



**FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA**

**RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE  
BANANEIRA SUBMETIDA À  
POLIPLOIDIZAÇÃO**

**LAVRAS – MG  
2010**

**FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA**

**RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE BANANEIRA SUBMETIDA À  
POLIPLOIDIZAÇÃO**

Tese 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 Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

**LAVRAS – MG  
2010**

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

Costa, Frederico Henrique da Silva.

Respostas morfo genéticas de bananeira submetida à poliploidização / Frederico Henrique da Silva Costa. – Lavras : UFLA, 2010.

134 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. *Musa* sp. 2. Biotecnologia. 3. Melhoramento vegetal. 4. Cultura de tecidos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

**FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA**

**RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE BANANEIRA SUBMETIDA À  
POLIPLOIDIZAÇÃO**

Tese 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 Doutor.

APROVADA em 19 de Março de 2010

Dr. Jonny E. Scherwinski-Pereira

Embrapa Cenargen

Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

Pesquisador do CNPq

Dr. José Marcello S. de Campos

UFJF

Prof. José Darlan Ramos

UFLA

Dr Moacir Pasqual

Orientador

**LAVRAS - MG  
2010**

*Ao Deus, criador do universo e mantenedor da vida, por me instruir, sustentar e capacitar frente às adversidades, bem como por dar-me sabedoria para aproveitar as oportunidades.*

*Ao grande amigo pesquisador Jonny Everson Scherwinski-Pereira, por sempre valorizar meu trabalho e esforços e por dar-me oportunidades de aprendizado e ascensão profissional, estas que fizeram valer a pena o caminho percorrido e minimizaram as dificuldades e ansiedades decorrentes da ausência de meus familiares e amigos.*

*Aos meus avós maternos, Dona Maria e seu Geraldo, e paternos, Maria da Conceição – Dona Concebida e Francisco. Destes, sem dúvida, herdei características íntegras como bom caráter, dedicação, compromisso com o trabalho, perseverança e coragem. À minha mãe, Maria Lúcia, e minhas irmãs, Francicléia e Francianne, por sempre darem apoio para que eu pudesse concretizar o sonho de tornar-me Doutor, tão somente pela graça e vontade de Deus; e por dedicação e competência.*

**DEDICO E OFEREÇO**

## **BIOGRAFIA**

FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA, filho de Francisco Lino Lima da Costa (falecido) e Maria Lúcia da Silva Costa, nasceu em 06 de setembro de 1982, no município de Tucuruí, Estado do Pará. Aos primeiros anos de vida se mudou para o Estado do Acre, onde foi educado e iniciou seus estudos, desde a alfabetização até a formação de bacharel em Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal do Acre (Ufac), em janeiro de 2005.

No decorrer de sua formação acadêmica sempre esteve envolvido em atividades de ensino, pesquisa e extensão, com dedicação exclusiva na busca do conhecimento científico e a prestar contribuições à sociedade brasileira. Suas atividades científicas se iniciaram no ano de 2000 junto ao Programa de Educação Tutorial (PET), antigo Programa Especial de Treinamento, inicialmente como voluntário e posteriormente como bolsista. Por conseguinte, no ano de 2001, ingressou no Programa de Iniciação Científica (PIBIC) na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Acre), área de concentração Fitossanidade/Fitopatologia. De 2002-2004, na Universidade Federal do Acre, foi bolsista PIBIC e desenvolveu pesquisas na área de solos/Caracterização, Classificação e Fertilidade. Ademais, desenvolveu atividades de ensino no IEL, Rio Branco, Acre.

A pesquisa na área de Cultura de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais se iniciou em abril de 2004, na Embrapa Acre, sob a orientação do pesquisador Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, fato que culminou com o trabalho de conclusão de curso em janeiro de 2005. Durante o referido período, atuou como estagiário não remunerado e realizou pesquisas sobre micropropagação da bananeira, abacaxizeiro e algumas espécies de palmeiras (Murmuru e dendezeiro), além de trabalhos sobre o cultivo *in vitro* de orquídeas.

De fato, a oportunidade de trabalhar com o Dr. Jonny permitiu que alcançasse novos horizontes e o capacitou para o que hoje se tornou. Nesse mesmo período, desenvolveu também atividades de pesquisa e extensão junto à Organização não governamental Pesacre – Centro de Pesquisa e Extensão em Sistemas Agroflorestais do Acre. Também participou de atividades de campo e análises laboratoriais do projeto Geosedintana, liderado pelo Prof. Dr. Marcondes Lima da Costa do Centro de Geociências da Universidade Federal do Pará (Ufpa), tendo envolvimento com a cultura do abacaxizeiro “Gigante”, no município de Tarauacá, Acre.

Em Março de 2005, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (área de concentração Fitotecnia/Cultura de tecidos vegetais) na Universidade Federal de Lavras, obtendo o título de Mestre em 23 fevereiro de 2007. Em março de 2007, iniciou o Curso de Doutorado (área de concentração Fitotecnia/Cultura de tecidos vegetais) pela mesma Instituição em parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (BA), com conclusão em 19 de Março de 2010. Ministrou diversas palestras em disciplinas do curso de graduação/agronomia (Ufla), como também no curso de Especialização Lato-Sensu Cultura de Tecidos Vegetais (Ufla). Toda a pós-graduação foi realizada com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

É autor de dezenas de artigos científicos, autor e coautor de diversos capítulos de livro (Editora Embrapa), dentre os quais se destacam *Conservação e criopreservação in vitro de germoplasma vegetal: estratégias, princípios e aplicações* (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010); *Micropropagação de Bananeira Visando à Produção Massal de Mudanças de Elevado Padrão Genético e Fitossanitário* (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2009); *Propagação Clonal in Vitro de Abacaxizeiros: Metodologias e Aplicações para a Obtenção de Mudanças em Larga Escala* (COSTA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009), entre outros.

## **AGRADECIMENTOS**

De início agradeço a Deus, por ser fiel e companheiro de todos os momentos. Por dar-me saúde, sabedoria, serenidade, força e coragem para superar as dificuldades e vencer os desafios.

Devo ainda agradecimentos a inúmeras pessoas que, em momentos distintos e importantes, prestaram colaboração para a concretização do presente trabalho. Porém, para isso, seriam necessárias dezenas de páginas e, por essa razão, aqui vão alguns que merecem ser destacados:

Ao meu orientador Prof. Moacir Pasqual, cuja simplicidade, alegria, bom humor, serenidade e constante sucesso são admiráveis. Sou grato, principalmente, pela oportunidade em realizar a pós-graduação e por permitir que eu fosse desenvolver o presente trabalho na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Obrigado pela confiança, determinante à conclusão dessa etapa da minha vida;

Ao Pesquisador da Embrapa Jonny Everson Scherwinski-Pereira, grande amigo e o único orientador que sempre me incentivou, reconheceu e valorizou meus esforços acadêmicos. Muito obrigado pela constante orientação, mesmo que não oficialmente; pelo inigualável conhecimento e conselhos pessoais repassados; pelas oportunidades; sobretudo por sua franqueza e por sempre acreditar e confiar no meu potencial.

Ao meu coorientador Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, pessoa incomparável na maneira de ser, agir e conduzir as pesquisas científicas. Sou grato por tudo que fez e admiro sua competência, profissionalismo e comprometimento com a pesquisa científica, sobretudo, por buscar soluções para os problemas das sociedades agrícola e urbana, estas que degustam e se nutrem com fruta tão bela, a banana e seus múltiplos derivados.

O Dr. Sebastião não mediu esforços, tão menos recursos financeiro e pessoal para o satisfatório andamento do presente trabalho. O convite do Sebastião, para realizar o presente trabalho na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, foi uma grande oportunidade e permitiu o compartilhamento e aprendizado de valiosos conhecimentos na área de Melhoramento Genético de Plantas, inerentes única e exclusivamente ao Dr. Sebastião. Obrigado por sua confiança, prestatividade e, principalmente por sua amizade e companheirismo, bem como pelas “broncas”, “piadas” e “discussões”;

A minha querida avó, Maria da Conceição (Dona Concebida), pelo carinho, dedicação, confiança e oportunidades, meu eterno amor e gratidão;

A minha mãe, Maria Lúcia, eterna guerreira e vencedora, minhas irmãs Francianne e Francicléia e meus sobrinhos Pedro Davi e Silvio Cláudio, as maiores razões e incentivos para que eu buscasse melhores condições de vida. Amo vocês!

Sou grato, em especial, às pessoas que contribuíram de forma positiva para minha formação e qualificação acadêmica, a saber: Dr. Edson Ferreira de Carvalho (Professor Associado da Universidade Federal de Viçosa, MG), Dra. Maria de Jesus Barbosa Cavalcante (Embrapa Acre), Dr. José de Ribamar Torres da Silva e MSc. Manuel Alves Ribeiro Neto (Ufac), Equipe Pesacre, Dr. João Alencar de Souza (Embrapa Agroindústria Tropical), Dr. Edson Perito Amorim, Dr. Hermínio Souza Rocha; “Doutores no saber” Honorato Pereira da Silva Neto e Bizunga (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical) e Vantuil e Claret (Laboratório de Cultura de Tecidos-Ufla).

Ao meu tio Maronilson (*in memorian*), pelos ensinamentos, convívio e coragem para enfrentar as dificuldades;

Aos meus padrinhos e também pais, José Alexandre de Oliveira, tio Neto, e Maria Lilia Costa de Oliveira, pela educação de berço, cuidados, carinho e amor, e, sobretudo, pelas palavras e conversas de incentivo e apoio nos momentos difíceis e de vitórias, minha eterna gratidão;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ou melhor, a todos os contribuintes – Sociedade Brasileira, pela constante concessão de bolsa de estudo durante minha graduação e Pós-graduação;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), instituição de valor e potencial inestimáveis, grande responsável pelos conhecimentos adquiridos e realização das pesquisas;

À Universidade Federal de Lavras, instituição de excelência na área de Ciências Agrárias e áreas correlatas;

Ao tio, eminente professor e pesquisador, Marcondes Lima da Costa, Geólogo de formação, mas também “Agrônomo”, “Biólogo” e “Engenheiro Florestal” pelos conhecimentos multidisciplinares adquiridos curiosa e sabiamente. O constante sucesso do tio Marcondes no progresso das ciências me encorajou e continuará a encorajar-me em busca da excelência profissional e pessoal. Você é um exemplo de superação profissional!

