomo, pela Universidade Federal de Lavras, em dezembro de 2007.

Em março de 2008, iniciou o Mestrado em Agronomia/Fitotecnia na Universidade Federal de Lavras, sendo aprovado no Doutorado na mesma Instituição em dezembro de 2009 e tendo defendido a dissertação em fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Referencial teórico.....	1
1.1 Importância da bananicultura.....	1
1.2 Aspectos gerais do gênero <i>Musa</i>	1
1.3 Micropropagação da bananeira.....	2
1.4 Melhoramento genético da bananeira.....	4
1.5 Citogenética do gênero <i>Musa</i>	6
1.6 Antimitóticos.....	7
1.7 Colchicina.....	8
1.8 Amiprofós-metil.....	10
1.9 Citometria de fluxo.....	10
2 Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO 2: Ação da colchicina em ápices caulinares de bananeira.....	21
1 Resumo.....	22
2 Abstract.....	23
3 Introdução.....	24
4 Material e Métodos.....	25
5 Resultados e Discussão.....	26
6 Conclusão.....	31
7 Considerações Finais.....	31
8 Referências Bibliográficas.....	31
CAPÍTULO 3: Obtenção de metáfases mitóticas em bananeira por meio do amiprofós-metil (APM).....	35

1	Resumo.....	36
2	Abstract.....	37
3	Introdução.....	38
4	Material e Métodos.....	40
5	Resultados e discussão.....	41
6	Conclusão.....	45
7	Referências bibliográficas.....	46
CAPÍTULO 4: Colchicina e amiprofós-metil (APM) na duplicação cromossômica de diplóides de bananeira (<i>Musa</i> sp.).....		
1	Resumo.....	51
2	Abstract.....	52
3	Introdução.....	53
4	Material e Métodos.....	55
4.1	Citometria de fluxo.....	56
5	Resultados e Discussão.....	57
6	Conclusão.....	67
7	Referências Bibliográficas.....	67

RESUMO

RODRIGUES, Filipe Almendagna. **Antimitóticos na indução de tetraplóides em bananeira**. 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Objetivou-se, com o presente trabalho 1) verificar a ação da colchicina em ápices caulinares de diplóide de bananeira utilizando diferentes concentrações e tempos de exposição ao antimitótico; 2) avaliar a melhor dose e tempo de exposição ao antimitótico amiprofós-metil (APM) para obtenção de metáfases mitóticas e 3) verificar a concentração e o tempo de exposição à colchicina e ao amiprofós-metil na duplicação cromossômica de bananeira diplóide (1304-04 e 8694-15). Foram utilizados ápices caulinares de bananeira diplóide (1318-01, 1304-04 e 8694-15) e pontas de raízes de bananeira diplóide (1304-04) pré-estabelecidas *in vitro*. Verificaram-se maior sobrevivência dos explantes (91,7%) em 2,5 mM de colchicina por 24 horas de exposição e 50% na concentração de 7,5 mM de colchicina por 48 horas de exposição ao antimitótico no diplóide 1318-01. Foi também observada, no diplóide 1304-04, a metáfase mitótica com 20 μ M de APM por 2 horas, mas com alguns cromossomos ainda sobrepostos. No pré-tratamento em solução de 60 μ M de APM por 4 horas apresentou menor sobreposição de cromossomos. Com o uso de APM obteve-se 66,67% de plantas tetraplóides no diplóide 1304-04, através de 40 μ M por 24 horas e no diplóide 8694-15, em 40 e 80 μ M por 48 horas respectivamente, 25 e 20% de plantas tetraplóides. No diplóide 1304-04, o tratamento 1,25 mM por 48h em colchicina apresentou 25% de plantas tetraplóides e, no diplóide 8694-15, 1,25 mM por 24h apresentou 6,25% de plantas tetraplóides, 1,25 mM por 48 horas com 18,19%, 2,5 mM por 48 horas com 50%, e na concentração de 5,0 mM por 48 horas observou-se 33% tetraplóides. Conclui-se que a exposição do diplóide 1318-01 à colchicina por um período de 24 horas possibilita maior taxa de sobrevivência dos explantes. 20 a 60 μ M APM por 2 a 4 horas provocam a despolimerização do fuso mitótico, possibilitando a visualização dos cromossomos e obtenção de boas metáfases. 40 μ M de APM por 24h possibilita a obtenção de plantas tetraplóides no diplóide 1304-04 e 2,5 mM de colchicina por 48 horas resulta em plantas tetraplóides no diplóide 8694-15.

Palavras-chave: Duplicação de cromossomos; citometria de fluxo; cultura de tecidos.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual (Orientador) - UFLA, Dr. Sebastião de Oliveira e Silva - EMBRAPA /CNPMPF, Dr^a. Lisete Chamma Davide - UFLA.

ABSTRACT

RODRIGUES, Filipe Almendagna. **Antimitotic in the induction of tetraploids in banana tree.** 2010. 71 p. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The objective of this work 1) to verify the action of colchicine in apices of diploid banana using different concentrations and exposure times to antimitotic, 2) evaluate the best dose and duration of exposure to antimitotic Amiprophos-methyl (APM) for obtaining metaphase cells and 3) to measure the concentration and time of exposure to colchicine and Amiprophos-methyl in chromosome doubling of diploid bananas (1304-04 and 8694-15). Were used apices of diploid banana (1318-01, 1304-04 and 8694-15) and tips of the roots of diploid banana (1304-04) pre-established in vitro. There has been increased survival of the explants (91.7%) in 2.5 mM colchicine for 24 hours exposure and 50% at a concentration of 7.5 mM colchicine for 48 hours of exposure to the antimitotic diploid 1318-01. It was also observed in diploid 1304-04 mitotic metaphase with 20 μ M APM for 2 hours, but with some chromosomes still overlapped. The pretreatment solution of 60 μ M APM for 4 hours was less overlap of chromosomes. With the use of APM was obtained 66.67% of diploid plants in tetraploid 1304-04 through 40 μ M for 24 hours and diploid 8694-15, 40 and 80 mM for 48 hours, respectively, 25 and 20% tetraploid plants. In diploid 1304-04, treatment 1.25 mM for 48 hours in colchicine had 25% of tetraploid plants and the diploid 8694-15, 1.25 mM for 24 hours showed 6.25% of tetraploid plants, 1.25 mM for 48 hours with 18.19%, 2.5 mM for 48 hours with 50%, and the concentration of 5.0 mM for 48 hours showed 33% tetraploid. Concluded that exposure of diploid 1318-01 to colchicine for a period of 24 hours allows for higher survival rate of explants. 20 to 60 μ M of APM for 2 to 4 hours cause the depolymerization of the spindle, allowing the visualization of chromosomes and obtaining good metaphases. 40 μ M APM for 24 permits to obtain tetraploid plants in diploid 1304-04 and 2.5 mM colchicine for 48 hours results in diploid plants in tetraploid 8694-15.

Key words: Duplication of chromosome; flow cytometry; tissue culture.

*Guidance Committee: Dr. Moacir Pasqual (Adviser) - DAG/UFLA, Dr. Sebastião de Oliveira e Silva - EMBRAPA/CNPMPF, Dr^a. Lisete Chamma Davide - DBI/UFLA.

CAPÍTULO 1

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Importância da bananicultura

A bananicultura assume importância social e econômica em mais de 80 países, principalmente em pequenas propriedades (Silva et al., 2002), destacando-se como uma das culturas de maior produção entre as frutíferas tropicais (Donato et al., 2006).

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana, com produção de 7 milhões de toneladas em 2007 e área cultivada de 513 mil hectares (AGRIANUAL, 2009). No Brasil, seu cultivo estende-se da região Norte ao Sul do País, e seu fruto representa uma fonte contínua de alimento e de renda aos produtores (Silva et al., 2003).

Entretanto, como em qualquer cultura praticada em áreas extensas, a bananeira também é afetada por problemas fitossanitários, além disso, não existem variedades comerciais que sejam produtivas, resistentes a doenças e pragas, e que apresente alto teor de carotenóides. Assim, uma das estratégias para solucionar estes problemas é a seleção de novos genótipos, resistentes às doenças, e que apresentem boas características agronômicas, o que tem sido alcançado em programas de melhoramento da bananeira (Silva et al., 1998, 2000), utilizando-se da técnica de duplicação cromossômica, induzida por agentes antimutagênicos (Roth, 1984) com o uso de colchicina e amipropil-metil.

1.2 Aspectos gerais do gênero *Musa*

De acordo com a classificação botânica, as bananeiras produtoras de frutos comestíveis são plantas da classe das *Monocotyledoneae*, ordem *Scitaminales*, família *Musaceae*, da qual fazem parte as subfamílias

Heliconioideae, *Strelitzioideae* e *Musoideae*. Esta última inclui, além do gênero *Ensete*, o gênero *Musa*, constituído por quatro séries ou seções: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* e (Eu-)*Musa* (Simmonds, 1973). Dentro do gênero *Musa* existem no mínimo duas espécies, *Musa ingens* ($2n = 14$) e *Musa becarii* ($2n = 18$), que não são classificáveis nas seções citadas. A discriminação entre (Eu-)*Musa* e *Rhodochlamys* é artificial e não reflete bem os graus de isolamento reprodutivo (Shepherd, 1990). A seção (Eu-)*Musa* é a mais importante, uma vez que, além de ser formada pelo maior número de espécies desse gênero, apresenta ampla distribuição geográfica e abrange as espécies comestíveis.

A classificação proposta por Cheesman (1948) para o gênero *Musa*, aceita atualmente no mundo inteiro, baseia-se no número básico de cromossomos dividido em dois grupos da seguinte maneira: as espécies com $n = 10$ cromossomos pertencem às seções *Australimusa* e *Callimusa*, enquanto as espécies com $n = 11$ cromossomos integram as seções *Rhodochlamys* e (Eu-)*Musa*. As espécies componentes destas duas últimas seções são as que apresentam potencialidade como germoplasma útil ao melhoramento genético das variedades cultivadas. Segundo Shepherd (1990), tais espécies são: a) *Rhodochlamys*: *Musa laterita* Cheesman, *Musa ornata* Roxburgh, *Musa rubra*, *Musa sanguinea* e *Musa velutina* Wendl e Drude. b) (Eu-)*Musa*: *Musa acuminata* Colla, *Musa balbisiana* Colla, *Musa flaviflora* Simmonds, *Musa halabanensis* Meijer, *Musa ochracea* Shepherd e *Musa schizocarpa* Simmonds.

1.3 Micropropagação da bananeira

A propagação da bananeira ocorre vegetativamente pela emissão de novas brotações, que são utilizadas pelos agricultores para o plantio comercial. Entretanto, a facilidade de disseminação de patógenos, baixa qualidade das mudas, associadas ao elevado custo de implantação e à pequena quantidade de mudas obtidas, levou à busca por novas tecnologias, visando à expansão da

bananicultura (Ruggiero et al., 1994).

A utilização prática da técnica de micropropagação refere-se à produção comercial de plantas, possibilitando sua rápida multiplicação em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, com obtenção de mudas com alta qualidade fitossanitária (Rodrigues, 1996). No entanto, a eficiência na produção de brotos durante a micropropagação da bananeira varia conforme o genótipo utilizado.

A bananeira é uma das primeiras culturas utilizadas na propagação *in vitro* em larga escala no Brasil, abrindo novas perspectivas no cenário nacional da bananicultura. No início da década de 90, biofábricas foram criadas visando a micropropagação de cultivares comerciais de bananeira. A carência de informações e a falta de domínio dessa nova tecnologia e a ausência de legislação para produção de mudas produzidas através da micropropagação foram responsáveis pela colocação no mercado de um produto de qualidade duvidosa, que causou prejuízos aos agricultores, devido à ocorrência de variação somaclonal provenientes do cultivo *in vitro* inadequado (Rodrigues, 1996). Esperava-se uniformidade genética no material micropropagado, já que a técnica de micropropagação envolve basicamente divisões mitóticas. Porém, a variação somaclonal observada em cultura de tecidos é decorrente principalmente do meio de cultivo, do regulador de crescimento, além da suscetibilidade da cultivar utilizada e o número de subcultivo (Skirvin et al., 1994).

Atualmente, tem-se dado preferência às mudas de bananeira provenientes de micropropagação para a utilização no estabelecimento ou substituição de plantações, melhorando a relação custo/benefício para o produtor (Filippi, 2000).

Desta forma, esta técnica é uma importante ferramenta não só na genética e melhoramento de plantas como também pode auxiliar em inúmeras outras áreas da agricultura (Ramalho et al., 1997).

1.4 Melhoramento genético da bananeira

Os maiores programas de melhoramento convencional estão localizados na *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola* (FHIA) em Honduras, no *Centre de Coopération Internationale em Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD-FLHOR) na França e Guadalupe, no *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA) na Nigéria e Uganda, no *Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains* (CARBAP) em Camarões e a *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (EMBRAPA) no Brasil (Jenny et al., 2002).