À Cíntia Paula Feitosa, grande amiga e companheira, pessoa de caráter íntegro com a qual pude compartilhar momentos peculiares e únicos da minha vida. Obrigado Cíntia, você não somente trouxe paz, mas, sobretudo, foi responsável por grandes mudanças positivas na minha vida. As características peculiares de Cíntia, especialmente a sabedoria e o bom coração, foram imprescindíveis à construção de um convívio de paz, amor e gratidão, cujos frutos serão sempre prósperos e não-sazonais. Sou grato pelo amor, carinho, amizade e companheirismo dedicados a mim, em todos os momentos.

Agradeço também à família Feitosa, representada aqui pelo Paulo e Carmem, por Welder e Vitória, pela confiança, compreensão e amizade.

Ao amigo Juraci Cortes Costa (o “Fii”) e família, Débora, Jon e Maria Celilia; pela amizade sincera e constante companheirismo nos momentos difíceis e alegres. Valeu “Fii”!

Ao Honorato (Hono), pela valiosa contribuição prestada na condução dos experimentos de poliploidização, bem como pela amizade e conhecimentos compartilhados;

À Dona Tânia (coligada) e Lucymeire, pessoas muito importantes e que fizeram diferença durante minha estadia em Cruz das Almas-BA;

Ao pesquisador Dr. Edson Perito Amorim, pelo apoio, presteza e compreensão essenciais às análises de citometria de fluxo na Universidade Federal de Fora (UFJF). Obrigado também por facilitar o acesso, nos finais de semana e feriados, ao laboratório de Biotecnologia e dependências da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, sem o qual a concretização da presente pesquisa não seria possível;

Ao professor José Marcello Salabert de Campos (UFJF) pela dedicação, disponibilidade e apoio imprescindíveis à realização das análises de citometria de fluxo. Obrigado também pela amizade, receptividade, conhecimentos e conselhos compartilhados;

Aos pesquisadores e colegas Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves e Maurício Antônio Coelho Filho pelo auxílio nas avaliações e análises relativas ao desenvolvimento da técnica de pré-seleção baseada na massa específica do disco foliar;

À ‘família’ do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFLA, na pessoa de Vantuil, Claret e Antônio Carlos, pessoas maravilhosas e profissionais altamente capacitados, dedicados e prestativos, meu muito obrigado. Vocês são grandes parceiros!

Aos meus grandes amigos e irmãos de coração, Carlos Gibran e Janderson Nascimento, que embora não estivessem fisicamente presentes sempre se fizeram próximos com suas sábias palavras de conforto durante os momentos difíceis e alegres;

Aos amigos de todos os momentos, Francianne Tavares Braga (Fran), Filipe Almendagna Rodrigues (Batatinha), Claudinéia Nunes (Néia), Dalilha, Aparecida (Cida), Lucrécio (Lupa), Fábio Macedo, Pedro (Pedroca), Daniel Rufino (Dandan). Vocês fazem diferença!

Às secretárias da pós-graduação em Fitotecnia, Marli e Neuzi, em especial à Marli, pelo apoio, prestatividade, amizade e momentos alegres;

À 'família' do Laboratório de Práticas Culturais da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, representada aqui pelo seu Bizunga, Sinésio, Paulo Laesso, Taciano (Pastel) e Daniel (Malhado), cujos esforços foram preponderantes ao sucesso do presente trabalho, em todas as suas fases, desde a coleta de material em campo até a aclimatização das plantas. Uma equipe eficiente é formada de pessoas como vocês, eficazes e prestativos.

As estudantes de agronomia da UFRB, Leila Cristina Lins e Thaina, por perseverar juntamente comigo nas diversas atividades de avaliação e manutenção de aproximadamente 13.000 plantas produzidas. O esforço vale a pena!

Aos amigos Leônidas, Célia e Julia, por me receber de braços e corações abertos em sua família, em Cruz das Almas-BA; pelo apoio, amizade, presteza e convívio. Meu muito obrigado.

Aos amigos Tom, Eneide, Natalia (Naty), Hernani, Dilma, Marco Aurélio, Sandra, Lucas, Pedro, Camila, Edivaldo, Wendel, Wainer, que tornaram dias pacatos em momentos agradáveis e divertidos, os quais sempre serão lembrados;

Ao pesquisador Dr. Miguel Angel Dita Rodrigues pela amizade, apoio e oportunidades durante minha estadia em Cruz das Almas-BA;

À Companhia de Promoção Agrícola, Biofábrica de Cruz das Almas-BA, na pessoa do gerente administrativo, Geraldo Fernandes (Fernando), por ceder toda a infraestrutura necessária à condução dos experimentos. Valeu amigo!

Aos funcionários da Empresa Campo Biotecnologia e mantenedores de valiosos conhecimentos: Wando (Dr. “Uréia”), Jefinho, Dominginhos e Joel, pelo constante apoio e valiosos conhecimentos partilhados.

Às amigas e companheiras de profissão Luciene e Josiane (Josi) da Florcampo, pela amizade, momentos de conversa e distração, bem como pela ajuda prestada na escolha de flores e plantas ornamentais para presentear o meu amor;

Ao senhor Eral, proprietário do Magazine Campo e Cidade, em Conceição do Jacuípe-BA, pela prestatividade e bons preços nos insumos adquiridos, essenciais aos trabalhos de aclimatização;

À amiga Moema, por sua amizade e presteza, e ao colega Everton Hilo, Sandra Santa Rosa e demais estagiários do laboratório de Biotecnologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical pela convivência;

Ao pesquisador Jaroslav Dolezel, pelo envio de publicações científicas que contribuíram de forma positiva para o engrandecimento e embasamento do presente trabalho;

À Dona Gizélia e seu Raimundo, pela confiança, oportunidade e estadia na fase final, mas não menos importante do presente trabalho;

Às amigas Graziane (Grazi) e Juci, pela amizade, companheirismo e bons momentos;

Ao Dr. Carlos Alberto da Silva Lédo, pela prestatividade e atenção na área de estatística experimental;

À Rute Lea Tosta, pelas contribuições no decorrer de seu estágio na Embrapa.

As estudantes de mestrado Livia, Valquiria e demais estagiários que ajudaram na coleta das amostras de citometria de fluxo;

Ao pesquisador Dr. Antônio da Silva Souza pelo bom convívio e presteza; e à Dra. Fernanda Vidigial Duarte Souza, por sua “compreensão” em face da necessidade de utilizar as instalações do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa CNPMF.

À Sociedade Brasileira, que embora possa desconhecer seu importante papel na formação de profissionais bem qualificados, contribui e continuará a contribuir para a realização de pesquisas científicas, a exemplo do presente trabalho, meu agradecimento mais sincero.

A todos os amigos, colegas e simpatizantes que reconheceram meus esforços e me homenagearam no dia 12 de março de 2010, no auditório da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA;

Como reflexo da colaboração, dedicação e incentivo das pessoas citadas acima é que o presente trabalho foi conduzido com sucesso e, sem dúvida, bons frutos são colhidos hoje e futuramente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudos aos autores e financiamento de projetos. À Campo Biotecnologia por ceder a infraestrutura para enraizamento sob luz natural e aclimatização das plantas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas aos autores e apoio financeiro às pesquisas.

**MUITO OBRIGADO!**

*'Irmãos, quanto a mim, não julgo haver alcançado a perfeição; mas uma coisa faço: esquecendo-me das coisas que para trás ficam e avançando para as que diante de mim estão, prossigo para o alvo, para o prêmio da soberana vocação de Deus'*

(Filipenses 3:13-14)

## RESUMO GERAL

As principais cultivares de banana em uso são triploides e suscetíveis à importantes pragas como a Sigatoka-negra, que pode causar até 100% de perdas. A doença é de controle difícil, caro e inviável para os pequenos produtores. Uma alternativa viável para contornar esse problema é a criação de novas variedades triploides resistentes a essa doença e com boas características de fruto. Todavia, o melhoramento convencional não tem alcançado sucesso na obtenção de novas variedades devido à esterilidade observada em alguns genótipos triploides. Assim, a poliploidização *in vitro* passa a constituir uma importante estratégia de melhoramento genético não convencional. Esse trabalho teve como objetivos: 1) Desenvolver uma metodologia de indução *in vitro* de autotetraploides de genótipos diplóides *Musa acuminata* (AA) a partir de ápices caulinares; 2) Estudar as respostas morfofisiológicas *in vitro* dos ápices caulinares submetidos ao tratamento com colchicina e orizalina; 3) Desenvolver uma técnica eficiente e prática para identificar poliplóides com base na massa específica de discos foliares de plantas aclimatizadas; 4) Identificar por citometria de fluxo os poliplóides putativos pré-selecionados e correlacionar o resultado obtido com os resultados da espessura foliar. O trabalho foi realizado na Embrapa Cruz das Almas. Foram usados os diplóides NBA-14, Tong Dog Mak e Malbut. Pode-se concluir que tanto a colchicina quanto a orizalina, em concentração e tempo de exposição, adequados, podem ser usadas na poliploidização de bananeira. A colchicina apresenta maior fitotoxicidade, do que a orizalina, no entanto, promove maior variabilidade morfológica nas plantas regeneradas e pré-selecionadas como poliplóides putativos. É possível pré-selecionar poliplóides mediante caracteres morfológicos. A utilização da massa específica de discos foliares permite distinguir diplóides de tetraploides, sendo útil também na pré-seleção de poliplóides putativos. As plantas poliplóides identificadas por meio da massa específica de discos foliares foram confirmadas pela citometria de fluxo.

Palavras-chave: *Musa acuminata*. Biotecnologia. Duplicação de cromossomos. Massa específica foliar. Citometria de fluxo.