O melhoramento convencional tem sido dificultado pela ausência de sementes nas cultivares de bananeira, fator este que resulta da inexistência de pólen viável ou de polinizadores naturais eficientes. As cultivares que não produzem sementes quando polinizadas ou aquelas que as produzem em pequena quantidade podem ser tanto diplóides quanto triplóides. A ausência de sementes pode estar relacionada à intensa seleção agrônômica para este fator, devendo ser, portanto, reflexo do processo de domesticação da espécie (Shepherd et al., 1986).

Além disso, em comparação com outras importantes culturas que fazem parte da alimentação básica, ainda falta conhecimento sobre genética e citogenética do gênero *Musa* (Jenny et al., 2002). Apesar disso, importante progresso ocorreu nos últimos anos e novas variedades estão sendo disponibilizadas a partir da criação de programas de melhoramento genético de *Musa* (Jenny et al., 2002).

O melhoramento genético da bananeira conduzido na *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical* objetiva desenvolver variedades de bananeiras resistentes às Sigatokas amarela e negra e ao mal-do-panamá, com porte e ciclo reduzidos e mais produtivas, mediante cruzamentos de diplóides (AA) melhorados com triplóides comerciais, avaliando e selecionando estas novas

variedades tetraplóides em diferentes regiões produtoras de banana do País. Avaliações para resistência a nematóides e broca do rizoma estão também sendo efetuadas nos novos híbridos produzidos (Silva et al., 1998).

A falta de germoplasma adequado, ou seja, cultivares que não produzem sementes ou outros problemas levaram ao uso de métodos não convencionais de melhoramento. No gênero *Musa*, os híbridos tetraplóides são mais vigorosos e esta característica lhes confere maior resistência às enfermidades. Existe uma estratégia baseada no melhoramento dos tetraplóides utilizando as propriedades antimitóticas da colchicina para gerar tetraploidia (Hamill et al., 1992). Os tetraplóides seminíferos obtidos por tratamento de plântulas com colchicina têm demonstrado que o crescimento, o número de flores femininas e a fertilidade feminina diminuem (Desauw, 1998).

O germoplasma constitui o elemento dos recursos genéticos, que incluem a variabilidade genética intra e interespecífica, para a utilização na investigação em geral e, especificamente, no melhoramento genético (Goldert, 1996).

O banco de germoplasma é a base fundamental para um programa de melhoramento genético. Deve apresentar uma ampla variabilidade suficiente para permitir um avanço consistente em todas as linhas de melhoramento a ser alcançado (Castillo, 1991).

O germoplasma pode ser conservado em campo ou *in vitro*. A conservação de germoplasma de bananeira *in vitro* se efetua na forma de meristemas proliferantes em condições de crescimento lento (De Smet & Houwe, 1991). Adicionalmente, a manutenção de uma coleção *in vitro* requer um intensivo trabalho e está sujeito a riscos de contaminação e erro humano durante os subcultivos. E é por isso que a crioconservação, ou seja, o armazenamento de células ou tecidos a temperaturas ultra baixas (-196°C) é apresentado como uma opção de interesse para o armazenamento a longo prazo.

Com isso, o crescimento cessa completamente devido à falta de água e à inibição de todas as reações químicas. Portanto, na teoria, o tecido em condições de crioconservação não está sujeito a variação somaclonal (Panis, 1995).

1.5 Citogenética do gênero *Musa*

A maioria das cultivares de bananeira originou-se no continente asiático, tendo evoluído a partir das espécies diplóides selvagens *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, de modo que cada cultivar deve conter combinações variadas de genomas completos das espécies parentais.

Esses genomas são denominados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), de cujas combinações resultam os grupos AA, AAA, AAAA, AB, AAB, AAAB, AABB, ABB, ABBB, BB e BBB (Soto Ballester, 1992). Além disso, Hutchison (1966) e Shepherd & Ferreira (1982) relataram que *Musa schizocarpa* também contribuiu para a formação de algumas cultivares híbridas na Nova Guiné.

A bananeira apresenta três níveis cromossômicos distintos: diplóide, triplóide e tetraplóide, os quais correspondem, respectivamente, a dois, três e quatro múltiplos do número básico ou genoma de 11 cromossomos ($x = 11$). A origem de bananeiras triploides, a partir de diplóides, e de tetraploides, a partir de triploides, é constatada por meio de cruzamentos experimentais.

A evolução dessas espécies de bananeira processou-se em quatro etapas, repetidas em várias épocas (Simmonds & Shepherd, 1955). A primeira etapa constou da ocorrência de partenocarpia por mutação em *Musa acuminata* (AA), ou seja, a capacidade de gerar polpa sem a produção de sementes. Em sua forma original, os frutos de bananeiras possuem grande número de sementes duras, que dificultam o seu consumo. Com base nos conhecimentos atualmente disponíveis, supõe-se que a partenocarpia ocorreu apenas em *Musa acuminata*; por conseguinte, as cultivares mais antigas eram diplóides do grupo AA. O número

dessas cultivares pode ser ampliado por meio de cruzamentos espontâneos entre si ou com outras formas selvagens da mesma espécie.

A segunda etapa caracterizou-se pela hibridação entre cultivares do grupo AA e plantas selvagens de *Musa balbisiana* (BB), produzindo híbridos diplóides do grupo AB, hoje raros e possivelmente limitados na sua origem, a Índia. Vale ressaltar, entretanto, que Shepherd encontrou duas cultivares AB na África Ocidental em 1969. O tipo Ney Poovan foi bastante observado em Uganda, além de se achar presente nas ilhas do Caribe desde o início deste século, sob a denominação de Guindy.

A terceira e quarta etapas da evolução são admitidas com base na capacidade de várias bananeiras e de alguns híbridos de gerar, em baixa frequência, células-ovo viáveis, sem meiose típica, com a mesma constituição cromossômica e genética da planta-mãe, seja esta diplóide ou triplóide. Por meio de cruzamentos espontâneos envolvendo pólen das espécies parentais (*Musa acuminata* e *Musa balbisiana*) ou de cultivares do grupo AA, com genótipos dos grupos AA e AB portadores de sacos embrionários diplóides, foi possível o aparecimento de triplóides dos grupos AAA, AAB e ABB, pela adição do número básico x (A ou B). Da mesma forma, os tetraplóides dos grupos AAAA, AAAB, AABB e ABBB evoluíram a partir dos três grupos triplóides. Vale ressaltar que todos esses grupos foram constatados por avaliação taxonômica das cultivares exploradas em todo o mundo, à exceção do grupo AAAA, que só foi obtido por cruzamentos experimentais (Shepherd, 1984).

1.6 Antimitóticos

A utilização de antimitóticos na agricultura tem sido feita principalmente em programas de melhoramento genético para a geração de plantas poliplóides. Geralmente, a poliploidização é induzida para contornar a esterilidade cromossômica dos híbridos interespecíficos. Entretanto, pode

também ser utilizada para induzir a esterilidade. Nesse caso, são induzidos níveis de poliploidia ímpar, em geral triplóides ou pentaplóides. Indivíduos com poliploidia ímpar são normalmente estéreis (Guerra, 1989).

Essas substâncias antimitóticas ligam-se as proteínas que formam as fibras do fuso acromático, denominados tubulinas, impedindo a sua despolimerização e conseqüentemente suprimindo a formação das fibras, ou ainda inativando os fusos já formados (Guerra, 1989).

O problema da utilização dos agentes antimitóticos resulta do fato de que essas substâncias atuam 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.

A escolha da cultivar a ser utilizada bem como a variação da concentração, tempo de exposição e formas de aplicação desses antimitóticos tornam-se requisitos indispensáveis em programa de melhoramento genético visando à duplicação cromossômica.

1.7 Colchicina

A colchicina é um alcalóide muito tóxico, extraído principalmente de bulbos de plantas da espécie *Colchicum autumnale* L. pertencente à família *Liliaceae*, que passou a ser utilizada na indução de poliploidia em plantas (Havas, 1937). É também a substância mais 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 se liga reversivelmente ao dímero de tubulina, 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).

Infelizmente, a colchicina, por ser muito tóxica, tem o manuseio perigoso, e por isso tem sido responsável por intoxicações acidentais. Desta forma, pessoas ou animais que consomem a planta "Outono croco" (*Colchicum* sp.), rica em colchicina, que são utilizadas em ornamentação de jardins, podem sofrer alterações cromossômicas (International Carnivorous Plant Society - ICPS, 2009), ou mesmo em laboratórios que a utilizam na indução de poliploidia. Desse modo, a colchicina deve ser manipulada com extremo cuidado por profissional treinado.

Em concentrações mais baixas, a colchicina promove a despolimerização do fuso mitótico com ausência de endorredução levando ao acúmulo de cromossomos metafásicos, onde as cromátides estão condensadas com os braços separados em consequência de seu natural movimento de repulsão que não é acompanhado pela divisão do centrômero, técnica essa, entre outras, que pode ser utilizada para a preparação do cariótipo.

A colchicina apresenta limitações de uso, como a possibilidade de provocar aglomerações cromossômicas e divisão da região centromérica, principalmente após longos períodos de tratamento, além de baixa afinidade pela tubulina vegetal (Doležel, 1995).

A duplicação de cromossomos em plantas tem ocorrido por meio da colchicina (Doležel et al., 1994), porém esta substância atua de forma eficiente apenas em células que estão em divisão. Desse modo, a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides (Wan et al., 1989). Em consequência 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 em taxas superiores às células poliplóides.

Devido ao alto custo e à alta toxicidade da colchicina, vários produtos alternativos têm sido testados e propostos para substituir a colchicina, tais como orizalina, amiprofós-metil e outros (Mondin & Docha Neto, 2006).

1.8 Amiprofós-metil

Certos herbicidas são bastante eficazes no bloqueio de células em metáfase, sendo que os mais utilizados são quimicamente classificados em amidos fosfóricos, como amiprofós-metil (Doležel et al., 1994).

O Amiprofós-metil (APM) atua diretamente na dinâmica de polimerização dos microtúbulos, por meio de um mecanismo envolvendo alteração dos níveis intracelulares de cálcio. Desta forma, este herbicida interage com a tubulina de maneira similar à inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina (Morejohn & Fosket, 1984), são utilizados na agricultura em todo o mundo, pois são rapidamente degradados e apresentam pouco resíduo para o meio ambiente (Brahma & Umesh, 1985) e, mesmo em baixas concentrações, impedem a polimerização dos microtúbulos inibindo a formação dos fusos cromáticos e induzindo a separação dos cromossomos metafásicos. Esses ficam dispersos por todo o citoplasma, onde condensam, formando assim os chamados micronúcleos. Vários micronúcleos sub-diplóides, contendo um ou poucos cromossomos, podem ser visualizados nas células após o tratamento com herbicida (Morejohn et al., 1987; Falconer & Seagull, 1987).

1.9 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida, no final da década de 50, para a contagem e análise de células sanguíneas (Côrte-Real et al., 2002).

No entanto, com a natural evolução técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como células vegetais e microbianas (Doležel, 1997).

No domínio das células vegetais, apesar da utilização da citometria de fluxo ter ocorrido apenas no início dos anos 80, o número de aplicações vem aumentando continuamente desde então, sendo, hoje em dia, uma técnica rotineiramente usada em vários laboratórios por todo o mundo (Doležel, 1991). Apesar da citometria de fluxo aplicada ao estudo de células e organelos vegetais apresentar ainda algumas limitações, esta técnica permite análises rápidas (“real time”) do conteúdo de DNA e RNA, contagem de células, entre outras aplicações (Yanpaisan et al., 1999).

Associada com outras técnicas citológicas, a citometria de fluxo é considerada uma ferramenta muito importante para o estudo de citomas vegetais. O conceito de citoma foi originalmente introduzido por Valet (2002), referindo-se a qualquer tipo de partícula biológica (estruturas celulares, órgãos e indivíduos). A citômica é uma análise multimolecular dos citomas, na qual se obtém o máximo de informação referente à expressão global que um aparente fenótipo celular pode fornecer como resultado do seu genótipo e/ou ambiente (Valet, 2002).

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida. Esta particularidade é uma das diferenças existentes entre a citometria de fluxo e outras técnicas de análise quantitativa de núcleos isolados ou cromossomos, que necessitam da fixação das partículas a uma superfície. A medição em fluxo permite análises a alta velocidade e garante que os citomas analisados sejam selecionados aleatoriamente de toda a população, sem qualquer subjetividade associada (Doležel, 1997).

A suspensão líquida, que contém os citomas a analisar, é introduzida no centro da câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente (“sheath fluid”) e que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida. Através de um fenómeno físico designado por focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se, em fluido laminar uma a uma, no centro do fluxo (Doležel, 1997). Estas partículas interceptam um feixe de iluminação bastante intenso, com origem em uma ou mais fontes de iluminação (laser(s) e/ou lâmpada de vapor de mercúrio). Quando as partículas intersectam o feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotônica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade é dependente das características das partículas (Côrte-Real et al., 2002). Os fótons que são dispersos frontalmente vão ser recebidos e analisados por um fotodiodo (detector da dispersão frontal) e os que são dispersos ortogonalmente (90°) são recebidos por uma série de filtros ópticos e analisados em tubos fotomultiplicadores (dispersão lateral e fluorescência) (Côrte-Real et al., 2002). Os diferentes tipos de filtros ópticos (“long-pass”, “short-pass”, passagem de banda e espelhos dicróicos) dividem a emissão fluorescente permitindo a medição simultânea de vários corantes fluorescentes (Doležel, 1991).

A citometria de fluxo é uma técnica rápida e conveniente que permite a determinação exata do conteúdo de DNA nuclear (Fox & Galbraith, 1990; Doležel, 1991). A análise é baseada na utilização de fluorocromos específicos ao DNA e na análise da intensidade de fluorescência relativa emitida por núcleos corados. Para determinar o conteúdo de DNA nuclear em unidades absolutas, a intensidade da fluorescência dos núcleos é comparada com a intensidade da fluorescência de núcleos isolados de uma espécie com o tamanho do genoma nuclear conhecido.

Doležel et al. (1994) determinaram pela primeira vez o tamanho do genoma nuclear em duas espécies cultivadas de *Musa*, e isso pode servir de base

para a aplicação da citometria de fluxo na taxonomia, reprodução e biotecnologia em *Musa*.

A citometria de fluxo pode ser utilizada para a reprodução precisa da estimativa do conteúdo de DNA nuclear em *Musa*, que possui um genoma nuclear pequeno (Doležel et al., 1994, 1997; Lysák et al., 1999).

Como o conteúdo de DNA nuclear das células em G0/1 reflete a ploidia de uma planta, a técnica pode ser utilizada para a rápida estimativa do nível de ploidia (Doležel et al., 1994). Considerando as dificuldades encontradas na aplicação de técnicas citológicas clássicas em *Musa*, citometria de fluxo pode ser uma alternativa poderosa. A validade desta abordagem foi comprovada, por exemplo, por DeLaat et al. (1987) que usaram a citometria de fluxo para a determinação de ploidia e o melhoramento de beterraba.

Além de um sistema eficiente para a indução de poliplóides, a produção em massa de autotetraplóides requer um método eficaz para a triagem de ploidia (Duren et al., 1996). Classicamente isto é feito usando a contagem de cromossomos (Hamill et al., 1992). No entanto, este é um procedimento que não é adequado para a seleção em larga escala. A estimativa da ploidia baseada na análise do número, comprimento e densidade de estômatos (Speckmann et al., 1965; Blanke et al., 1994) é mais fácil, no entanto, o método não é sempre confiável devido aos efeitos ambientais. Desta forma, a citometria de fluxo está sendo cada vez mais utilizada para triagem em larga escala de ploidia (Doležel, 1991; Doležel et al., 1989; DeLaat et al., 1987).

A citometria de fluxo tem uma vantagem sobre a tradicional técnica de contagem de cromossomos, uma vez que pode ser usada para a análise de muitas plantas em pouco tempo e pode ser aplicada a qualquer tecido vegetal (Roux et al., 2003). Segundo Bakry et al. (2007), a contagem de cromossomos pode ser útil para a identificação de plantas poliplóides quando a citometria de fluxo não está disponível.

A citometria de fluxo tem sido utilizada em um grande número de espécies, incluindo cereais e leguminosas de importância econômica, e está se tornando cada vez mais útil para a análise genômica em plantas (Doležel et al., 2004).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: Instituto FNP, 2009. 502 p.

BAKRY, F.; LA REBERDIERE, N. P. de; PICHOT, S.; JENNY, C. Colchicine induces doubled-diploids in diploid banana clones. **Fruits**, Paris, v. 62, n. 1, p. 3-12, Jan./Feb. 2007.

BLANKE, M. M.; HOFER, M.; PRING, R. J. Stomata and structure of tetraploid apple leaves cultured *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v. 73, n. 6, p. 651-654, June 1994.

BRAHMA, B. P.; UMESH, K. S. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide Fensulfothion. **Cytobios**, Cambridge, v. 42, p. 147-215, 1985.

CASTILLO, R. T. Nuevos departamentos de recursos fitogenéticos en Ecuador. **Diversity**, Basel, v. 7, n. 1/2, p. 37-39, 1991.

CHEESMAN, E. E. Classification of the bananas. II: the genus *Musa* L. **Kew Bulletin**, London, n. 2, p. 106-117, 1948.

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

DELAAT, A. M. M.; GOHDE, W.; VOGELZANG, M. J. D. C. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. **Plant Breeding**, Berlin, v. 99, n. 4, p. 303-307, Dec. 1987.

DE SMET, K.; HOUWE, van den I. The banana germplasm collection at the INIBAP transit center. In: INTERNATIONAL NETWORK FOR THE IMPROVEMENT OF BANANA AND PLANTAIN, 1991, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: INIBAP, 1991. p. 35-37.

DESAUW, D. Etude des facteurs de la stérilité du bananier (*Musa* spp.) et des relations cytotaxonomiques entre *M. acuminata* et *M. balbisiana* Colla. **Fruits**, Paris, v. 43, n. 12, p. 615-638, déc. 1998.

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

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 2, n. 4, p. 143-154, Sept. 1991.

DOLEŽEL, J. Flow cytometry: principles and applications in mutation breeding. In: INTERREGIONAL TRAINING COURSE ON ADVANCES IN PLANT MUTATION TECHNIQUES, 14., 1995, Vienna. **Proceedings...** Viena: IAEA/FAO, 1995. p. 1-25.

DOLEŽEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 31, n. 2, p. 113-120, Mar. 1989.

DOLEŽEL, J.; DOLEŽELOVÁ, M.; NOVÁK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 351-357, Sept. 1994.

DOLEŽEL, J.; KUBALÁKOVÁ, M.; VRÁNA, J.; BARTOS, J. **Encyclopedia of plant and crop science**. London: Taylor & Francis, 2004.

DOLEŽEL, J.; LYSÁK, M. A.; HOUWE, van den I.; DOLEŽELOVÁ, M.; ROUX, N. Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. **Infomusa**, Montpellier, v. 6, n. 1, p. 6-9, June 1997.

DONATO, S. L. R.; SILVA, S. de O.; LUCCA FILHO, O. A.; LIMA, M. B.; DOMINGUES, H.; ALVES, J. da S. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.) em dois ciclos de produção no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 139-144, maio 2006.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides, 1993. v. 1, 314 p.

DUREN, M. van; MORPURGO, R.; DOLEŽEL, 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, Jan. 1996.

FALCONER, M. M.; SEAGULL, R. W. Amiprophos-methyl (APM): a rapid reversible, anti-microtubule agent for plant cell cultures. **Protoplasma**, New York, v. 136, n. 2/3, p. 145-124, June 1987.

FILIPPI, S. B. **Embriogênese somática da bananeira (*Musa* spp.): indução, maturação e análise morfo-anatômica**. 2000. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Bioquímica de Plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

FOX, M. H.; GALBRAITH, D. W. Application of flow cytometry and sorting to higher plant systems. In: MELAMED, M. R.; LINDMO, T.; MENDELSON, M. L. (Ed.). **Flow cytometry and sorting**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 633-650.

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

GOLDERT, C. Biodiversidad y recursos fitogenéticos. **Procisur Informa**, Chile, v. 13, n. 1/4, p. 8-9, 1996.

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

HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DODD, W. A. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Sidney, v. 40, n. 6, p. 887-896, Dec. 1992.

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, Feb. 1937.

HUTCHISON, D. J. Notes on bananas. II. chromosome counts of varieties. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 43, n. 2, p. 131-132, Apr. 1966.

INTERNATIONAL CARNIVOROUS PLANT SOCIETY. Disponível em: <<http://www.carnivorousplants.org/howto/Propagation/Colchicine.php>>. Acesso em: 25 mar. 2009.

JENNY, C.; TOMEKPÉ, K.; BAKRY, F.; ESCALANT, J. V. Conventional breeding bananas. In: JACOME, L.; LEPROIVRE, P.; MARIN, D.; ORTIZ, R.; ROMERO, R.; ESCALANT, J. V. (Ed.). **Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook**. San José: INIBAP, 2002. p. 199-208.

LYSÁK, M. A.; DOLEŽELOVÁ, M.; HORRY, J. P.; SWENNEN, R.; DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 8, p. 1344-1350, June 1999.

MENDES, B. J.; FILIPPI, S. B.; DEMÉTRIO, C. G. B.; RODRIGUEZ, A. P. M. A statistical approach to study the dynamics of micropropagation rates, using banana (*Musa* spp.) as an example. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 2, p. 967-971, Sept. 1999.

MONDIN, M.; DOCHA NETO, A. Citogenética vegetal enfatizando a família orchidaceae. **Orchidstudium**, Poços de Caldas, v. 4, n. 1, p. 24-54, 2006.

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.

PANIS, B. Crioconservación del germoplasma de *Musa*. **Infomusa**, Montpellier, v. 4, n. 1, p. 17-20, June 1995.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. São Paulo: Globo, 1997. 359 p.

RODRIGUES, P. H. V. **Efeito do número de subcultivos na ocorrência de variação somaclonal em mudas de bananeira micropropagadas, das cultivares nanicão e grande naine**. 1996. 104 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ROTH, P. S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. 1984. 79 p. Dissertação (Mestrado em Genética de Plantas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ROUX, N.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F. J.; DOLEŽEL, J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Report**, Heidelberg, v. 21, n. 5, p. 483-490, Jan. 2003.

RUGGIERO, C.; GOTTARDI, M. V. C.; NOGUEIRA FILHO, G. Propagação rápida da bananeira. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CULTURA DA BANANEIRA, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Biológico, 1994. p. 37-50.

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

SHEPHERD, K. A bananeira: taxonomia e morfologia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 1., 1984, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FCAVJ/UNESP, 1984. p. 50-74.

SHEPHERD, K. Observations on *Musa* taxonomy. In: IDENTIFICATION OF GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS MUSA, 1998, Los Baños.

Proceedings... Montpellier: INIBAP, 1990. p. 158-165.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Melhoramento genético da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 133, p. 11-19, jan. 1986.

SHEPHERD, K.; FERREIRA, F. R. **The papua New Guinea biological foundations banana collection at Laloki, Port Moresby, PNG**. Roma: IBPGR, 1982. 10 p.

SILVA, S. de O. e; FLORES, J. C. O.; LIMA NETO, F. P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1567-1574, nov. 2002.

SILVA, S. de O. e; GASPAROTTO, L.; MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M.; FERREIRA, C. F.; RAMOS, M. M.; JESUS, O. N. de. **Programa de melhoramento de bananeira no Brasil**: resultados recentes. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 36 p. (Documentos, 123).

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

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

SIMMONDS, N. W. **Los platanos**. Barcelona: Blume, 1973. 539 p.

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

SKIRVIN, R. M.; McPHEETERS, K. D.; NORTON, M. Sources and frequency of somaclonal variation. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 11, p. 1232-1236, Nov. 1994.

SLUDER, G. The practical use of colchicine and colcemid to reversibly block microtubule assembly in living cells. In: ADOLPH, K. (Ed.). **Advanced techniques in chromosome research**. New York: M. Dekker, 1991. p. 427-447.

SOTO BALLESTERO, M. Posición taxonômica y clasificación de los bananos comestibles. In: _____. **Bananos: técnicas de producción, poscosecha y comercialización**. 2. ed. San José: Litografía e Imprensa, 1992. p. 179-226.

SPECKMANN, G. J.; POST, J.; DIJKSTRA, H. The length of stomata as an indicator for polyploids in rye-grasses. **Euphytica**, Wageningen, v. 14, n. 3, p. 225-230, Nov. 1965.

VALET, G. Predictive medicine by cytomics: potential and challenges. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, Chieti, v. 16, n. 2, p. 164-167, Apr./June 2002.

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, June 1989.

YANPAISAN, W.; KING, N.; DORAN, P. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 1, p. 3-27, Apr. 1999.

CAPÍTULO 2

AÇÃO DA COLCHICINA EM ÁPICES CAULINARES DE BANANEIRA

ACTION OF THE COLCHICINE IN STEM APEX OF BANANA TREE

1 RESUMO

O plantio de variedades de bananeira tradicionais no Brasil tem sido um fator de vulnerabilidade às principais pragas e doenças que afetam a cultura e, diante disso, estratégias alternativas de melhoramento genético, fundamentadas na duplicação de cromossomos, induzida por tratamentos com agente antimitótico têm sido propostas como forma de introduzir resistência a doenças, nos híbridos gerados pelos programas de melhoramento genético da bananeira. O objetivo desse trabalho foi verificar a ação da colchicina em ápices caulinares de bananeira diplóide utilizando diferentes concentrações e tempos de exposição ao antimitótico. Como material vegetal, foram utilizados ápices caulinares de bananeira do diplóide 1318-01. A colchicina foi utilizada nas concentrações de 0 (tratamento controle); 2,5; 5,0, 7,5; 10,0 e 12,5 mM, em solução, sob agitação (20 rpm), por períodos de 24 e 48 horas. Foi avaliada a taxa de sobrevivência de plantas submetidas à colchicina. Verificou-se maior sobrevivência dos explantes (91,7%) em 2,5 mM de colchicina por 24 horas de exposição e 50% na concentração de 7,5 mM de colchicina por 48 horas de exposição ao antimitótico. Conclui-se que a exposição do diplóide 1318-01 à colchicina por um período de 24 horas possibilita maior taxa de sobrevivência dos explantes.