## GENERAL ABSTRACT

Most banana cultivars used are triploids and susceptible to important diseases such as black Sigatoka which can lead to 100% of losses. Black Sigatoka control is difficult, costly and unviable to small producers. A viable alternative to overcome this setback is the development of new triploid varieties resistant to this disease and presenting good fruit characteristics. However, conventional breeding has not been very successful in the development of new varieties due to sterility observed in some triploids. Therefore, *in vitro* polyploidization becomes an important non-conventional genetic breeding strategy. The objectives of the present work are: 1) Develop a new *in vitro* autotetraploid induction methodology from diploid (AA) *Musa acuminata* shoot apex; 2) Study the *in vitro* morphophysiological responses of the shoot apex submitted to colchicine and oryzaline treatments; 3) Develop an efficient and practical technique based on the specific mass of leaf disks of acclimatized plants; 4) Identify, via flow cytometry, putative pre-selected polyploids and correlate to results obtained with the results regarding leaf thickness. The work was carried out at Embrapa located in Cruz das Almas. The following diploids were used: NBA-14, Tong Dog Mak and Malbut. It is concluded that colchicine as well as oryzaline, in adequate concentration and time of exposure, can be used in banana polyploidization. Colchicine presents greater phytotoxicity than oryzaline; however, it promotes greater morphologic variability in regenerated and pre-selected plants as putative polyploids. It is possible to pre-select polyploids by morphologic characteristics. The use of the specific mass of leaf disks enables to distinguish diploids from tetraploids being also useful in the pre-selection of putative polyploids. The polyploid plants identified using the specific mass of leaf disks were confirmed by flow cytometry.

Keywords: *Musa acuminata*. Biotechnology. Chromosome duplication. Specific leaf mass. Flow cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema das etapas de obtenção e uso de autotetraplóides no melhoramento genético de cultivares estéreis de bananeira mediante poliploidização <i>in vitro</i> com antimitóticos.....	58
Figura 2	Etapas do processo de indução de poliploidização em ápices caulinares de diplóides promissores de bananeira.....	60
Figura 3	Etapas do processo de poliploidização de bananeira. (a) Brotações axilares (genótipo NBA-14) utilizada para obtenção de ápices caulinares; (b) tratamento dos antimitóticos sob agitação; (c) explantes tratados com colchicina, no momento do enxágue em água esterilizada e (d) gemas recém-transferidas para meio de cultura semissólido; (e) primeiro subcultivo após a aplicação dos tratamentos; (f) manuseio dos explantes para retirada das partes oxidadas e subdivisão dos brotos formados.....	88
Figura 4	Equações de regressão para a sobrevivência e número de brotações, por genótipo diplóide, em função das concentrações de colchicina e do tempo de exposição (24 horas e 48 horas). Média de seis repetições. ** Significativos a 1% de probabilidade. Cruz das Almas-BA, 2010.....	91
Figura 5	Efeitos morfofisiológicos <i>in vitro</i> da indução de autotetraplóides no genótipo NBA-14 pelo uso de colchicina, aos 30 dias após o tratamento (primeiro subcultivo). Cruz das Almas-BA, 2010. ....	92

Figura 6	Efeitos morfofisiológicos <i>in vitro</i> da indução de autotetraplóides no genótipo Malbut pelo uso de colchicina, aos 30 dias do primeiro subcultivo. Cruz das Almas, 2010. ....	94
Figura 7	Efeitos morfofisiológicos <i>in vitro</i> da indução de autotetraplóides no genótipo Malbut pelo uso de colchicina, aos 30 dias após o tratamento. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	95
Figura 8	Equações de regressão para a sobrevivência e o número médio de brotações, por genótipo diplóide (TDM e NBA-14), em função das concentrações de orizalina e do tempo de exposição (3 dias e 7 dias). Média de seis repetições. * e ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	97
Figura 9	Efeitos morfofisiológicos <i>in vitro</i> da indução de autotetraplóides no genótipo Tong Dok Mak pelo uso orizalina, aos 30 dias após o tratamento. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	98
Figura 10	Aspecto geral das brotações formadas no genótipo NBA-14 após 35 dias da indução de poliploidização com orizalina. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	99
Figura 11	Aspecto geral das brotações do genótipo NBA-14 tratadas com colchicina e regeneradas, aos 40 dias do terceiro subcultivo após a indução de poliploidização. ....	101

Figura 12(a)	Vista geral de parte do material produzido ao final do terceiro subcultivo após a indução de poliploidização; (b e c) Visão externa e interna da estufa de enraizamento sob luz natural utilizada; (d-f) Aspecto das brotações em meio de alongamento e enraizamento, genótipo NBA-14 (d) e Malbut (e-f); (g-i) Plantas em processo de aclimatização em telado. Cruz das Almas-BA, 2010.....	102
Figura 13 (a)	Aspecto geral das folhas de bananeiras utilizadas para obtenção de discos foliares; (b) Detalhe da região mediana da folha utilizada para retirada dos discos foliares; (c) Planta do diplóide Malbut evidenciando a filotaxia das folhas na planta. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	116
Figura 14	Aspecto geral da etapa de aclimatização das plantas de bananeiras submetidas à poliploidização <i>in vitro</i> . Cruz das Almas-BA, 2010. ....	119
Figura 15	Variações somaclonais em plantas de bananeira oriundas da indução de poliploidização com antimitóticos. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	121
Figura 16	Plantas poliplóides putativos pré-selecionadas com base em caracteres morfológicos. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	122
Figura 17	Plantas poliplóides putativos pré-selecionadas com base em caracteres morfológicos. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	123
Figura 18	Alterações na pigmentação (a) e morfologia (b) em plantas poliplóides putativos pré-selecionadas. Cruz das Almas-BA, 2010. ....	124

Figura 19	Histogramas de uma planta diplóide (controle) e vários poliplóides de <i>Musa acuminata</i> oriundos da indução da duplicação de cromossomos <i>in vitro</i> . Cruz das Almas-BA, 2010.....	130
Figura 20	Alterações na pigmentação (a) e morfologia (b) em plantas poliplóides putativos pré-selecionadas. Cruz das Almas-BA, 2010.....	132

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Aplicações da poliploidização no melhoramento genético não-convencional de plantas.....	47
Quadro 2	Aplicações da poliploidização no melhoramento genético de bananeira.....	53

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Valores médios para massa fresca (PF) e seca (PS), em miligramas (mg); massa específica do disco foliar (base na massa fresca) (MED\_MF) e seca (MED\_MS), em miligramas por centímetro quadrado ( $\text{mg cm}^{-2}$ ); e umidade do disco foliar ( $\text{L m}^{-2}$ ) de plantas de bananeira, em função da ploidia. Cruz das Almas-BA, 2010. .... 125
- Tabela 2 Valores médios para massa fresca (PF) e seca (PS), em miligramas (mg); massa específica do disco foliar (base na massa fresca) (MED\_MF) e seca (MED\_MS), em miligramas por centímetro quadrado ( $\text{mg cm}^{-2}$ ); e umidade do disco foliar ( $\text{L m}^{-2}$ ) de plantas de bananeira, em função da ploidia. Cruz das Almas-BA, 2010. .... 126
- Tabela 3 Valores médios para massa fresca (PF) e seca (PS), em miligramas (mg); massa específica do disco foliar (base na massa fresca) (MED\_MF) e seca (MED\_MS), em miligramas por centímetro quadrado ( $\text{mg cm}^{-2}$ ); e umidade do disco foliar ( $\text{L m}^{-2}$ ) de plantas de bananeira, em função da ploidia. Cruz das Almas-BA, 2010. .... 127
- Tabela 4 Ploidia, quantidade relativa de DNA nuclear, valores médios para massa fresca e seca (mg) e massa específica (MED,  $\text{mg cm}^{-2}$ ) de discos foliares de poliplóides putativos de bananeira e diplóide (não tratado com antimitótico). Cruz das Almas-BA, 2010. .... 129

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1: Introdução geral</b> .....	25
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
	<b>CAPÍTULO 2: Referencial teórico</b> .....	38
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	43
<b>2.1</b>	<b>Importância da poliploidia</b> .....	43
<b>2.2</b>	<b>Origem dos poliplóides e suas consequências no melhoramento genético de plantas</b> .....	44
<b>2.2.1</b>	<b>Poliploidização espontânea</b> .....	45
<b>2.2.2</b>	<b>Poliploidização induzida ou artificial</b> .....	45
<b>2.3</b>	<b>Mecanismos de ação dos antimitóticos e seu papel na poliploidização</b> .....	49
<b>2.4</b>	<b>Poliploidização no melhoramento genético de bananeira</b> .....	51
<b>2.4.1</b>	<b>Etapas do processo de indução de poliplóides <i>in vitro</i></b> .....	59
<b>2.4.2</b>	<b>Pré-seleção e identificação dos autotetraplóides putativos</b> .....	61
<b>2.4.3</b>	<b>Citometria de fluxo</b> .....	63
<b>2.4.4</b>	<b>Contagem de cromossomos</b> .....	65
<b>2.4.5</b>	<b>Utilização dos autotetraplóides na geração de triplóides secundários</b> .....	68
<b>2.5</b>	<b>Limitações e desafios no uso da poliploidização no melhoramento de bananeira</b> .....	69
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
	<b>CAPÍTULO 3: Indução de autotetraplóides em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos <i>in vitro</i></b> ....	80

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	83
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	86
2.1	<b>Material vegetal</b> .....	86
2.2	<b>Obtenção dos ápices caulinares</b> .....	86
2.3	<b>Tratamento dos ápices caulinares com colchicina e orizalina</b> .....	86
2.4	<b>Avaliações morfogênicas e fisiológicas <i>in vitro</i></b> .....	89
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	90
3.1	<b>Respostas morfofisiológicas dos ápices caulinares tratados com colchicina</b> .....	90
3.2	<b>Respostas morfofisiológicas dos ápices caulinares tratados com orizalina</b> .....	96
3.3	<b>Comparação dos efeitos da indução de poliploidização com colchicina e orizalina em ápices caulinares</b> .....	100
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	104
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	105
	<b>CAPÍTULO 4: Técnicas de pré-seleção e identificação de poliplóides de bananeira oriundos da poliploidização <i>in vitro</i></b> .....	107
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	110
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	113
2.2	<b>Adequação e uso da massa específica de discos foliares na diferenciação de diplóides e poliplóides de <i>Musa acuminata</i> cola</b> . 114	
2.3	<b>Uso de discos foliares na pré-seleção de poliplóides putativos de bananeira oriundos da poliploidização <i>in vitro</i> com agentes antimitóticos</b> .....	117
2.4	<b>Estimativa da quantidade de DNA nuclear e ploidia por citometria de fluxo</b> .....	118
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	119

<b>3.1</b>	<b>Pré-seleção de poliplóides putativos com base em características.....</b>	<b>119</b>
<b>2.2</b>	<b>Adequação e uso da massa específica de discos foliares na diferenciação de diplóides e poliplóides de <i>Musa acuminata</i> cola.....</b>	<b>124</b>
<b>2.3</b>	<b>Uso de discos foliares na pré-seleção de poliplóides putativos de bananeira oriundos da poliploidização <i>in vitro</i> com agentes antimitóticos.....</b>	<b>128</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>133</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>134</b>

## **CAPÍTULO 1: Introdução geral**

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo da bananeira constitui uma atividade agrícola de relevante papel socioeconômico e agroecológico. A área total mundial cultivada é estimada em 4,1 milhões de hectares, num total de 120 países tropicais e subtropicais, e uma produção de 70 milhões de toneladas. O Brasil é o quarto produtor mundial de banana, tendo produzido 6.972.408 toneladas da fruta em 2007, em uma área colhida de 508.845 hectares (AGRIANUAL, 2009). Os dois principais produtores brasileiros são Bahia, com 1.407.741 toneladas, e São Paulo, com 1.238.087 toneladas em 2009 (ANUÁRIO..., 2010).

A banana é a fruta mais consumida no mundo e não seria exagero concluir que é também a mais importante. Consumida em sua quase totalidade na forma *in natura*, a banana é parte integrante da alimentação das populações de baixa a alta renda, não só pelo seu alto valor nutritivo, como pelo seu baixo custo. Ademais, a banana pode ser utilizada para produção de banana chips e preparação de diversos pratos culinários como tortas, sorvetes, mingaus, salada de frutas. Além disso, o fruto apresenta propriedades terapêuticas e medicinais e a bananeira aplicações ornamental e artesanal (BAKRY et al., 2009).

Aliado a estes fatores, o cultivo da bananeira apresenta um fluxo contínuo de produção a partir do primeiro ano, fato este que garante emprego e renda para milhares de brasileiros e exerce importante papel na fixação de mão-de-obra rural e do agricultor no campo (ALVES et al., 1999). Nesse sentido, estima-se que existem 600.000 propriedades agrícolas envolvidas com a cultura, onde mais de 60% dessas são pequenos agricultores que cultivam de dois a cinquenta hectares.

No Brasil, as cultivares mais plantadas são triplóides sem sementes (grupo AAB) e pertencem ao tipo Prata (Prata Anã e Pacovan), representando 60% da banana produzida; tipo Terra (Terra e Terra Maranhão) e Maçã, todas

utilizadas unicamente para o mercado interno (SILVA et al., 2001). A restrita exportação dessas variedades deve-se à inadequação do produto ao mercado externo, bem como à grande demanda interna decorrente da alta preferência pelo tipo prata, especialmente por nordestinos e nortistas. Já a banana do tipo Maçã é considerada a mais nobre para os brasileiros, dado o seu paladar; enquanto a Terra é praticamente consumida na forma cozida ou frita (SILVA; PEREIRA; RODRIGUES, 2008).

Somente as bananas d'água ou do subgrupo Cavendish (AAA, Grande Naine, Nanica e Nanicão), apesar de possuírem uma produção menos representativa, possuem características adequadas para exportação como, por exemplo, frutos delgados, longos, encurvados e de paladar muito doce quando maduros (SILVA et al., 1999; SILVA; PEREIRA; RODRIGUES, 2008). No entanto, as cultivares tipo Cavendish são suscetíveis à Sigatoka negra, principal praga da bananeira, e, à exceção da Terra e Maçã, são, também, suscetíveis à Sigatoka amarela. Com relação ao mal-do-Panamá, a 'Grande Naine' e a 'Terra' são resistentes, a 'Maçã' é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis (SILVA et al., 2001). Tais pragas geralmente resultam em perdas na produção, especialmente em grandes áreas destinadas ao cultivo industrial (BAKRY et al., 2009).

Somado a essas limitações, as cultivares do subgrupo Cavendish possuem estreita base genética, são instáveis geneticamente, e, a variabilidade natural existente provém de poucos processos de mutação (BAKRY et al., 2009). Ainda assim, este tipo de banana representa mais do que 45% da produção mundial da fruta (SILVA et al., 1999; SILVA; PEREIRA; RODRIGUES, 2008). Diante desse contexto, a bananicultura requer proteção fitossanitária, sendo suscetível a doenças emergentes.

Com exceção do mal-do-Panamá e das viroses, o controle de pragas é feito pelo uso de defensivos agrícolas, que têm impacto direto no meio ambiente

e na saúde dos produtores e consumidores (SILVA et al., 2001). Acrescenta-se ainda que medidas efetivas de controle químico, usadas em grandes cultivos, não estão disponíveis para pequenos produtores de banana de países em desenvolvimento como o Brasil (BAKRY et al., 2009). Por essas razões, o uso de variedades resistentes criadas por melhoramento genético é a estratégia de controle viável das principais pragas da bananeira. Além de não ser prejudicial ao meio ambiente, uma variedade melhorada irá resultar em aumento de produtividade, melhoria na qualidade dos frutos e implicará menor custo de produção e aumento da renda líquida do produtor (SILVA et al., 2002).

O método de melhoramento mais utilizado em bananeira é o convencional por hibridação, mediante o cruzamento de diplóides AA selvagens ou pré-melhorados (genitor masculino) com triplóides comerciais e geração de novas variedades tetraplóides. Esta metodologia usando a cultivar triplóide AAA – Gros Michel foi desenvolvida na década de 1920, em Trinidad e Jamaica, e continua empregada até hoje em vários centros de pesquisa, a exemplo da Fundacion Hondureña de Investigacion Agricola-FHIA, em Honduras; Agricultural Research for Development in Africa-IITA, na Nigéria; e National Research Centre for Banana-NRCB, na Índia (BAKRY et al., 2009). Na Embrapa onde se usa como progenitores femininos triplóides AAB, do tipo Prata e Maçã, a hibridação é usada desde 1982, até os dias atuais, com a obtenção de uma série de cultivares AAAB (SHEPHERD, 1987; SILVA et al., 1999). Mais recentemente, o cruzamento de tetraplóides com diplóides com a geração de triplóides secundários está sendo incrementado no melhoramento genético de bananeira da Embrapa. No entanto, apesar dos novos tetraplóides possuírem resistência a pragas, alguns problemas pós-colheita têm sido observados como despencamento precoce dos frutos, polpa flácida, menor tempo de prateleira e firmeza reduzida. Ressalta-se, ainda, que essa estratégia é dificultada por causa da esterilidade de alguns genótipos triplóides, como os do subgrupo Cavendish.

Uma das alternativas que pode contornar a esterilidade em cultivares triplóides de bananeira é o uso de métodos não convencionais de melhoramento como a indução da duplicação do número de cromossomos *in vitro*. Mediante esta estratégia, diplóides promissores são induzidos à poliploidização *in vitro*, e as plantas autotetraplóides resultantes cruzadas com diplóides melhorados para geração de triplóides secundários. Desta forma é possível introduzir resistência a pragas nos híbridos gerados, como também obter híbridos triplóides secundários com características de fruto semelhantes às variedades tipo Cavendish (BAKRY et al., 2007; SILVA et al., 2001; STOVER; BUDDENHAGEN, 1986). Ademais, a duplicação do número de cromossomos pode evitar o processo normalmente lento de cultivo de plantas baseado em meiose.

A poliploidização *in vitro* é baseada na aplicação de substâncias antimitóticas em explantes tais como ápices caulinares, meristemas, agregados de brotos (*clusters*) ou suspensões de células embriogênicas, sob condições assépticas (BAKRY et al., 2007; DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002). Vários podem ser os fatores que determinam o sucesso da poliploidização, destacando-se o genótipo, tipo, concentração, período de exposição e formas de aplicação do agente antimitótico; bem como o tipo, condição fisiológica e a manipulação dos explantes antes e após a indução de poliploidia. Assim, esses fatores devem ser pré-requisitos básicos em protocolos de indução de autotetraplóides em bananeira (ASIF; MAK; YASMIN, 2000; BAKRY et al., 2007; GANGA; CHEZHIYAN, 2002).

Uma limitação associada ao uso de ápices caulinares e demais tipos de explantes multicelulares é a ocorrência de mixoploidia<sup>1</sup> (ploidy chimera) após a aplicação dos antimitóticos. Os ápices caulinares possuem três ou mais camadas de células histogênicas independentes em diferentes fases de divisão celular,

---

<sup>1</sup> Mixoplóide é aqui considerado como uma planta apresentando células do mesmo tecido com várias ploidias diferentes (2x-4x, por exemplo)

apresentam várias bainhas e ou primórdios foliares que recobrem o domo meristemático e com isso dificultam a atuação homogênea e efetiva do antimitótico aplicado. Por isto faz-se necessário que, após a indução de poliploidização, cada ápice caulinar seja subcultivado por pelo menos três vezes para dissociar os autotetraplóides estáveis dos mixoplóides e diplóides. Com isto, facilita-se o trabalho do melhorista na identificação e confirmação das bananeiras autotetraplóides (ROUX et al., 2004).

A alternativa atualmente proposta para contornar o problema de mixoploidia é utilizar protoplastos ou suspensões de células embriogênicas como explante. Esta técnica possibilita a manipulação de grandes quantidades de material vegetal além de minimizar ou evitar a produção de mixoplóides, uma vez que a planta regenerada terá origem de uma célula simples (ROUX et al., 2004). O uso de explante unicelular facilita a atuação e eficiência do agente antimitótico, dispensa os subcultivos para dissociação das plantas desejadas (autotetraplóides), reduz o tempo e aumenta a quantidade de autotetraplóides obtidos, por eliminar a clonagem de plantas não duplicadas. Todavia, até o presente, não há relato de um protocolo de indução de poliploidização em diplóides de bananeira mediante o uso de suspensões de células embriogênicas.

Outra estratégia que pode evitar a mixoploidia consiste em sincronizar o ciclo celular dos explantes mediante a aplicação de hidroxiuréia (HU), antes da indução de poliploidização. A hidroxiuréia é um inibidor da síntese de DNA, geralmente aplicado em células somáticas de meristemas de raízes e com eficácia comprovada em espécies como trigo, cevada (PAN; HOUBEN; SCHLEGEL, 1993). Todavia, até o presente momento, o uso da sincronização do ciclo celular não foi relatado em protocolos de indução *in vitro* de poliplóides.