2 ABSTRACT

The cultivation of traditional varieties of banana in Brazil has been a factor in vulnerability to major pests and diseases that affect the culture and strategies, breeding, based on the duplication of chromosomes, induced by treatment with antimitotic agents have been proposed as a way to introduce disease resistance, hybrids generated by the breeding programs of banana. The aim of this study was to evaluate the action of colchicine in apices of diploid banana using different concentrations and exposure times to antimitotic. As plant material were used apices of diploid banana 1318-01. Colchicine was used at concentrations of 0 (control), 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 and 12.5 mM in solution under agitation (20 rpm) for periods of 24 and 48 hours. We assessed the survival rate of plants subjected to colchicine. A higher survival of the explants (91.7%) in 2.5 mM colchicine for 24 hours exposure and 50% at a concentration of 7.5 mM colchicine for 48 hours of exposure to antimitotic. Concluded that exposure of diploid 1318-01 to colchicine for a period of 24 hours allows for higher survival rate of explants.

Key words: *Musa acuminata*, tissue culture, antimitotic.

3 INTRODUÇÃO

O plantio de variedades de bananeira tradicionais no Brasil tem sido um fator de vulnerabilidade às principais pragas e doenças que afetam a cultura, tais como Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), sigatoka amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach) e mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) (Cordeiro, 1999).

O alto vigor das plantas do gênero *Musa* está diretamente associado com a ploidia, já que variedades triplóides e tetraplóides são bem mais vigorosas que as diplóides (Stover & Simmonds, 1987). Apesar de os híbridos tetraplóides serem, geralmente, inferiores aos triplóides, em termos de resistência ao despençamento e ao arqueamento das folhas, estes podem ser produzidos para a posterior obtenção de triplóides secundários AAA após cruzamento com diplóides elite. Por meio deste procedimento espera-se obter novas cultivares de bananeira (Dantas et al., 1999). Uma das técnicas utilizadas é a duplicação de cromossomos.

Estratégias alternativas de melhoramento genético da bananeira, fundamentadas na duplicação de cromossomos, induzida por tratamentos com agente antimitótico têm sido propostas como forma de introduzir resistência a doenças nos híbridos gerados pelos programas de melhoramento genético da cultura (Stover & Buddenhagen, 1986).

A colchicina é uma substância muito 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 seu mecanismo de ação é conhecido, ela se liga reversivelmente ao dímero de tubulina, causando mudança conformacional que impede a polimerização do fuso mitótico e, conseqüentemente, bloqueia a célula em metáfase (Morejohn et al., 1987; Sluder, 1991).

Em concentrações mais baixas, a colchicina promove a despolimerização do fuso mitótico levando ao acúmulo de cromossomos metafásicos, onde as cromátides estão condensadas com os braços separados em consequência de seu natural movimento de repulsão que não é acompanhado pela divisão do centrômero, técnica essa, entre outras, que pode ser utilizada para a preparação do cariótipo (Mondin & Docha Neto, 2006).

Além disso, a colchicina levou à esterilidade e crescimento anormal de plantas regeneradas (Wan et al., 1989). Por isso, tem-se variado bastante a forma de aplicação de indutores de poliploidia, buscando maior eficiência do tratamento, bem como variação da concentração, tempo de exposição e formas de aplicação dessas substâncias, tornando-se requisitos indispensáveis em programa de melhoramento genético visando à duplicação cromossômica.

O objetivo deste trabalho foi verificar a ação da colchicina em ápices caulinares de bananeira diplóide utilizando diferentes concentrações e tempos de exposição ao antimitótico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, situado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, utilizando bananeira diplóide melhorada desenvolvida pelo programa de melhoramento genético da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical.

Como material vegetal, foram utilizados ápices caulinares de bananeira do diplóide 1318-01 (Malaccensis FHIA x Sinwobogi), pré-estabelecidos *in vitro*, que foram posteriormente multiplicados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 mg L⁻¹

de 6-benzilaminopurina (BAP) para proliferação de brotações, as quais foram submetidas aos tratamentos com colchicina.

A colchicina foi utilizada nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 mM, em solução sob agitação (20 rpm), por períodos de 24 e 48 horas, e o tratamento controle foi considerado a bananeira *in vitro* sem tratamento com colchicina.

Após 24 e 48 horas, os ápices caulinares foram retirados do antimitótico e lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. Logo após, foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS e, posteriormente, mantidos em sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM 20 W), com irradiância média de 42 W m^{-2} , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2 (cinco concentrações x dois períodos de exposição).

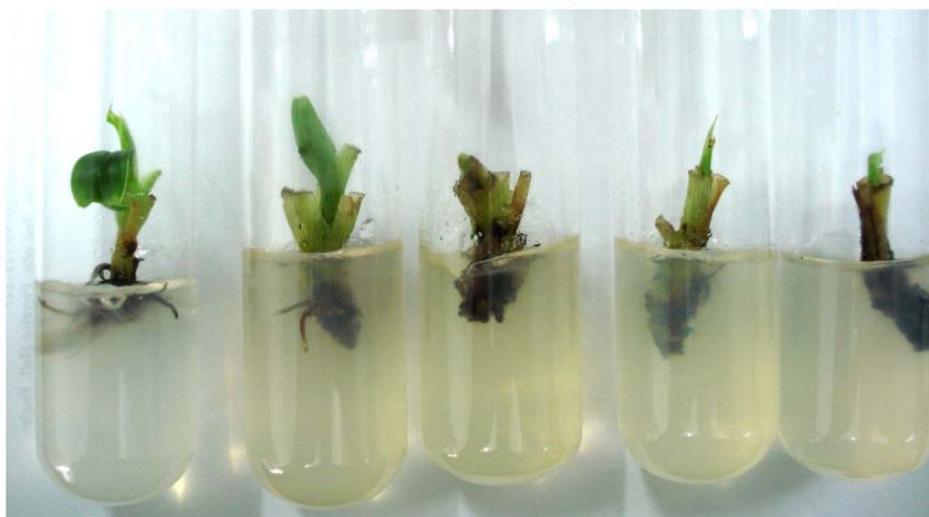
Foram utilizadas 12 plantas por tratamento, ou seja, 4 repetições com 3 plantas cada uma. Após 60 dias de permanência *in vitro*, avaliou-se a taxa de sobrevivência de plantas à colchicina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As FIGURAS 1 e 2 mostram os explantes submetidos aos tratamentos com colchicina, nos quais é possível observar o efeito do antimitótico nos tecidos vegetais.

Nota-se na FIGURA 1 que, em concentrações de 2,5 e 5,0 mM, observou-se que os explantes sobrevivem ao tratamento, o contrário ocorreu em concentrações mais altas onde foi observada elevada perda, provando que doses muito elevadas são prejudiciais, pois reduzem a sobrevivência dos explantes

(FIGURAS 1 e 2).



2,5 mM 5,0 mM 7,5 mM 10,0 mM 12,5 mM

FIGURA 1 Ápices caulinares de bananeira diplóide submetidas a diferentes concentrações de colchicina por um período de 24 horas.

Do total de explantes (12 plantas) tratados com colchicina do diplóide 1318-01, 11 plantas (91,7%) sobreviveram ao tratamento com 2,5 mM por 24 horas (TABELA 1).

TABELA 1 Proporção de explantes sobreviventes do diplóide 1318-01, tratados com colchicina em diferentes períodos de exposição.

Período de Exposição (horas)	Concentração de Colchicina (mM)	Taxa de Sobrevivência (%)
24	2,5	91,7
24	5,0	83,3
24	7,5	8,3
24	10,0	16,7
24	12,5	16,7

48	2,5	8,3
48	5,0	8,3
48	7,5	50
48	10,0	33,3
48	12,5	8,3

A FIGURA 2 mostra que os explantes submetidos ao tratamento com colchicina por um período de 48 horas apresentam menor taxa de sobrevivência, embora tenha se observado maior taxa de sobrevivência (50%) dos explantes no tratamento com 7,5 mM de colchicina.



2,5mM 5,0mM 7,5mM 10,0mM 12,5mM

FIGURA 2 Diferentes concentrações de colchicina por um período de 48 horas.

Na FIGURA 3A observa-se que em concentrações mais altas de colchicina, em um período de exposição de 24 horas, ocorre maior mortalidade dos explantes, observando necrose de seus tecidos, possivelmente pelo efeito tóxico causado pelo antimitótico. Este fato também foi observado por Hamill et al. (1992) que verificaram que explantes tratados com colchicina inicialmente

apresentaram menor crescimento que as testemunhas e a mortalidade aumentou de 0 pra 70% em concentrações de até 25 mM de antimetabólito.

Neste trabalho, maior porcentagem de sobrevivência das plantas foi observada em concentrações de 2,5 e 5,0 mM de colchicina por 24 horas (FIGURA 3A), esses resultados corroboram com Duren et al. (1996), pois eles observaram que, geralmente, o efeito do tratamento nas plantas reflete na menor taxa de regeneração em relação à testemunha e, menor taxa de regeneração de plantas tratadas com colchicina.

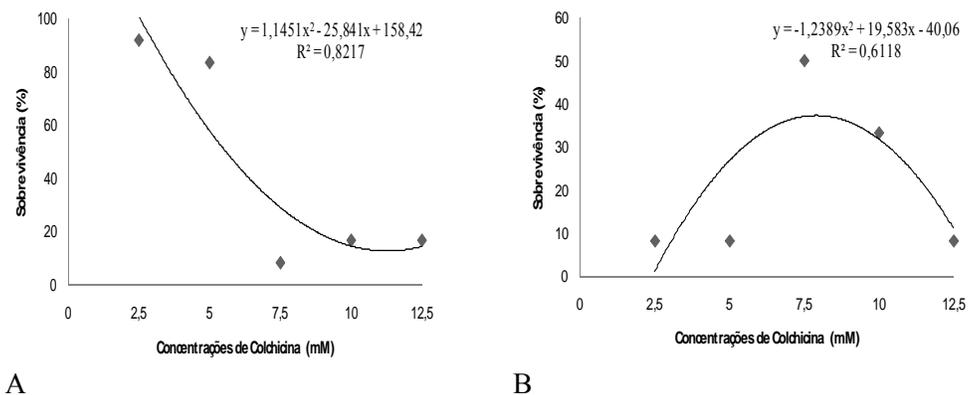


FIGURA 3 (A) 24 horas e (B) 48 horas. Sobrevivência (%) de explantes de bananeira do diplóide 1318-01 tratados em diferentes concentrações de colchicina (mM).

Concentrações de 2,5 e 5,0 mM de colchicina por 48 horas (Figura 3B) promoveram menor taxa de sobrevivência de explantes de bananeira. Embora tenha-se observado maior sobrevivência de explantes em 7,5 mM, a tendência da curva de regressão para esse tempo de exposição dá-se no sentido da redução na taxa de sobrevivência.

Tendência similar foi observada por Barbosa (2004), que verificaram que a colchicina afetou drasticamente o desenvolvimento de meristemas e

segmentos caulinares. E por Abreu (2002), que observaram letalidade em gemas axilares in vivo e segmentos caulinares in vitro.

Gmitter Junior & Ling (1991) verificaram alta mortalidade nas variedades de laranja Hamlin e Ridge Pineapple demonstrando alta sensibilidade à colchicina. Yang et al. (2006), trabalhando com *Vitis vinifera*, também observaram redução na sobrevivência com aumento da concentração de colchicina e tempo de exposição.

A sobrevivência dos explantes tratados com colchicina depende da concentração e duração do tratamento, mas em geral, altas concentrações e longos períodos de exposição aos agentes indutores diminuem a sobrevivência das plântulas (Thao et al., 2003). Dependendo da espécie, a colchicina pode apresentar maior efeito citotóxico que outras substâncias antimitóticas como esterilidade, crescimento e morfologia anormal, perdas ou rearranjo de cromossomos (Thao et al., 2003).

Viehmannová et al. (2009), trabalhando com yacon (*Smilax sonchifolius*), observaram maior taxa de sobrevivência dos explantes em concentrações de 5mM de colchicina por 24 horas. Unemoto et al. (2009) relatam que o tempo de exposição à colchicina é um importante fator que interfere tanto no desenvolvimento vegetativo quanto na sobrevivência das plantas.

Latado et al. (2007) verificaram que a colchicina foi tóxica aos explantes de laranja 'Pera-de-abril' e de tangor 'Murcott', e foi possível observar como sintomas de toxidez e mortalidade por colchicina o escurecimento e a degeneração das pontas dos segmentos.

Vakili (1967) 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 tetraplóides

ficaram mais altas e mais robustas que as diplóides, porém com crescimento mais lento, folhas mais inclinadas e sistema radicular menos desenvolvido.