Quanto ao tipo de antimitótico aplicado, a poliploidização é tradicionalmente realizada pelo uso de colchicina (BAKRY et al., 2007;

DOLEZEL; DOLEZELOVÁ; NOVÁK, 1994), apresentando como desvantagem o fato dessa substância somente atuar com eficiência em células que estão em divisão, bem como por possuir alta toxidez ao ser humano. Desse modo, quando se utiliza explantes multicelulares a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, o que ocasiona o aparecimento de mixoplóides (CARVALHO; CARVALHO; OTONI, 2005; WAN; PETOLINO; WIDHOLM, 1989). Além disso, a colchicina possui alta toxicidade ao ser humano e pode ocasionar esterilidade e crescimento anormal nas plantas regeneradas (WAN; PETOLINO; WIDHOLM, 1989). Por isso, visando maior eficiência do tratamento, têm-se variado a forma de aplicação, a concentração e o tempo de exposição ao antimitótico.

Outros compostos, tais como herbicidas baseados em dinitroanilina, têm mostrado alta atividade de poliploidização com baixa fitotoxicidade (MADON et al., 2005; PETERSEN; HAGBERG; KRISTIENSEN, 2002). Um desses compostos, a orizalina, possui maior afinidade com a tubulina<sup>2</sup> e, por esse motivo, tem apresentado elevada eficiência na despolimerização dos microtúbulos e, conseqüentemente, uma maior frequência de plantas autopoliplóides. Ressalta-se, ainda, que a orizalina é aplicada em concentrações micromolares ( $\mu\text{M}$ ), ao passo que a colchicina tem sido utilizada em concentrações milimolares (mM) (DOLEZEL; DOLEZELOVÁ; NOVÁK, 1994; HANSEN et al., 1998; JESUS-GONZALEZ; WEATHERS, 2003). Assim sendo, com o uso de genótipos adequados, bem como, adequando-se a concentração, tempo de exposição, formas de aplicação de cada antimitótico, pode-se chegar à eficiência no uso da duplicação cromossômica no melhoramento genético de bananeira.

---

<sup>2</sup> Tubulina, subunidade protéica que polimeriza para formar os microtúbulos, estes que durante os estágios finais da mitose são os responsáveis pela separação das cromátides irmãs dos cromossomos duplicados (LODISH et al., 2005).

Igualmente importante a um eficiente protocolo de indução de poliplóides, a técnica de poliploidização *in vitro* requer métodos práticos, seguros e efetivos para a pré-seleção dos indivíduos poliplóides putativos e posterior identificação e confirmação da ploidia dos poliplóides pré-selecionados.

O método mais simples de pré-selecionar poliplóides se baseia nas características morfológicas das plantas. A associação entre o nível de ploidia e as características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliplóides, principalmente porque essas características estão relacionadas com o aumento do tamanho das células, tecidos e órgãos, como resultado da poliploidização “efeito gigas” (SOUZA; QUEIROZ, 2004). Normalmente os poliplóides apresentam crescimento lento, folhas espessas e arcadas e sistema radicular pouco desenvolvido. Contudo, nem sempre é possível observar com segurança essas características, as quais interagem com fatores ambientais.

Outra forma de avaliar o nível de ploidia consiste em medir a espessura do limbo foliar e o tamanho das células que compõem o mesofilo, bem como determinar o tamanho e a densidade de estômatos e cloroplastos, mediante a obtenção de cortes anatômicos transversais e paradérmicos (DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; HAMILL; SMITH; DODD, 1992; TENKOUANO et al., 1998). Este método permite distinguir de forma eficiente plantas diplóides das plantas supostamente poliplóides, contribuindo para reduzir significativamente o número de plantas que serão submetidas à contagem de cromossomos para confirmação da ploidia. No entanto, as características anatômicas podem também sofrer influência das condições ambientais, além de necessitar de técnicas de microscopia de luz e mão-de-obra treinada. Uma estratégia promissora pode ser aquela baseada na determinação indireta da espessura foliar (BENINCASA, 2003), tendo como base a massa específica de discos foliares.

Ainda assim, nem sempre é possível distinguir com eficiência os diferentes níveis de ploidia (diplóide, triplóide, tetraplóide) com base somente em caracteres morfológicos. Por este motivo, é imprescindível que as plantas pré-selecionadas morfológicamente, como possíveis poliplóides, sejam submetidas à estimação do nível de ploidia mediante a quantificação do DNA nuclear por citometria de fluxo, seguida da confirmação por contagem de cromossomos em células metafásicas de meristemas de raízes. Comparado à técnica citológica clássica baseada na determinação do número de cromossomos, a citometria de fluxo é um método simples, seguro, não influenciado por fatores do ambiente e com amplo uso em Musáceas. Ademais, centenas de plantas podem ser analisadas diariamente e ter sua ploidia determinada (DOLEZEL, 1997; DOLEZEL; BARTOS, 2005; DOLEZEL; GRELHUBER; SUDA, 2007).

Além dos métodos já mencionados, o nível de ploidia pode ser determinado também mediante a caracterização citoanatômica e morfológica do grão de pólen, útil para plantas em produção (SOUZA; QUEIROZ, 2004; TENKOUANO et al., 1998). Conforme se pode observar, a ploidia pode ser verificada por diversos métodos, mais ou menos precisos, cujos resultados podem ser correlacionados estatisticamente. No entanto, o método mais adequado depende da natureza e objetivo do trabalho.

Até o presente, o desenvolvimento e aprimoramento da técnica de duplicação de cromossomos *in vitro* têm permitido integrar esta estratégia às atividades convencionais de melhoramento genético da bananeira, com resultados promissores. Além da bananeira, espécies frutíferas como Citros, e outras de uso ornamental, têm se beneficiado com a poliploidização *in vitro*. Dessa forma, barreiras genéticas, antes limitantes ao melhoramento convencional, são hoje superadas pelas técnicas biotecnológicas, em parte graças ao desenvolvimento e aprimoramento da cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas.

Diante da importância da poliploidização *in vitro* para o melhoramento genético de bananeira e considerando a necessidade de pesquisas na área, esse trabalho teve como objetivos: 1) Desenvolver uma metodologia de indução *in vitro* de autotetraplóides de genótipos diplóides *Musa acuminata* (AA) a partir de ápices caulinares; 2) Estudar as respostas morfofisiológicas *in vitro* dos ápices caulinares submetidos ao tratamento com colchicina e orizalina; 3) Desenvolver uma técnica eficiente e prática para identificar poliplóides com base na massa específica de discos foliares de plantas aclimatizadas; e 4) Identificar por citometria de fluxo os poliplóides putativos pré-selecionados e correlacionar o resultado obtido com os resultados da espessura foliar.

## REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP Consultoria e Comércio, 2009. 194 p.

ALVES, E. J. et al. Exigências climáticas. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. rev. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 35-46.

ANUÁRIO brasileiro da fruticultura. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2010. 129 p.

ASIF, M. J.; MAK, C.; YASMIN, O. R. Polyploid induction in a local wild banana (*Musa acuminata* spp. *malaccensis*). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 3, n. 5, p. 740-743, Sept. 2000.

BAKRY, F. et al. Genetic improvement of banana. In: JAIN, S. M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Ed.). **Breeding plantation tree crops: tropical species**. London: Springer, 2009. p. 3-46.

\_\_\_\_\_. In liquid medium colchicines treatment induce non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, Paris, v. 62, n. 1, p. 3-12, Jan. 2007.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41 p.

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

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

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Feb. 2005.

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

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, London, v. 2, p. 2233-2244, Sept. 2007.

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

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**, Melbourne, v. 40, n. 6, p. 887-896, Dec. 1992.

HANSEN, A. L. et al. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, n. 2, p. 231-237, June 1998.

JESUS-GONZALEZ, L. de; WEATHERS, P. J. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 8, p. 809-813, Apr. 2003.

LODISH, H. et al. A vida começa nas células. In: \_\_\_\_\_. **Biologia celular e molecular**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 1-29.

MADON, M. et al. Poliploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. **Journal of Oil Palm Research**, Benin City, v. 17, p. 110-123, Dec. 2005.

PAN, W. H.; HOUBEN, A.; SCHLEGEL, R. Highly effective cell synchronization in plant roots by hydroxyurea and amiprofos-methyl or colchicine. **Genoma**, New York, v. 32, n. 2, p. 387-390, Apr. 1993.

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

ROUX, N. S. et al. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutant in *Musa* spp. In: JAIN, S. M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular, biology, and induced mutations**. Leuven: Science Publishers, 2004. p. 33-43.

SHEPHERD, K. Banana breeding: past and present. **Acta Horticulturae**, Palo Alto, v. 196, p. 37-43, Mar. 1987.

SILVA, S. O. et al. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.

\_\_\_\_\_. Cultivares. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. rev. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 85-105.

\_\_\_\_\_. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 157 p.

SILVA, S. O.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V. Variedades. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 29, n. 245, p. 78-83, 2008.

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, maio/jun. 2004.

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

TENKOUANO, A. et al. Ploidy determination in *Musa* germplasm using pollen and chloroplast characteristics. **HortScience**, Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 889-890, May 1998.

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

**CAPÍTULO 2: Referencial teórico**

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo da bananeira é uma das principais atividades do agronegócio mundial, com plantios em mais de 120 países tropicais e subtropicais (BAKRY et al., 2009). Além de constituir-se num essencial recurso alimentício, a banana é a fruta mais popular no mundo, e sua produção ocorre praticamente em países em desenvolvimento. O Brasil é quarto produtor mundial de banana, com produção estimada de 6.972.408 toneladas em 2007, em uma área colhida de 508.845 hectares (AGRIANUAL, 2009).

Embora seja um dos maiores produtores da fruta, o Brasil apresenta uma baixa produtividade média de banana (14,1 toneladas por hectare) (RODRIGUES; LEITE, 2008), consequência, principalmente, do uso de variedades de bananeira com susceptibilidade às Sigatocas amarela e negra e mal-do-panamá, pragas que podem ocasionar perdas significativas na produção e, em alguns casos, inviabilizar o cultivo (SILVA; PEREIRA; RODRIGUES, 2008).