A utilização de altas concentrações de colchicina ou a exposição de tecidos por tempo inadequado, além da forma de aplicação do antimitótico, podem levar à morte de células e plantas, posto que a tolerância à colchicina varia de acordo com a espécie (Schifino-Wittmann, 2000).

6 CONCLUSÃO

A exposição do diplóide 1318-01 em 2,5mM de colchicina por um período de 24 horas possibilita maior taxa de sobrevivência dos explantes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos experimentos testando concentrações e tempos reduzidos de exposição devem ser conduzidos verificando maior sobrevivência e consequentemente melhor eficiência dos tratamentos com colchicina para a posterior duplicação de cromossomos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

CORDEIRO, Z. J. M. Doenças. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. rev. Brasília: Embrapa/SPI; Cruz das Almas: Embrapa/CNPMPF, 1999. p. 353-407.

DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. de O.; SOUZA, A. da S.; ALVES, E. J.; CORDEIRO, Z. J. M.; SOARES FILHO, W. dos S. Citogenética e melhoramento genético. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. rev. Brasília: Embrapa/SPI; Cruz das Almas: Embrapa/CNPMPF, 1999. p. 107-150.

DUREN, M. van; MORPURGO, R.; DOLEŽEL, 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, Jan. 1996.

GMITTER JUNIOR, F. G.; LING, X. B. Embryogenesis *in vitro* and nonchimeric tetraploid plant-recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 116, n. 2, p. 317-321, Mar. 1991.

HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DODD, W. A. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Sidney, v. 40, n. 6, p. 887-896, Dec. 1992.

LATADO, R. R.; CRISTOFANI-YALY, M.; CARVALHO, C. R.; MACHADO, M. A. Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1429-1435, out. 2007.

MONDIN, M.; DOCHA NETO, A. Citogenética vegetal enfatizando a família orchidaceae. **Orchidstudium**, Poços de Caldas, v. 4, n. 1, p. 24-54, 2006.

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.

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

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. The cytogenetics and evolution of forage legumes from Rio Grande do Sul: a review. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 989-995, dez. 2000.

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

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

SLUDER, G. The practical use of colchicine and colcemid to reversibly block microtubule assembly in living cells. In: ADOLPH, K. (Ed.). **Advanced techniques in chromosome research**. New York: M. Dekker, 1991. p. 427-447.

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**. 3. ed. London: Longmans, 1987.

THAO, N. T. P.; URESHINO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, n. 1, p. 19-25, Jan. 2003.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; DESTRO, D.; BARBOSA, C. M.; LONE, A. B. Sobrevivência e diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum* submetidos a tratamento com ácido peracético e colchicina. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá, v. 31, n. 3, p. 503-508, set .2009.

VAKILI, N. G. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 54, n. 1, p. 24-36, Jan. 1967.

VIEHMANNOVÁ, I.; CUSIMAMANI, E. F.; BECHYNE, M.; VYVADILOVÁ, M.; GREPLOVA, M. In vitro induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 21-25, Apr. 2009.

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, June 1989.

YANG, X. M.; CAO, Z. Y.; AN, L.; WANG, Y. M.; FANG, X. W. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.) **Euphytica**, Wageningen, v. 152, n. 2, p. 217-224, Nov. 2006.

CAPÍTULO 3

**METÁFASES MITÓTICAS EM BANANEIRA POR MEIO DO
AMIPROFÓS-METIL (APM)**

**MITOTIC METAPHASE IN BANANA TREE THROUGH OF THE
AMIPROPHOS-METHYL (APM).**

1 RESUMO

Na metáfase mitótica, os cromossomos se encontram alinhados na placa equatorial da célula e, nessa fase, são mais facilmente analisados devido à sua maior contração e individualização, e sua observação é facilitada quando se aplicam substâncias antimitóticas às células em divisão como, por exemplo, o Amiprofós-metil (APM). O objetivo deste trabalho foi avaliar a melhor dose e tempo de exposição ao antimitótico Amiprofós-metil para obtenção de metáfases mitóticas do diplóide 1304-04, com o intuito de obter uma dosagem e um período de exposição que proporcione a despolimerização do fuso mitótico. Foram utilizadas pontas de raízes do diplóide de bananeira 1304-04 estabelecido *in vitro*, sendo estas pré-tratadas com solução 0 (tratamento controle), 20, 40 e 60 μM de APM por 2, 3 e 4 horas. Foram utilizadas 10 lâminas por tratamento e observadas 10 metáfases por lâmina. Após o pré-tratamento em solução de 20 μM de APM por 2 horas, foi possível observar a metáfase mitótica no diplóide de bananeira 1304-04, mas com alguns cromossomos ainda sobrepostos. Já no pré-tratamento com 60 μM de APM com mesmo tempo de exposição, a visualização dos cromossomos foi facilitada. No pré-tratamento em solução de 60 μM de APM por 4 horas, além de mais individualizados, houve menor sobreposição de cromossomos. Conclui-se que o APM aplicado em concentrações de 20 a 60 μM por 2 a 4 horas provoca a despolimerização do fuso mitótico, possibilitando a visualização dos cromossomos e obtenção de boas metáfases.

Palavras-chave: *Musaceae*, cromossomos, antimitótico.

2 ABSTRACT

In mitotic metaphase chromosomes are aligned at the equatorial plate of the cell, this phase are more easily analyzed because of their greater contraction and individualization, and his observation is facilitated when applying substances to the cells in mitotic division, for example, Amiprophos -methyl (APM). The objective of this study was to evaluate the best dose and duration of exposure to antimittotic Amiprophos-methyl to obtain mitotic metaphases of diploid 1304-04, in order to obtain a strength and an exposure period to provide a spindle depolymerization. We used root tips of diploid bananeira1304-04 established in vitro, these pre-treated with a solution 0 (control), 20, 40 and 60 μM APM for 2, 3 and 4 hours. 10 slides were used per treatment and observed 10 metaphases per slide. After pre-treatment in a 20 μM APM for 2 hours was observed in mitotic metaphase diploid banana 1304-04, but with some chromosomes still overlapped. In the pre-treatment with 60 μM APM with the same exposure time, the visualization of chromosomes has been facilitated. The pretreatment solution of 60 μM APM for 4 hours, and more individualized, there was less overlap of chromosomes. We conclude that the APM used in concentrations from 20 to 60 μM for 2 to 4 hours causes the depolymerization of spindle, allowing the visualization of chromosomes and obtaining good metaphases.

Key words: *Musaceae*, chromosomes, antimittotic.

3 INTRODUÇÃO

Na metáfase mitótica, os cromossomos encontram-se alinhados na placa equatorial da célula e, nessa fase, são mais facilmente analisados devido à sua maior contração e individualização. A visualização é grandemente aumentada quando se aplicam substâncias antimitóticas às células em divisão (Guerra, 1989) como, por exemplo, os herbicidas do grupo organofosforado, o amiprofós-metil (APM), dinitroanilina e a orizalina (Morejohn et al., 1987; Verhoeven et al., 1990; Ramulu et al., 1995; Binsfeld et al., 2000).

Essas substâncias antimitóticas ligam-se às proteínas que formam as fibras do fuso acromático, denominadas tubulinas, impedindo a sua despolimerização e conseqüentemente suprimindo a formação das fibras, ou ainda inativando os fusos já formados (Guerra, 1989).

Em estudos básicos sobre microtúbulos de plantas, verificou-se que substâncias tóxicas, como alguns herbicidas ou colchicina, formam complexos com o dímero da α e β tubulina, impedindo sua normal polimerização (Hansen et al., 1998). De acordo com Quader (1997), os microtúbulos (MTs) são filamentos de estrutura subcelular, compostos basicamente por proteínas heterodiméricas, α e β tubulina, e exercem importantes funções celulares durante o crescimento e ciclo mitótico, também participam em diversos processos relacionados à migração dos cromossomos, estruturação celular, orientação e disposição das microfibrilas de celulose, formação da parede celular, ao movimento intracelular bem como à diferenciação celular (Jordan & Wilson, 1999).

Entre os fatores que mais afetam a ação dos MTs na célula, estão os fatores químicos, hormonais, iônicos e gradientes elétricos, ou ainda os fatores ambientais, tais como temperatura, luminosidade, gravidade e pressão (Quader, 1997; Jordan & Wilson, 1999; Binsfeld et al., 2000).

Alguns trabalhos têm sido conduzidos bloqueando-se metáfase em cultura de células em suspensão, por meio do tratamento com agentes antimicrotubulares, de algumas espécies como *Petunia hybrida* (Conia et al., 1987), *Lycopersicon esculentum* e *Lycopersicon pennellii* (Arumuganathan et al., 1991). As suspensões celulares apresentam, naturalmente, certo grau de sincronia mitótica, o qual é muito baixo em células meristemáticas (Doležel et al., 1994).

O tratamento de células com agente antimicrotubular impede a polimerização dos microtúbulos, com isso, o movimento cromossômico é inibido e as células não prosseguem a divisão além da metáfase (Bowman, 1977).

O APM é um tipo de herbicida amido fosfórico que interrompe diretamente a dinâmica do microtúbulo em células vegetais (Morejohn & Fosket, 1984) e são utilizados na agricultura em todo o mundo, pois são rapidamente degradados e apresentam pouco resíduo para o meio ambiente (Brahma et al., 1985), e mesmo em baixas concentrações impedem a polimerização dos microtúbulos inibindo a formação dos fusos cromáticos e induzindo a separação dos cromossomos metafásicos, que ficam dispersos por todo o citoplasma, onde condensam formando assim os chamados micronúcleos. Vários micronúcleos sub-diplóides, contendo um ou poucos cromossomos, podem ser visualizados nas células após o tratamento com herbicida (Morejohn et al., 1987; Falconer & Seagull, 1987).

Alguns experimentos demonstram que a divisão celular pode ser bloqueada na metáfase em meristemas radiculares tratados com APM, que tem sido amplamente utilizado para induzir a sincronização da metáfase mitótica (Doležel et al., 1992).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a melhor dose e tempo de exposição ao Amiprofós-Metil (APM) para a obtenção de metáfases

mitóticas do diplóide de bananeira 1304-04, com o intuito de obter uma concentração que proporcione a despolimerização do fuso mitótico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética, situado no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, utilizando bananeira diplóide melhorada desenvolvida pelo programa de melhoramento genético da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical.

Foram utilizadas pontas de raízes pré-tratadas com solução 20, 40 e 60 μM de Amiprofós-metil (APM) por 2, 3 e 4 horas de bananeira diplóide 1304-04 [Malaccensis x Madang (*Musa acuminata* spp. *banksii*)] cultivados *in vitro*.

As raízes foram retiradas de bananeiras mantidas *in vitro* e fixadas em solução de Carnoy 3:1, ou seja, três partes de álcool 70% para uma parte de ácido acético, por 24 horas, lavadas duas vezes em água deionizada por períodos de 5 minutos e hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N a 60°C, por 20 minutos.

As raízes foram submetidas ao tratamento com o APM e, em seguida, a extração e a fragmentação dos meristemas 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, 2004). Em seguida, as lâminas foram imersas por 30 segundos em ácido acético 45% e coradas com GIEMSA 10%, por 10 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3 (3 concentrações x 3 períodos de exposição), sendo utilizadas 10 raízes por tratamento.

A observação e a análise das lâminas foram feitas com uso de microscópio de luz Leica DMSL com câmera digital Nikon (DSFi1), utilizando

objetiva de aumento de 100 vezes (imersão em óleo). Foram utilizadas 10 lâminas por tratamento e observadas 10 metáfases por lâmina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o pré-tratamento em solução de 20 μM de APM por 2 horas foi possível observar a metáfase mitótica no diplóide de bananeira 1304-04 (FIGURA 1), mas com alguns cromossomos ainda sobrepostos. Já no pré-tratamento com 60 μM de APM (FIGURA 2) pelo mesmo tempo de exposição, a visualização dos cromossomos foi melhor.

Alguns experimentos demonstram que a divisão celular pode ser bloqueada na metáfase em meristemas radiculares tratados com APM, e tem sido amplamente utilizado para induzir a sincronização da metáfase mitótica (Doležel et al., 1992).

A observação de cromossomos individualizados é possível quando os mesmos encontram-se na metáfase mitótica, fase de sua máxima condensação. Em citogenética, é altamente desejável obter cromossomos individualizados, com morfologia bem definida, no seu grau máximo de condensação, o que ocorre durante o período de divisão celular, denominado metáfase. Nessa fase, os cromossomos estão alinhados no plano equatorial da célula, ligados, pelo cinetócoro, às fibras do fuso acromático, cujo encurtamento desencadeia a anáfase, caracterizada pela divisão do centrômero que mantinha unida as cromátides-irmãs (Guerra, 1989).

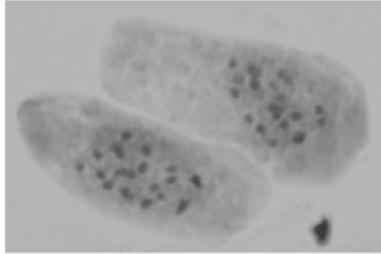


FIGURA 1 Metáfase mitótica no diplóide 1304-04 pré-tratado em solução de 20 μ M de APM por 2 horas.