As cultivares de bananeira mais plantadas no Brasil são triplóides sem sementes (grupo AAB) e pertencem ao tipo Prata (Prata Anã e Pacovan), que representa 60% da banana produzida; tipo Terra (Terra e Terra Maranhão) e Maçã, todas utilizadas unicamente para o mercado interno (SILVA et al., 2001). A restrita exportação brasileira deve-se à grande demanda interna e má qualidade da fruta fresca, quando comparada ao padrão exigido pelos mercados internacionais. Outro fator é o uso de variedades pouco conhecidas pelos países importadores, que dão preferência para bananas do tipo Cavendish (RODRIGUES; LEITE, 2008).

Somente as bananas d'água ou do subgrupo Cavendish (grupo AAA, Grande Naine, Nanica e Nanicão), apesar de possuir uma produção menos representativa, possuem características adequadas para exportação, tais como,

frutos delgados, longos, encurvados e de paladar muito doce quando maduros (SILVA et al., 1999, 2008). Vale ressaltar, ainda, que mais de 45% da produção mundial de banana se baseia em cultivares do Subgrupo Cavendish. No entanto, as variedades tipo Cavendish possuem estreita base genética, são instáveis geneticamente, e, a variabilidade natural existente provém de poucos processos de mutação. Diante desse contexto, a bananicultura requer grandes esforços na proteção fitossanitária, sendo suscetível a pragas emergentes (BAKRY et al., 2009).

Com exceção do mal-do-Panamá e das viroses, o controle fitossanitário em bananeira é feito pelo uso de defensivos agrícolas, porém, estes produtos químicos têm impacto direto no meio ambiente, na saúde humana e nos custos de produção (SILVA et al., 2002). Ademais, não existem medidas efetivas de controle do mal-do-Panamá. Por essas razões, a única estratégia de controle viável dessas pragas é utilizar variedades resistentes criadas por melhoramento genético (BAKRY et al., 2009; SILVA; PEREIRA; RODRIGUES, 2008).

O método de melhoramento mais utilizado em bananeira é o convencional por hibridação, mediante o cruzamento de diplóides AA selvagens ou pré-melhorados (genitor masculino) com triplóides comerciais e geração de novas variedades tetraplóides. Esta metodologia usando a cultivar triplóide AAA – Gros Michel foi desenvolvida na década de 1920, em Trinidad e Jamaica, e continua empregada até hoje em centros de pesquisa de países como Honduras e Índia (BAKRY et al., 2009). Na Embrapa, onde se usa como progenitores femininos triplóides AAB, do tipo Prata e Maçã, a hibridação é usada desde 1982, até os dias atuais, com a obtenção de uma série de cultivares AAAB (SHEPHERD, 1987; SILVA et al., 1999). Mais recentemente, o cruzamento de tetraplóides com diplóides com a geração de triplóides secundários tem sido incrementado no melhoramento genético de bananeira da Embrapa.

Apesar dos resultados positivos já alcançados, a esterilidade observada em alguns acessos de bananeira tem limitado o progresso no melhoramento genético convencional de cultivares triplóides. Uma das alternativas que pode contornar a esterilidade é o uso de métodos não convencionais, a exemplo, a indução da poliploidização<sup>3</sup> com substâncias antimitóticas. Com esta estratégia é possível produzir bananeiras autotetraplóides<sup>4</sup> férteis, que depois de avaliadas e selecionadas, serão utilizados em cruzamentos com diplóides melhorados para geração de triplóides secundários (BAKRY et al., 2007, 2009; STOVER; BUDDENHAGEN, 1986). Desta forma é possível introduzir resistência a pragas nos híbridos gerados, selecionar e recomendar novas cultivares triplóides com frutos de boas características e partenocárpicas (SILVA et al., 2002; STOVER; BUDDENHAGEN, 1986).

A poliploidização *in vitro* baseia-se na aplicação de substâncias antimitóticas, colchicina e orizalina, em explantes, tais como ápices caulinares e ou suspensões de células embriogênicas, sob condições assépticas (BAKRY et al., 2007; DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002), com a posterior identificação, avaliação e seleção dos autotetraplóides desejáveis. Assim sendo, com o uso de genótipos diplóides promissores e adequação da concentração, tempo de exposição e formas de aplicação de cada antimitótico, pode-se chegar à eficiência no uso da duplicação cromossômica em bananeira.

Face ao exposto, verifica-se que é possível fazer o melhoramento genético de cultivares do tipo Cavendish, pelo uso de métodos não convencionais como a duplicação do número de cromossomos. Vale ressaltar, ainda, que independente do método usado para obter uma variedade melhorada,

---

<sup>3</sup> Poliploidização é o processo pelo qual o número de cromossomos de um determinado indivíduo é duplicado, e este denominado poliplóide. Por exemplo,  $n=x \blacktriangleright 2n=2x$ ;  $2n=2x \blacktriangleright 2n=4x$ ;  $2n=3x \blacktriangleright 2n=6x$ .

<sup>4</sup> Autotetraplóide é a planta obtida após a autopoliploidização e possui células com quatro cópias do mesmo genoma.

pode-se induzir a um aumento de produtividade e a um menor custo de produção. Além de reduzir o emprego de defensivos agrícolas e os gastos com o manejo da cultura, o uso de variedades melhoradas proporciona melhoria na qualidade dos frutos, aumentando, conseqüentemente, a renda líquida do produtor rural (SILVA et al., 2002).

Face ao exposto, este capítulo tem como objetivo dar subsídios para um melhor entendimento sobre o uso da poliploidização no melhoramento genético de bananeira, abordando as principais aplicações da duplicação de cromossomos, os recentes progressos obtidos, as limitações e perspectivas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da poliploidia

A poliploidia, definida como a presença de três ou mais grupos completos de cromossomos no mesmo núcleo, é um fenômeno de extrema importância na evolução e no melhoramento genético de plantas (KÖHLER; SCHEID; ERILOVA, 2010; RAMSEY; SCHEMSKE, 1998; UDALL; WENDEL, 2006). Além de apresentar um maior efeito tamponante em relação à capacidade de adaptação, as plantas poliplóides podem ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diplóides não teriam sucesso. Além disso, a poliploidia pode restaurar a fertilidade nos híbridos gerados e regularizar o pareamento meiótico (SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

Muitas espécies silvestres e todas as culturas agrícolas são poliplóides, e algumas tiveram o genoma duplicado mais recentemente. Em plantas com flores, por exemplo, as estimativas acerca da ocorrência de poliploidia variaram entre 30% até 80% das angiospermas (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). Ademais, é consenso que o processo de formação de poliplóides, ou seja, a poliploidização constitui o principal mecanismo de especiação<sup>5</sup> (KÖHLER; SCHEID; ERILOVA, 2010). São exemplos de culturas agrícolas poliplóides o cafeeiro (*Coffea arábica*,  $2n=4x=44$ ), a bananeira (*Musa* spp. Triplóides,  $2n=3x=33$ ), o algodoeiro (*Gossypium hirsutum*,  $2n=4x=52$ ) e o milho (*Zea mays*,  $2n=4x=20$ ).

A alta ocorrência de poliplóides em angiospermas é, em parte, atribuída à elevada plasticidade de sua estrutura genômica, como manifestado pela tolerância a variações no número de cromossomos (aneuploidia e poliploidia), tamanho do genoma, inserções e deleções. Por outro lado, não está claro porque

---

<sup>5</sup> Especiação é o processo de desenvolvimento de novas espécies (DICTIONARY..., 2006).

a poliploidia é baixa em gimnospermas (menor que 5%), já que estas são consideradas as irmãs das angiospermas (RAMSEY; SCHEMSKE, 1998). É importante enfatizar que, embora a maioria das espécies cultivadas seja poliplóide, não há necessariamente uma relação entre poliploidia e domesticação de plantas (SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

## 2.2 Origem dos poliplóides e suas consequências no melhoramento genético de plantas

Os poliplóides podem ocorrer de modo espontâneo ou de forma induzida, mediante a duplicação de células somáticas (divisão mitótica), *in vitro* ou *in vivo*, ou sexualmente, pela fusão de gametas citologicamente não reduzidos<sup>6</sup> após hibridações interespecíficas (divisão meiótica) (KÖHLER; SCHEID; ERILOVA, 2010; LEITCH; LEITCH, 2008; SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001). Dois tipos de poliplóides são considerados: 1) *autopoliplóides* originados da duplicação do conjunto básico de cromossomos dentro de uma espécie, ou seja, de um mesmo genoma; e 2) *alopoliplóides*, geralmente resultantes de hibridação entre espécies diferentes, portanto, com três ou mais grupos de cromossomos geneticamente distintos (CHEN, 2007). Ambos os tipos são comuns na natureza, com evidências da predominância dos alopóliploides (UDALL; WENDEL, 2006).

---

<sup>6</sup> Gametas não reduzidos, gametas  $2n$ , gametas com número cromossômico somático ( $n=2n$ ), são gametas que contêm o mesmo número de cromossomos que as células somáticas do indivíduo que o originou não sendo, portanto, haplóides. Podem resultar de um processo meiótico anormal (disfunção meiótica), em que a redução do número cromossômico não ocorre, devido a não segregação das cromátides irmãs na anáfase ou por falha da citocinese (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001). De acordo com Köhler, Scheid e Erilova (2010), gametas não reduzidos podem ser frequentemente induzidos por fatores genéticos e ambientais e são comumente formados pela restituição nuclear meiótica, uma falha que ocorre na meiose I ou meiose II.

### 2.2.1 Poliploidização espontânea

A poliploidização espontânea ou natural ocorre a baixas frequências, sendo resultante de variações somáticas durante o cultivo *in vitro*, fusão acidental de protoplastos embriogênicos, endoreduplicação<sup>7</sup> e polispermia, esta última definida como a fertilização de um óvulo por mais do que uma célula espermática (JOURBÈS; CHEVALIER, 2000).