FIGURA 2 Metáfase mitótica no diplóide 1304-04 pré-tratado em solução de 60 μ M de APM por 2 horas.

Falconer & Seagull (1996) observaram a despolimerização completa dos microtúbulos em células de alfafa (*Medicago sativa*), cenoura (*Daucus carota*), alface (*Lactuca sativa*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) usando o APM, enquanto Falconer et al. (1988) obteve a despolimerização em alfafa e *Zinnia* utilizando 3 μ M de APM, por 1 a 2 horas.

De acordo com Cuco et al. (2003), os procedimentos para preparações citológicas com alta frequência de metáfases para a análise de cariótipos de plantas dependem do estabelecimento de uma rotina de obtenção de raízes apresentando meristemas com alto índice mitótico. Outro ponto seria a obtenção de preparações com alta frequência de metáfases apresentando cromossomos com morfologia nítida.

A obtenção de alta proporção de células em metáfase é, segundo Doležel et al. (1994), o pré-requisito para o isolamento de cromossomos bem individualizados e sem contaminação com detritos nucleares e citoplasmáticos.

Guerra (1999) observou em *Pisum sativum* que tratamentos com amiprofós-metil por períodos de tempo superiores a 2 horas provocou aumento da ocorrência de células com cromossomos apresentando cromátides únicas, o que indica perda do bloqueio em metáfase.

Na FIGURA 3, as células apresentam alto índice de cromossomos separados, o que indica que o pré-tratamento com 20 μM de APM por 4 horas foi eficiente, o que permitiu a observação de grande parte dos cromossomos.

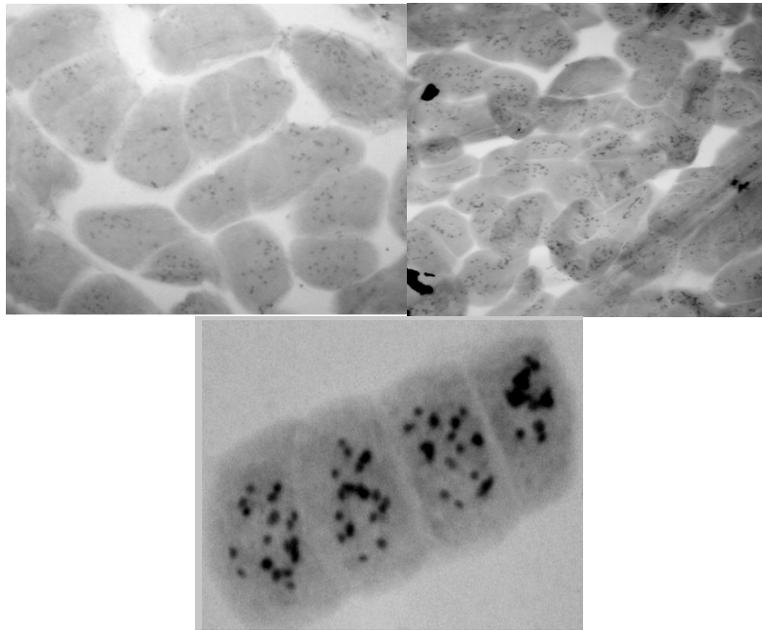


FIGURA 3 Metáfase mitótica no diplóide 1304-04 pré-tratado em solução de 20 μM de APM por 4 horas.

Peng et al. (2003) investigaram o efeito do APM na estrutura do cromossomo e a composição protéica do meristema radicular de trigo (*Triticum durum*), verificando que a concentração de 4 μM modificou a estrutura do cromossomo e, a de 10 μM , a composição protéica.

Araújo (2008), por sua vez, tratou raízes de plantas hermafroditas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) com 3 μM de APM, possibilitando a obtenção de células metafásicas e prometáfásicas com cromossomos individualizados, bem espalhados na lâmina e sem sobreposições, com constrições primárias e secundárias bem definidas.

Já no pré-tratamento em solução de 60 μM de APM por 4 horas (FIGURA 4), além de apresentar cromossomos mais individualizados, a lâmina apresentou menor sobreposição deles.

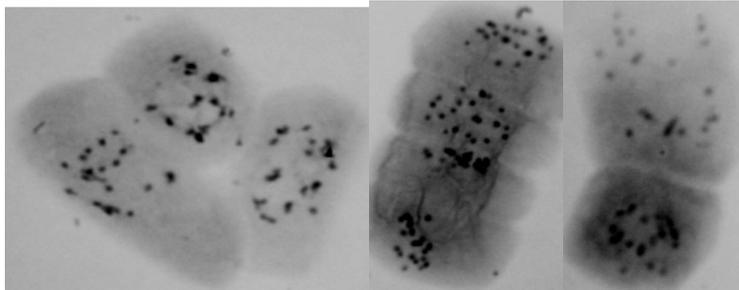


FIGURA 4 Metáfase mitótica no diplóide 1304-04 pré-tratado em solução de 60 μM de APM por 4 horas.

Doležel et al. (1992), trabalhando com *Vicia faba*, obteve alto rendimento de metáfases, substituindo a colchicina pelo APM. Fato observado também por Morejohn & Fosket (1984), que verificaram a melhor eficiência do APM na polimerização da tubulina em relação à colchicina.

Aarestrup (2001) relatou que a colchicina é um agente bloqueador e que quando administrada em baixa concentração, cerca de 12,5 mM, torna-se

possível a obtenção de células metafásicas. Singh (1993), estudando feijão (*Phaseolus vulgaris*), observou que o uso da colchicina facilita a entrada do fixador na célula, mantendo a integridade dos cromossomos sem causar distorções (Sharma & Sharma, 1999). Porém, os herbicidas, a exemplo do APM, também podem ser utilizados pelo mesmo fundamento do uso da colchicina. Kato (1997) observou que o APM tem maior afinidade pela tubulina das fibras do fuso do que a colchicina. Sendo assim, podem ser utilizados em pré-tratamentos de células para obtenção de células metafásicas.

Soluções de fixação são utilizadas por penetrarem com maior facilidade no material causando a remoção de material celular dispensável, as mesmas têm sido empregadas para manterem as células no estágio de divisão sem causar distorção dos cromossomos (Singh, 1993).

A obtenção de células metafásicas normais sem o uso de técnicas físicas e/ou químicas não é um caminho viável para a análise detalhada do genoma de uma espécie, pois os cromossomos não se apresentam de forma linear (Sybenga, 1992). O acúmulo de metáfases ocorre pelo bloqueio parcial ou completo da formação das fibras do fuso que normalmente direcionam a distribuição cromossômica na célula (Aarestrup, 2001).

A escolha do tipo de pré-tratamento depende do tamanho dos cromossomos, que pode ser muito variável devido à grande diferença do conteúdo de DNA entre as espécies de plantas (Bennett & Leitch, 1997).

6 CONCLUSÃO

Concentrações de APM de 20 a 60 μM por 2 a 4 horas provocam a despolimerização do fuso mitótico, possibilitando a visualização dos cromossomos e obtenção de boas metáfases. Essas concentrações servirão como referência para trabalhos futuros de duplicação cromossômica em bananeira.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, J. R. **Análise morfológica dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 2001. 143 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ARAÚJO, F. S. **Estudos citogenéticos e citométricos em mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2008. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ARUMUGANATHAN, K.; SLATTERY, J. P.; TANKSLEY, S. D.; EARLE, E. D. Preparation and flow cytometric analysis of metaphase chromosomes of tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 82, n. 1, p. 101-111, July 1991.

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

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear amounts in Angiosperms – 583 new estimates. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 2, p. 169-196, Aug. 1997.

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

BOWMAN, J. C. A method of synchronizing somatic cell divisions for chromosome examination in cereals and forage grasses. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 5, n. 2, p. 500-508, 1977.

BRAHMA, B. P.; UMESH, K. S. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide Fensulfothion. **Cytobios**, Cambridge, v. 42, p. 147-215, 1985.

CONIA, J.; BERGOUNIOUX, C.; PERENNES, C.; MULLER, P.; BROWN, S.; GADAL, P. Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes from *Petunia* hybrid protoplasts. **Cytometry**, New York, v. 8, n. 5, p. 500-508, Sept. 1987.

CUCO, S. N.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 363-370, set. 2003.

DOLEŽEL, J.; CIHALIKOVA, J.; LUCRETTI, S. A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tip of *Vicia faba* L. **Planta**, Berlin, v. 188, n. 1, p. 93-98, Aug. 1992.

DOLEŽEL, J.; DOLEŽELOVÁ, M.; NOVÁK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 351-357, Sept. 1994.

FALCONER, M. M.; DONALDSON, G.; SEAGULL, R. W. MTOCs in higher plant cells: an immunofluorescent study of microtubule assembly sites following depolymerization by APM. **Protoplasma**, New York, v. 144, n. 1, p. 46-55, Feb. 1988.

FALCONER, M. M.; SEAGULL, R. W. Amiprofos-methyl (APM): a rapid reversible, anti-microtubule agent for plant cell cultures. **Protoplasma**, New York, v. 136, n. 2/3, p. 145-124, June 1987.

GUERRA, A. C. D. **Isolamento cromossômico em células meristemáticas radiculares sincronizadas de milho (*Zea mays* L.)**. 1999. 77 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

HANSEN, A. L.; GERTZ, A.; JOERSBO, B.; ANDESRSEN, S. B.
Antimicrotubule herbicide for in vitro chromosome doubling in *Beta vulgaris* L.
ovule culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, n. 2, p. 231-237, June 1998.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. The use and action of drugs in analyzing
mitosis. **Methods in Cell Biology**, San Diego, v. 61, p. 267-295, 1999.

KATO, A. Nitrous oxide (N₂O) is effective in chromosome doubling of maize
seedlings. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Indiana, v. 71, p. 36-37,
1997.

MOREJOHN, L. C. The molecular pharmacology of plant tubuline and
microtubules. In: LLOYD, C. W. (Ed.). **The cytoskeletal basis of plant growth
and form**. London: Academic, 1991. p. 29-43.

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.

MOREJOHN, L. C.; BUREAU, T. E.; TOCCHI, L. P.; FOSKET, D. E.
Tubulins from different higher plant species are immunologically nonidentical
and bind colchicines differentially. **Proceedings National Academy of Science**,
New York, v. 81, n. 5, p. 1440-1444, Mar. 1984.

MOREJOHN, L. C.; FOSKET, D. E. Inhibition of microtubule polymerization
in vitro by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methyl. **Science**,
Washington, v. 224, n. 4651, p. 874-876, May 1984.

PENG, Y. K.; WANG, Z.; CHENG, L.; CHEN, H. Effect of phosphoric amide
herbicide APM on structure and protein composition of chromosome in *Triticum
durum*. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 6, n. 2, p. 134-138, 2003.

QUADER, H. Cytoskeleton: microtubules. **Progress in Botany**, Berlin, v. 59, p.
375-395, 1997.

RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P.; RUTGERS, E.; BLASS, J.; VERBEEK, W. H. J.; VERHOEVEN, H. A.; COLIJNHOOYMANS, C. M. Microprotoplast fusion technique: a new tool for gene transfer between sexually-incongruent plant species. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 255-268, Feb. 1995.

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

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Florida: CRC, 1993. 391 p.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 469 p.

VERHOEVEN, H. A.; RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P. A comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Planta**, Berlin, v. 182, n. 3, p. 408-411, Oct. 1990.

CAPÍTULO 4

**COLCHICINA E AMIPROFÓS-METIL (APM) NA DUPLICAÇÃO
CROMOSSÔMICA DE DIPLÓIDES DE BANANEIRA**

**COLCHICINE AND AMIPROPHOS-METHYL (APM) IN THE
DUPLICATION OF CHROMOSOME OF DIPLOID OF BANANA TREE.**

1 RESUMO

Um dos grandes problemas que afetam a bananicultura são as doenças e pragas que normalmente ocorrem nas variedades tradicionalmente utilizadas no Brasil. Assim, uma das estratégias para solucionar estes problemas é a seleção de novos genótipos, resistentes às doenças, e que apresentem boas características agronômicas, o que tem sido alcançado em programas de melhoramento da bananeira mediante o uso de técnicas convencionais de hibridação ou uso de biotecnologia. Uma técnica que pode ser utilizada é a duplicação cromossômica, induzida por agentes antimitóticos. Objetivou-se, com este trabalho, verificar a concentração e o tempo de exposição à Colchicina e o Amiprofós-metil na duplicação cromossômica de diplóides melhorados de bananeira. Como material vegetal, foram utilizados ápices caulinares de bananeira do diplóide 1304-04 e 8694-15. A colchicina foi utilizada nas concentrações de 0 (tratamento controle); 1,25; 2,5; 5,0mM, e o APM nas concentrações de 0 (tratamento controle); 40 e 80 μ M, em solução sob agitação (20 rpm), por períodos de 24 e 48 horas. O APM por 24 horas possibilita a obtenção de plantas tetraplóides no diplóide 1304-04 e a colchicina por 48 horas resulta em plantas tetraplóides no diplóide 8694-15. Com o uso de APM obteve-se 66,67% de plantas tetraplóides no diplóide 1304-04, através de 40 μ M por 24 horas e 18,18% em 80 μ M por 48 horas e no diplóide 8694-15, e usando 40 e 80 μ M por 48 horas, foram observados, respectivamente, 27,27 e 21,43% de plantas tetraplóides. Já para a colchicina, no diplóide 1304-04 apenas o tratamento 1,25 mM por 48 horas apresentou 25% de plantas tetraplóides e, no diplóide 8694-15, concentração de 1,25 mM por 24 horas resultou em 6,67% de plantas tetraplóides, 1,25 mM por 48 horas em 18,19%, 2,5 mM por 48 horas 50%, e na concentração de 5,0 mM por 48 horas produziram 50% tetraplóides. O APM por 24 horas possibilita a obtenção de plantas tetraplóides no diplóide 1304-04 e a colchicina por 48 horas resulta em plantas tetraplóides no diplóide 8694-15.

Palavras-chave: *Musa acuminata*, antimitótico, citometria de fluxo.

2 ABSTRACT

One of the major problems affecting the banana are the diseases and pests that normally occur in the varieties traditionally used in Brazil. Thus, one strategy to solve these problems is the selection of new genotypes, disease resistant, and exhibit good agronomic characteristics, which has been achieved in breeding of banana by using conventional techniques of hybridization or the use of biotechnology. One technique that can be used is the chromosome duplication induced by anticancer agents. The objective of this work to measure the concentration and time of exposure to colchicine and Amiprophos-methyl in chromosome doubling of diploid banana improved. As plant material were used apexes of diploid banana 1304-04 and 8694-15. Colchicine was used at concentrations of 0 (control), 1.25, 2.5, 5.0 mM, and the APM at concentrations of 0 (control), 40 and 80 μM in solution under agitation (20 rpm) for periods of 24 and 48 hours. APM for 24 hours possible to obtain tetraploid plants in 1304-04 diploid and colchicine for 48 hours results in diploid plants in tetraploid 8694-15. With the use of APM was obtained 66.67% of diploid plants in tetraploid 1304-04, by 40 μM for 24 hours and 18.18% at 80 μM for 48 hours and diploid 8694-15, using 40 and 80 μM for 48 hours, were observed respectively, 27.27 and 21.43% of tetraploid plants. However, for colchicine, the diploid treatment 1304-04 only 1.25 mM for 48 hours with 25% of tetraploid plants and the diploid 8694-15, concentration of 1.25 mM for 24 hours resulted in 6.67% of tetraploid plants, 1.25 mM for 48 hours in 18.19%, 2.5 mM for 48 hours 50%, and the concentration of 5.0 mM for 48 hours produced 50% tetraploid. APM for 24 hours possible to obtain tetraploid plants in 1304-04 diploid and colchicine for 48 hours results in diploid plants in tetraploid 8694-15.

Key-words: *Musa acuminata*, antimitotic, flow cytometry.

3 INTRODUÇÃO

A bananicultura assume importância social e econômica em mais de 80 países, principalmente em pequenas propriedades (Silva et al., 2002), destacando-se como uma das culturas de maior produção entre as frutíferas tropicais (Donato et al., 2006).

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana, com produção de 7 milhões de toneladas em 2007 e área cultivada de 513 mil hectares (AGRIANUAL, 2009). No Brasil, seu cultivo estende-se da região Norte ao Sul do País, e seu fruto representa uma fonte contínua de alimento e de renda aos produtores (Silva et al., 2003).

Os principais problemas que afetam as variedades tradicionalmente utilizadas no Brasil são as pragas e doenças. Assim, uma das estratégias para solucionar estes problemas é a seleção de novos genótipos, resistentes às doenças, e que apresentem boas características agronômicas, o que tem sido alcançado em programas de melhoramento convencional da bananeira (Silva et al., 1998, 2000), ou mediante o uso de biotecnologia como a duplicação cromossômica, induzida por agentes antimutogênicos (Roth, 1984).

A duplicação de cromossomos em plantas por meio da colchicina tem sido o procedimento mais utilizado (Doležel et al., 1994), entretanto, há poucos relatos a respeito de outros agentes antimutogênicos para a indução de poliploides de bananeira *in vitro* (Hamill et al., 1992; Duren et al., 1996; Ganga & Chezhiyan, 2002). 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 produzidos níveis de poliploidia ímpar, em geral triploides ou pentaploides. Indivíduos com poliploidia ímpar são normalmente estéreis (Guerra, 1989). Segundo Geoffriau et al. (1997), outros agentes antimutogênicos, como o amiprofós-metil (APM), têm

demonstrado maior especificidade para a tubulina de plantas *in vitro* do que a colchicina.

O APM é um tipo de herbicida amido fosfórico que interrompe diretamente a dinâmica do microtúbulo em células vegetais (Morejohn & Fosket, 1984) e são utilizados na agricultura em todo o mundo, pois são rapidamente degradados e apresentam pouco resíduo para o meio ambiente (Brahma & Umesh, 1985). Mesmo em baixas concentrações, impedem a polimerização dos microtúbulos inibindo a formação dos fusos cromáticos e induzindo a separação dos cromossomos metafásicos.

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). Segundo Bakry et al. (2007), a contagem de cromossomos pode ser útil para a identificação de plantas poliplóides quando a citometria de fluxo não está disponível.

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; Sari et al., 1999). Sendo 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). Dessa forma, a verificação da ploidia pode ser feita por meio da análise de citometria de fluxo (Doležel, 1991).

Sendo assim, objetivou-se, com este trabalho, verificar a concentração e o tempo de exposição à Colchicina e ao Amiprofós-metil na duplicação cromossômica de diplóides de bananeira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, situado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, utilizando bananeiras diplóides melhoradas desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical.

Como material vegetal, foram utilizados ápices caulinares de bananeira diplóide 1304-04 [Malaccensis x Madang (*Musa acuminata* spp. *banksii*)] e 8694-15 [0337-02 (Calcutta x Galeo) x SH32-63], sendo estes estabelecidos *in vitro*, multiplicados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) para proliferação de brotações, as quais foram submetidas aos tratamentos com os antimitóticos colchicina e amiprofós-metil.

Foram feitos dois experimentos, sendo um para cada antimitótico.

Experimento 1

A colchicina foi utilizada nas concentrações de 0 (tratamento controle); 1,25; 2,5 e 5,0 mM, em solução sob agitação (20 rpm), por períodos de 24 e 48 horas.

Após 24 e 48 horas, os ápices caulinares foram retirados do antimitótico e lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. Logo após, foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS e, posteriormente, mantidos em sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM 20 W), com irradiância média de 42 W m⁻², fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2 (quatro concentrações x dois períodos de exposição). Foram utilizadas 16 plantas por tratamento, ou seja, 4 repetições com 4 plantas.

Após 60 dias de permanência *in vitro*, foram avaliadas taxa de sobrevivência de plantas à colchicina e ao APM e análise de ploidia dos diplóides 1304-04 e 8694-15.

Experimento 2

O APM foi utilizado nas concentrações de 0 (tratamento controle); 40 e 80 μ M, em solução sob agitação (20 rpm), por períodos de 24 e 48 horas.

Após 24 e 48 horas, os ápices caulinares foram retirados do antimetabólico e lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. Logo após, foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS e, posteriormente, mantidos em sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM 20 W), com irradiância média de 42 W m⁻², fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2 (três concentrações x dois períodos de exposição). Foram utilizadas 16 plantas por tratamento, ou seja, 4 repetições com 4 plantas.

Após 60 dias de permanência *in vitro*, foram avaliadas taxa de sobrevivência de plantas à colchicina e ao APM e análise de ploidia dos diplóides 1304-04 e 8694-15.

4.1 Citometria de fluxo

As análises em citometria de fluxo foram realizadas Citômetro de Fluxo FacsCalibur™ 4 Cores da BD (Becton Dickinson), localizado no Laboratório de

Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG.

Aproximadamente 70 mg de tecido foliar jovem de bananeira, para cada amostra, foram fragmentadas com o auxílio de um bisturi em 1 mL de tampão de extração LB01 gelado para obtenção de suspensão nuclear (Doležel et al., 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze, para a retirada do excesso de fragmentos de folha, e a suspensão nuclear foi posteriormente filtrada em uma tela de náilon de 50 μm . À suspensão nuclear foram adicionadas 25 μL de iodeto de propídio (1 mg mL^{-1}) para corar os núcleos presentes na amostra e 25 μL de RNASE, sendo colocada à temperatura ambiente, no escuro até a análise. Para cada amostra foram analisados, pelo menos, 5 mil núcleos.

Os histogramas obtidos no citômetro foram analisados a partir dos softwares Cell Quest e WinMDI 2.9.

Para a análise de ploidia foi utilizado, como padrão de referência, o diplóide de bananeira 1304-04 e 8694-15, que não sofreram tratamento antimitótico, e a partir da posição do pico G1 formado no histograma foi possível estimar a ploidia do material analisado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da TABELA 1 e 2 mostram que os tratamentos com os antimitóticos colchicina e APM não foram tóxicos aos explantes nas concentrações utilizadas, uma vez que foi observada uma elevada taxa de sobrevivência ocorrida nos tratamentos. Mesmo assim, ainda houve a morte e contaminação de explantes.

TABELA 1 Proporção de explantes sobreviventes do diplóide 8694-15, tratados com colchicina em diferentes períodos de exposição, aos 60 dias da transferência.

Período de Exposição (horas)	Concentração de colchicina (mM)	Taxa de Sobrevivência (%)	Morte (%)	Contaminação (%)
24	Controle	100	-	-
24	1,25	100	-	-
24	2,5	100	-	-
24	5,0	75	25	-
48	Controle	93,75	-	6,25
48	1,25	100	-	-
48	2,5	81,25	18,75	-
48	5,0	75	25	-

TABELA 2 Proporção de explantes sobreviventes do diplóide 8694-15, tratados com APM em diferentes períodos de exposição, aos 60 dias da transferência.

Período de Exposição (horas)	Concentração de APM (μ M)	Taxa de Sobrevivência (%)	Morte (%)	Contaminação (%)
24	Controle	100	-	-
24	40	100	-	-
24	80	100	-	-
48	Controle	93,75	-	6,25

48	40	100	-	-
48	80	93,75	6,25	-

Na TABELA 1 verifica-se menor sobrevivência dos explantes em 5,0 mM de colchicina, tanto em 24 quanto 48 horas de exposição ao antimitótico, e isso se deve ao fato deste antimitótico ser tóxico às plantas em doses elevadas. Resultados semelhantes foram observados por Viehmannová et al. (2009), trabalhando com yacon (*Smallanthus sonchifolius*) que observaram maior taxa de sobrevivência dos explantes em concentrações de 5,0 mM de colchicina por 24 horas.

A colchicina é utilizada tradicionalmente na indução de poliploidia em plantas (Doležel et al., 1994) e age estritamente sobre células em divisão, inibindo o fuso acromático de modo que os cromossomos são paralisados na metáfase, o que conduz a célula a endomitoses sucessivas e ocasiona, assim, o aumento de seu nível de ploidia (Jensen, 1974). A colchicina como agente indutor de poliploidia em cultura de plantas *in vitro* tem suas limitações, pois em concentrações elevadas possui efeito tóxico, gerando grande mortalidade nas plantas tratadas (Hamill et al., 1992). Sendo assim, para cada espécie e tipo de material a ser tratado, deve ser determinada a concentração apropriada de colchicina, pois a tolerância a esse antimitótico varia entre as espécies (Wan et al., 1989; Abreu, 2002; Barbosa, 2004).

TABELA 3 Proporção de explantes sobreviventes para o diplóide 1304-04, tratados com colchicina em diferentes períodos de exposição, aos 60 dias da transferência.

Período de Exposição (horas)	Concentração de Colchicina (mM)	Taxa de Sobrevivência (%)	Morte (%)	Contaminação (%)
24	Controle	100	-	-
24	1,25	50	50	-
24	2,5	12,5	81,25	6,25
24	5,0	68,75	31,25	-
48	Controle	93,75	6,25	-
48	1,25	56,25	43,75	-
48	2,5	37,5	56,25	6,25
48	5,0	37,5	50	12,5

Na TABELA 3 verifica-se que plantas do diplóide 1304-04 que foram tratadas com colchicina apresentaram maior sobrevivência no período de exposição de 24 horas em relação a 48 horas, sendo que nessas ainda ocorre contaminação e morte nos tratamentos, fato que poderia reduzir a frequência de tetraplóides.

A sobrevivência dos explantes tratados com colchicina depende da concentração e duração do tratamento mas, em geral, altas concentrações e longos períodos de exposição aos agentes indutores diminuem a sobrevivência das plântulas (Thao et al., 2003).

A TABELA 4 mostra o efeito ocasionado pelo APM no diplóide 1304-04, verificando maior sobrevivência de plantas no período de exposição de 24

horas em comparação com 48 horas, devido a menor perda de plantas, seja por contaminação ou morte também observada neste período.

TABELA 4 Proporção de explantes sobreviventes do diplóide 1304-04, tratados com APM em diferentes períodos de exposição, aos 60 dias da transferência.