### 2.2.2 Poliploidização induzida ou artificial

A indução artificial de poliploidia é realizada mediante a aplicação de substâncias antimitóticas, como a colchicina, em explantes meristemáticos, sob condições *in vivo* ou *in vitro*. Desta forma, podem-se obter partes ou mesmo uma planta inteira poliploide, o que irá depender de fatores como tipo e ou estágio de desenvolvimento do explante. Acrescenta-se, ainda, que a maioria das pesquisas sobre indução de poliploidia utiliza o sistema *in vitro*, devido em parte aos avanços obtidos na área de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais.

Apesar do amplo uso, a indução de poliplóides pode apresentar algumas limitações como, por exemplo, alta fitotoxicidade de alguns agentes antimitóticos e necessidade de quantidades relativamente grandes do antimitótico. Outras limitações podem incluir redução no florescimento das plantas autotetraplóides regeneradas, mutagênese, mixoploida (ploidy chimeras) e baixa produção de sementes (esterilidade feminina). Ainda assim, a

---

<sup>7</sup> A endoreduplicação é um processo de duplicação cromossômica endonuclear o qual ocorre na ausência de condensação e descondensação dos cromossomos. Em outras palavras, consiste de um ou vários ciclos de síntese de DNA na ausência de mitose. Tal processo leva à produção de cromossomos com 2<sup>n</sup> cromátides sem variação no número de cromossomos (JOURBÈS; CHEVALIER, 2000).

poliploidia induzida pode ser uma poderosa ferramenta auxiliar no melhoramento de genético de plantas.

Desde a descoberta do efeito poliploidizante da colchicina na década de 1930, plantas autopoliplóides têm sido obtidas em uma variedade de espécies. São três as maneiras básicas em que se pode aplicar a poliploidização no melhoramento de plantas: 1) por poliploidização na espécie, como uma forma de tentar-se produzir novos genótipos maiores e melhores do que seu genitor; 2) por indução de poliploidia em um híbrido, com o propósito de restaurar a fertilidade, sintetizar uma nova espécie; ou 3) como uma estratégia para transferência de genes de interesse entre plantas de ploidia diferentes, mediante hibridações intra ou interespecíficas (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). Dessa forma, a indução de poliploidia tem possibilitado a produção de novos germoplasmas e seu uso como progenitores em programas de melhoramento genético ou diretamente como cultivares comerciais.

Além da poliploidização somática com antimitóticos, a indução de poliploidia pode ser realizada de forma sexual mediante seleção e cruzamentos de plantas com altas frequências de gametas não reduzidos, tendo como característica a manutenção da homozigose e o fato de permitir a transferência de genes entre níveis de ploidia diferentes (KÖHLER; SCHEID; ERILOVA, 2010; RAMSEY; SCHEMSKE, 1998; SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001).

Até o presente, diversos trabalhos sobre indução de poliploidização já foram realizados, com os mais diversos propósitos e aplicados em várias espécies de importância econômica e social (Quadro 1).

Quadro 1 Aplicações da poliploidização no melhoramento genético não-convencional de plantas.

<b>Espécie (Uso)</b>	<b>Antimitótico(s) utilizado(s)</b>	<b>Explante(s) utilizado(s)</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacopa monnieri</i> (Ornamental)	Colchicina (0,001%, 48 horas)	Segmentos nodais	Plantas tetraplóides com maior área foliar, diâmetro da flor e do caule	Escandón, Hagiwara e Alderete (2006)
<i>Citrus sinensis</i> Osbeck; <i>Fortunella crassifolia</i> (Frutífera)	Colchicina (0,1%, 8 dias)	Protoplastos; calos embriogênicos	Obtenção de células tetraplóides a partir de ambos explantes. Plantas autotetraplóides estáveis foram regeneradas apenas de calos embriogênicos tratados. Uma nova cultivar de <i>C. sinensis</i> exibiu bom desempenho em termos de sabor, textura e suco.	Zeng et al. (2006)
<i>Punica granatum</i> (Frutífera e ornamental)	Colchicina (10 mg L <sup>-1</sup> , 30 dias)	Segmentos nodais	Plantas autotetraplóides com normal crescimento e florescimento, flores de maior tamanho, maior número de grãos de pólen por antera, porém com redução na viabilidade do pólen.	Shao, Chen e Deng (2003)
<i>Pyrus communis</i> L. (Frutífera)	Orizalina (200 a 300 µM)	Brotos axilares haplóides	Obtenção de plantas duplo-haplóides estáveis em menos de 24 meses.	Bouvier et al. (2002)
<i>Triticum aestivum</i> L.	Colchicina (300-1000 µM, 48 h)	Micrósporos	Média de 23 plantas duplo-haplóides.	Hansen e Andersen (2003)

Conforme pode ser observado no Quadro 1, existe ampla variação na frequência de poliploidização entre as espécies ou mesmo entre genótipos da mesma espécie. Na maioria dos casos, a variabilidade na taxa de poliploidização está relacionada ao tipo e concentrações de antimitóticos, tempos e formas de aplicação dessas substâncias e tipo e estágio de desenvolvimento do explante utilizado para duplicação cromossômica. Acrescenta-se, ainda, que há predomínio no uso de explantes multicelulares, tendo como principal desvantagem a ocorrência de mixoploidia e por consequência um consumo maior de tempo e trabalho para dissociar os poliplóides<sup>8</sup> estáveis (puros) dos mixoplóides.

Com relação à importância da poliploidização induzida, esta depende da espécie utilizada e dos ganhos obtidos quando comparados aos métodos convencionais de melhoramento genético. No caso de espécies frutíferas perenes como *Pyrus communis* L., em que o melhoramento convencional é dificultado por causa do longo tempo de geração e autoincompatibilidade, a produção de plantas haplóides e duplo-haplóides é considerada uma importante estratégia para estudos genéticos e pesquisas na área de melhoramento. No entanto, a frequência de duplicação espontânea ou natural em *Pyrus communis* é considerada baixa, e por este motivo, a maioria das plantas haplóides é induzida à poliploidização com antimitóticos (BOUVIER et al., 2002). Outro exemplo da importância da indução de duplo-haplóides é a rápida obtenção de linhas homozigotas em programas de melhoramento de trigo (HANSEN; ANDERSEN, 2003).

Já em *Citrus*, a obtenção de genótipos triplóides sem sementes pelo cruzamento de diplóides com tetraplóides é o principal objetivo dos programas

---

<sup>8</sup> Poliplóides, plantas que possuem dentro de um núcleo três ou mais conjuntos completos de cromossomos múltiplos exatos do conjunto básico característico da espécie ou gênero, no caso de bananeira o número básico haplóide são 11 cromossomos (CHEN, 2007).

de melhoramento. Neste caso, o uso de substâncias poliploidizantes tem sido priorizado para aumentar a frequência de autotetraplóides, uma vez que a maioria das cultivares de citros é diplóide, e por essa razão torna-se teoricamente mais fácil obter autotetraplóides sintéticos (ZENG et al., 2006).

Ao contrário das espécies já mencionadas, para as quais se busca modificar a morfologia da planta e ou restaurar a fertilidade, em espécies ornamentais, a poliploidização é utilizada com o propósito de incrementar o valor comercial das plantas mediante a obtenção de novos genótipos que apresentem variação no tamanho e ou cor das flores e folhas. Dessa forma, a duplicação de cromossomos constitui uma ferramenta interessante para a exploração e domesticação do germoplasma de espécies selvagens para fins de uso ornamental (ESCANDÓN; HAGIWARA; ALDERETE, 2006).

### **2.3 Mecanismos de ação dos antimitóticos e seu papel na poliploidização**

Antimitóticos ou agentes poliploidizantes são substâncias ou drogas, em geral sintéticas, que bloqueiam a divisão celular na metáfase e induzem a duplicação no número de cromossomos. Como exemplos de antimitóticos citam-se a colchicina ( $C_{22}H_{25}NO_6$ ), um alcalóide extraído do cólquico (*Colchium autumnale*, Liliaceae); orizalina ( $C_{12}H_{18}N_4O_6S$  – 3,5-dinitro-N4,N4-dipropylsulfanilamide), um herbicida dinitroanilina; e 8-hidroxiquinolina (8-HQ).

Outros compostos como o Amiprofós-metil (APM) e Trifluralina (herbicida dinitroanilina) também têm sido utilizados como alternativa à colchicina para poliploidização (HANSEN; ANDERSEN, 1996; KHOSRAVI et al., 2008). Tais substâncias também atuam na dinâmica de polimerização dos microtúbulos, de maneira similar à colchicina (MOREJOHN; FOSKET, 1984), porém em concentrações bem menores. Comparados à colchicina, a eficiência

do APM e trifluralina têm sido variável, mas possibilitado resultados promissores (KHOSRAVI et al., 2008).

Os agentes antimitóticos agem em células em divisão celular de tecidos meristemáticos inibindo, durante a metáfase, a formação do fuso mitótico. O mecanismo molecular de ação dos antimitóticos baseia-se na sua afinidade para ligar-se à tubulina, proteína que compõe as fibras do fuso mitótico. Assim, forma-se o complexo antimitótico-tubulina que, além de impedir a polimerização dos microtúbulos do fuso mitótico, perturba a normal segregação polar das cromátides irmãs na anáfase após a separação do centrômero. Por não haver segregação na anáfase, devido à ausência de fuso mitótico, e nem citocinese (divisão citoplasmática), é esperado que a totalidade do material genético (cromossomos) da célula original ou mãe, nesse momento já duplicado, permaneça no interior do núcleo de uma única célula ao invés de ser distribuído igualmente para duas células-filhas. Como resultado, células com quatro pares de cromossomos idênticos e homólogos em todos os loci são “teoricamente” produzidas e, após sua proliferação, podem formar um setor de tecido tetraplóide identificado citologicamente (ALEZA et al., 2009).

Assim, se em sequência essa célula com  $4x=44$  cromossomos passa por um novo ciclo de replicação do DNA, na ausência de antimitótico, as cromátides irmãs terão teoricamente segregação polar normal, e após a divisão celular e citoplasmática duas células filhas idênticas ( $4x=44$ ) serão produzidas e, assim sucessivamente.

Quanto aos tipos de agentes antimitóticos, há relatos na literatura que a colchicina ligar-se de forma instável e reversível à tubulina, enquanto a orizalina e outros herbicidas dinitroanilinas têm maior afinidade à tubulina vegetal livre e formam um complexo antimitótico-tubulina estável.