Período de Exposição (horas)	Concentração de APM (μM)	Taxa de Sobrevivência (%)	Morte (%)	Contaminação (%)
24	Controle	100	-	-
24	40	93,75	6,25	-
24	80	100	-	-
48	Controle	81,25	-	18,75
48	40	87,5	12,5	-
48	80	87,5	12,5	-

Neste trabalho verificou-se menor toxidez do APM em relação à colchicina, o que também foi relatado por Sri Ramulu et al. (1991) e Yahata et al. (2004), que observaram que o APM é mais eficiente na indução de duplicação de cromossomos e menos citotóxico que a colchicina. Assim, o APM pode ser considerado como o substituto eficiente para a colchicina (Sri Ramulu et al., 1991).

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* (Hamill et al., 1992; Duren et al., 1996; Ganga & Chezhiyan, 2002).

Do total de plantas analisadas nesse trabalho observaram-se 6,45% de plantas tetraplóides no diplóide 8694-15 e 2,78% no diplóide 1304-04, que foram tratadas com colchicina, 8,33% de plantas tetraplóides no diplóide 8694-15 e 8,11% no diplóide 1304-04, com o uso de APM. Desta forma melhor eficiência na indução de poliploidia pelo APM.

Analisando os diplóides 8694-15 e 1304-04 quanto a porcentagem de poliplóides obtidos, com relação à concentração do antimitótico, nota-se grande número de plantas tetraplóides (TABELAS 5, 6, 7 e 8).

TABELA 5 Análise de ploidia no diplóide 1304-04, tratados com APM em diferentes tempos de exposição.

Concentração/ Tempo	Nº de Plantas Analisadas	Ploidia		
		Diplóide	Mixoplóide	Tetraplóide
0 µM /24 h	19	19	-	-
40 µM /24 h	6	1	1	4
80 µM /24 h	8	1	7	-
0 µM /48 h	12	12	-	-
40 µM /48 h	12	1	11	-
80 µM /48 h	11	-	9	2

TABELA 6 Análise de ploidia no diplóide 8694-15, tratados com APM em diferentes tempos de exposição.

Concentração/ Tempo	Nº de Plantas Analisadas	Ploidia		
		Diplóide	Mixoplóide	Tetraplóide
0 µM /24 h	12	12	-	-
40 µM /24 h	11	-	11	-
80 µM /24 h	11	-	11	-
0 µM /48 h	7	7	-	-
40 µM /48 h	11	-	8	3
80 µM /48 h	14	-	11	3

TABELA 7 Análise de ploidia no diplóide 1304-04, tratados com colchicina em diferentes tempos de exposição.

Concentração/ Tempo	Nº de Plantas Analisadas	Ploidia		
		Diplóide	Mixoplóide	Tetraplóide
0 mM/24 h	13	13	-	-
1,25 mM/24 h	-	-	-	-
2,5 mM/24 h	1	-	1	-
5,0 mM/24 h	-	-	-	-
0 mM/48 h	16	16	-	-
1,25 mM/48 h	4	1	2	1
2,5 mM/48 h	-	-	-	-
5,0 mM/48 h	-	-	-	-

TABELA 8 Análise de ploidia no diplóide 8694-15, tratados com colchicina em diferentes tempos de exposição.

Concentração/ Tempo	Nº de Plantas Analisadas	Ploidia		
		Diplóide	Mixoplóide	Tetraplóide
0 mM/24h	16	16	-	-
1,25 mM/24h	15	8	6	1
2,5 mM/24h	17	-	17	-
5,0 mM/24h	7	-	7	-
0 mM/48h	17	17	-	-
1,25 mM/48h	11	1	8	2
2,5 mM/48h	4	-	2	2
5,0 mM/48h	2	-	1	1

Com o uso de APM obteve-se 66,67% de plantas tetraplóides no diplóide 1304-04 (TABELA 5), através de 40 μ M por 24 horas e 18,18% em 80 μ M por 48 horas no diplóide 8694-15 (TABELA 6), e usando 40 e 80 μ M por 48 horas, foram observados, respectivamente, 27,27 e 21,43% de plantas tetraplóides. Já para a colchicina, no diplóide 1304-04 (TABELA 7) apenas o tratamento 1,25 mM por 48 horas apresentou 25% de plantas tetraplóides e, no diplóide 8694-15 (TABELA 8), concentração de 1,25 mM por 24 horas resultou em 6,67% de plantas tetraplóides, 1,25 mM por 48 horas em 18,19%, 2,5 mM por 48 horas 50%, e na concentração de 5,0 mM por 48 horas produziram 50% tetraplóides, fato também relatado por Duren et al. (1996) que obtiveram 23,1% de autotetraplóides induzidos de *Musa acuminata* através de 5,0 mM de colchicina por 48h.

A indução de poliploidia em bananeira ainda é pouco relatada na literatura, embora Ganga & Chezhiyan (2002) também tenham avaliado concentrações de colchicina em bananeira com diferentes períodos de

tratamento, para obtenção de tetraplóides. A capacidade de duplicação cromossômica da substância foi de 13% de plantas tetraplóides.

É importante relatar neste trabalho que o número de plantas tetraplóides poderia ter sido ainda maior caso não ocorresse perda de alguns tratamentos, a exemplo do diplóide 1304-04 tratado com colchicina.

Na FIGURA 1 são apresentados os histogramas obtidos em citômetro de fluxo, mostrando a diferença que ocorre entre os níveis de ploidia (diplóide, mixoplóide e tetraplóide).

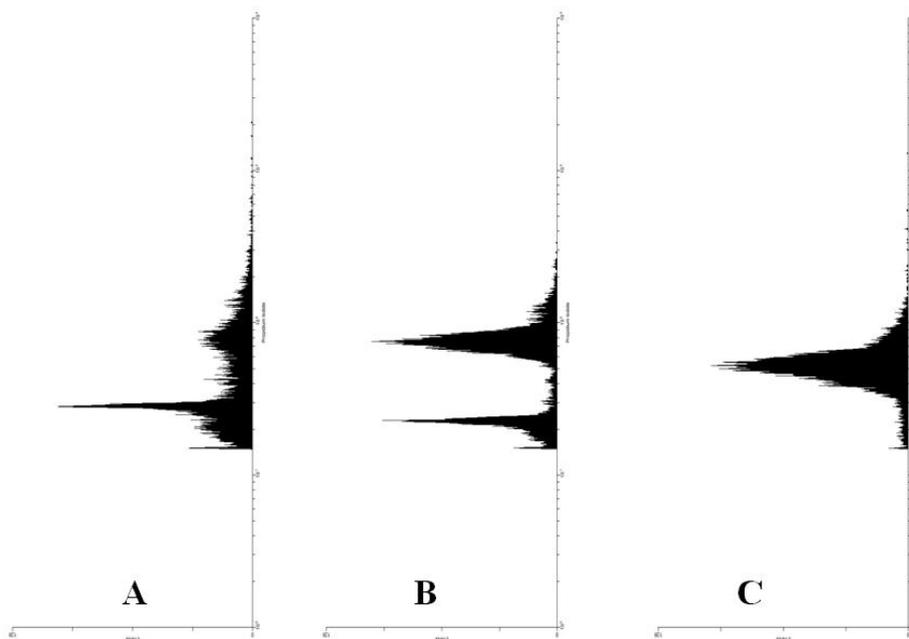


FIGURA 1 Níveis de Ploidia em Bananeira: A) Diplóide (2x); B) Mixoplóide (2x + 4x) e C) Tetraplóide (4x).

A FIGURA 1A representa o histograma de diplóide (2x) de bananeira, com a formação de dois picos (G1, pico maior e G2, pico menor), o pico G2 apresenta o dobro do DNA nuclear do pico G1. A FIGURA 1B é o mixoplóide (2x+4x), que representa um material com diferentes níveis de ploidia (tanto

células diplóides quanto tetraplóides) na mesma amostra, o que não é interessante em um programa de melhoramento genético devido ao fato de que as células diplóides se multiplicam em taxa superiores às células tetraplóides. Na FIGURA 1C ocorre a formação de apenas um pico justamente na posição em que é formado o pico G2 do material diplóide, correspondendo assim a um material tetraplóide (4x).

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

O problema da utilização dos agentes antimitóticos resulta do fato de que essas substâncias só atuam 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 (variação no número cromossômico). Assim sendo, a escolha de cultivares a serem utilizadas, bem como a variação da concentração, tempo de exposição e formas de aplicação desses antimitóticos tornam-se requisitos indispensáveis em qualquer programa de melhoramento genético visando à duplicação cromossômica.

Vakili (1967) utilizou colchicina para induzir poliploidia em bananeira e observou que o antimitótico aumentou a mortalidade, retardou o crescimento das plantas e induziu a duplicação do número cromossômico. Segundo o autor, as plantas tetraplóides ficaram mais altas e mais robustas que as diplóides, porém, com crescimento mais lento, folhas mais inclinadas e sistema radicular menos desenvolvido.

Com isso, novos trabalhos devem ser conduzidos para definir realmente qual antimitótico e concentração a utilizar para promover a poliploidização em bananeira.

6 CONCLUSÕES

O APM apresenta menor efeito tóxico em relação à colchicina; O diplóide 8694-15 é adequado para uso na duplicação cromossômica; 40 μ M de APM por 24 horas possibilita a obtenção de plantas tetraplóides no diplóide 1304-04 e 2,5 mM de colchicina por 48 horas resulta em plantas tetraplóides no diplóide 8694-15.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: Instituto FNP, 2009. 502 p.

BAKRY, F.; LA REBERDIERE, N. P. de; PICHOT, S.; JENNY, C. Colchicine induces doubled-diploids in diploid banana clones. **Fruits**, Paris, v. 62, n. 1, p. 3-12, Jan./Feb. 2007.

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

BRAHMA, B. P.; UMESH, K. S. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide Fensulfothion. **Cytobios**, Cambridge, v. 42, p. 147-215, 1985.

CASTILLO, R. T. Nuevos departamentos de recursos fitogenéticos en Ecuador. **Diversity**, Basel, v. 7, n. 1/2, p. 37-39, 1991.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 2, n. 4, p. 143-154, Sept. 1991.

DOLEŽEL, J.; LUCRETTI, S.; SCHUBERT, I. Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 13, n. 3, p. 275-309, May 1994.

DOLEŽEL, J.; LYSÁK, M. A.; HOUWE, van den I.; DOLEŽELOVÁ, M.; ROUX, N. Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. **Infomusa**, Montpellier, v. 6, n. 1, p. 6-9, June 1997.

DONATO, S. L. R.; SILVA, S. de O.; LUCCA FILHO, O. A.; LIMA, M. B.; DOMINGUES, H.; ALVES, J. da S. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.) em dois ciclos de produção no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 139-144, maio 2006.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides, 1993. v. 1, 314 p.

DUREN, M. van; MORPURGO, R.; DOLEŽEL, 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, Jan. 1996.

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

GEOFFRIAU, E.; KAHANE, R.; BELLAMY, C.; RANCILLAC, M. Ploidy stability and in vitro chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**, Limerick, v. 122, n. 2, p. 201-208, Feb. 1997.

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

HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DODD, W. A. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Sidney, v. 40, n. 6, p. 887-896, Dec. 1992.

JENSEN, C. J. Chromosome doubling techniques in haploids. In: _____. **Haploids in higher plants: advances and potentials**. Guelph: University of Guelph, 1974. p. 153-192.

MOREJOHN, L. C.; FOSKET, D. E. Inhibition of microtubule polymerization in vitro by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methyl. **Science**, Washington, v. 224, n. 4651, p. 874-876, May 1984.

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

ROTH, P. S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. 1984. 79 p. Dissertação (Mestrado em Genética de Plantas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “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.

SILVA, S. de O. e; FLORES, J. C. O.; LIMA NETO, F. P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1567-1574, nov. 2002.

SILVA, S. de O. e; GASPAROTTO, L.; MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M.; FERREIRA, C. F.; RAMOS, M. M.; JESUS, O. N. de. **Programa de melhoramento de bananeira no Brasil**: resultados recentes. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 36 p. (Documentos, 123).

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

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

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, ago. 2004.

SRI RAMULU, K.; VERHOEVEN, H. A.; DIJKHUIS, P. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl, and colchicines in potato. **Protoplasma**, New York, v. 160, n. 2/3, p. 65-73, June 1991.

THAO, N. T. P.; URESHINO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, n. 1, p. 19-25, Jan. 2003.

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

VAKILI, N. G. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 54, n. 1, p. 24-36, Jan. 1967.

VIEHMANNOVÁ, I.; CUSIMAMANI, E. F.; BECHYNE, M.; VYVADILOVÁ, M.; GREPLOVA, M. In vitro induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 21-25, Apr. 2009.

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. 6, p. 889-892, June 1989.

YAHATA, S.; SATO, S.; OHARA, H.; MATSUI, H. Induction of tetraploid in loquat with amiprofos-methyl and colchicine. **Horticultural Research**, Edinburgh, v. 3, n. 4, p. 339-344, 2004.