Com relação ao antimitótico aplicado, a poliploidização é tradicionalmente realizada pelo uso de colchicina (BAKRY et al., 2007;

DOLEZEL; DOLEZELOVÁ; NOVÁK, 1994), apresentando como desvantagem o fato dessa substância somente atuar com eficiência 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 (CARVALHO; CARVALHO; OTONI, 2005; WAN; PETOLINO; WIDHOLM, 1989). Além disso, a colchicina possui alta toxicidade ao ser humano e pode ocasionar esterilidade e crescimento anormal nas plantas regeneradas (WAN; PETOLINO; WIDHOLM, 1989). Por isso, visando maior eficiência do tratamento, têm-se variado a forma de aplicação, a concentração e o tempo de exposição ao antimitótico.

Outros compostos, tais como herbicidas baseados em dinitroanilina têm mostrado alta atividade de poliploidização com baixa fitotoxicidade (MADON et al., 2005; PETERSEN; HAGBERG; KRISTIANSEN, 2002). Um desses compostos, a orizalina, possui uma atividade de despolimerização de microtúbulo devido a sua maior afinidade com a tubulina vegetal. Além disso, a orizalina pode ser aplicada em concentrações mil vezes menores que a colchicina, mesmo assim, apresentando maior eficiência na obtenção de autotetraplóides estáveis (DOLEZEL; DOLEZELOVÁ; NOVÁK, 1994; HANSEN et al., 1998; JESUS-GONZALEZ; WEATHERS, 2003). Assim sendo, com o uso de genótipos adequados, bem como, adequando-se a concentração, tempo de exposição e formas de aplicação de cada antimitótico, pode-se chegar à eficiência no uso da duplicação cromossômica no melhoramento genético de bananeira.

#### **2.4 Poliploidização no melhoramento genético de bananeira**

O uso da poliploidização em bananeira foi descrito pela primeira vez por Vakili (1962) mediante a aplicação *in vivo* de colchicina em plântulas de *Musa*

*balbisiana* sob diferentes estágios de germinação. Posteriormente, Vakili (1967) constatou que o tratamento de plântulas de *Musa acuminata* e *M. balbisiana*, no estágio IV de germinação com colchicina (0,5%), induziu poliploidia e possibilitou obter bananeiras autotetraplóides. De acordo com o autor, os tetraplóides eram mais altos e robustos que as diplóides, apresentavam crescimento mais lento<sup>9</sup>, folhas mais arcadas (inclinadas), pouco desenvolvimento do sistema radicular, alteração no tamanho e forma do fruto em alguns acessos, bem como mostraram aumento da concentração de antocianina nas folhas das variedades naturalmente pigmentadas.

Décadas depois, em 1992, o primeiro autotetraplóide a partir do tratamento *in vitro* de ápices caulinares de diplóides com colchicina (1,25 mM, por 2h) foi obtido em *Musa acuminata* (SH-3362) (HAMILL; SMITH; DODD, 1992). Desde então, poucos trabalhos foram realizados com essa técnica (Quadro 2), havendo ainda necessidade de pesquisas na área.

O trabalho mais recente de poliploidização foi desenvolvido por Bakry et al. (2007), que obtiveram 23 clones de bananeiras autotetraplóides estáveis a partir da aplicação de 1,25 mM de colchicina em ápices caulinares de 25 clones diplóides (AA, AB e BA). Vale ressaltar que nesse trabalho não foram observados problemas com relação à mixoploidia (quimeras diplóide/tetraplóide), nem mesmo plantas constituídas de células com alto número de cromossomos.

---

<sup>9</sup> O reduzido crescimento de plantas autotetraplóides pode ser atribuído ao fluxo gênico dobrado.

Quadro 2 Aplicações da poliploidização no melhoramento genético de bananeira.

<b>Espécie</b>	<b>Antimitótico(s) utilizado(s)</b>	<b>Explante(s) utilizado(s)</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Musa balbisiana</i>	Colchicina (0,5-1,5%, por 2-20 h)	Sementes e plântulas em diferentes estádios de germinação	Maior percentagem de tetraplóides foi obtida a partir de plântulas no estágio IV <sup>10</sup> . Houve reversão de plantas octaplóides e tetraplóies para tetraplóides e diplóides, respectivamente.	Vakili (1962)
<i>Musa</i> spp. ( <i>M. balbisiana</i> e <i>M. acuminata</i> )	Colchicina (0,5%, por 4-6 h.	Plântulas no estágio IV do processo de germinação	A poliploidização resultou em plantas tetraplóides nas duas espécies. Houve reversão ao nível diplóide, triplóide ou tetraplóide e ocorrência de plantas quimeras diplo-tetraplóides (2x-4x). Esterilidade feminina e ou masculina foi verificada, como também irregularidades cromossômicas na mitose.	Vakili (1967)
<i>Musa acuminata</i>	Colchicina (0,5%, por duas horas); DMSO (2% v/v)	Brotos axilares (4-6 semanas de cultivo) <sup>8</sup>	Cerca de 30% foram autotetraplóides estáveis. Estes foram estabelecidos no campo e mantiveram suas características por mais de três anos. Houve mixoploidia e reversão ao nível diplóide, porém não foi considerada uma limitação, uma vez que grande número de tetraplóides foi obtido. A adição de DMSO aumentou a permeabilidade celular e absorção da colchicina.	Hamill et al. (1992)

“Continua”

<sup>10</sup> Plântula com primeira folha, tal como coleótilo, e raízes adventícias seminais.

Quadro 2 “Cont.”

<b>Espécie</b>	<b>Antimitótico(s) utilizado(s)</b>	<b>Explante(s) utilizado(s)</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Musa acuminata</i>	Colchicina (5 mM, por 48 h) e orizalina (30, por 7d)	Ápices caulinares (14 dias de cultivo) <sup>11</sup>	Alta frequência de tetraplóides não quiméricos* (23,1%) foi verificada com 5 mM de colchicina, por 48 h, ou 30 µM de orizalina, por 7 dias, ambos com 2% de DMSO. O uso de DMSO não afetou a ploidia em plantas não poliploidizadas.	Duren (1996)
<i>Musa acuminata</i>	Colchicina (0,5%, por duas horas)	Plântulas <sup>12</sup> com um mês após a germinação do embrião zigótico	Obtenção de plantas tetraplóides, identificadas por citometria de fluxo e confirmada por contagem de cromossomos.	Asif, Mak e Yasmin (2000)
<i>Musa spp.</i>	Colchicina e orizalina	Ápices caulinares	Apenas em concentrações de 125-250 vezes superior, a colchicina teve uma capacidade de duplicação cromossômica igual à orizalina. Uma resposta cultivar-genoma (AA, AB).	Ganga e Chezhiyan (2002)
<i>Musa acuminata</i>	Colchicina (0,25-1%, por 3 h)	Ápices caulinares	O tratamento dos ápices caulinares com 0,5% de colchicina, por 2h, possibilitou 15% de plantas tetraplóides. Mixoploidia foi verificada (14 a 47,6%).	Chai et al. (2004)

“Continua”

<sup>11</sup> Os ápices caulinares mediram de 3-5 mm e foram isolados de culturas de brotos axilares aos 14 dias de cultivo *in vitro*. Além disso, antes da indução de poliploidização, os ápices caulinares foram cortados/seccionados longitudinalmente.

<sup>12</sup> É importante destacar, que antes da aplicação da colchicina, as plântulas ou brotos axilares (resultantes do cultivo *in vitro* de ápices caulinares) tiveram algumas bainhas foliares removidas e parte do pseudocaule retirado (poucos milímetros acima do ápice), além de sofrerem poda de todas as raízes existentes.

\* Tetraplóides não quiméricos são plantas onde não se detectou a presença de células com ploidia diferente (mixoploidia).

Quadro 2 “Cont.”

<b>Espécie</b>	<b>Antimitótico(s) utilizado(s)</b>	<b>Explante(s) utilizado(s)</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Musa acuminata</i> (AAA)	Colchicina	Suspensão de células embriogênicas	A poliploidização de suspensão de células possibilitou obter plantas hexaplóides e eliminou o problema da ocorrência de mixoploidia.	Roux et al. (2004)
<i>Musa</i> spp.	Colchicina (1,25 mM), por 48 h.	Cluster de brotos	Obtenção de 23 clones autotetraplóides estáveis, que floresceram e produziram gametófitos diplóides.	Bakry et al. (2007)
<i>Musa acuminata</i>	Amiprofós-metil (APM) e colchicina	Ápices caulinares	Com base na citometria de fluxo, o uso de 40µM de APM por 24h possibilitou obter 57,14% de plantas tetraplóides no diplóide 1304-04; e 2,5mM de colchicina por 48h resultou em 50% de plantas tetraplóides no diplóide 8694-15. Porém, a contagem de cromossomos não foi efetuada para confirmação da ploidia.	Rodrigues (2010)

No Brasil, os estudos pioneiros com poliploidização em banana foram conduzidos na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas, Bahia, em trabalho de parceria com a Universidade Federal de Lavras.

Os resultados já obtidos com a poliploidização *in vitro* são bastante promissores. Tetraplóides com a ploidia confirmada já se encontram em avaliação agrônômica em campo. No entanto, as tentativas de obtenção de sementes nesses poliplóides, via cruzamentos com os diplóides, têm sido infrutíferas. Atualmente, estes tetraplóides estão sendo usados como genitores masculinos nos cruzamentos com os diplóides. Apesar desses resultados, existem poucas informações sobre o comportamento dos poliplóides em campo especificamente em relação ao seu uso em hibridações com diplóides promissores.

Para que se tenha um número suficiente de poliplóides, que permita selecionar indivíduos adequados ao programa de melhoramento, vários obstáculos, como os descritos a seguir, terão que ser superados: 1) Inicialmente é preciso estabelecer protocolos mais eficientes e menos onerosos de obtenção de autotetraplóides de bananeira; 2) Terão que ser desenvolvidas técnicas práticas, rápidas e simples de pré-seleção dos poliplóides putativos, baseadas em características morfológicas, tais como espessura do limbo foliar observada mediante a determinação da densidade específica foliar 3) Faz-se necessário evitar a mixoploidia na duplicação de cromossomos, o que pode ser conseguido mediante o estabelecimento de protocolos de obtenção de suspensão de células embriogênicas em diplóides e o tratamento dessas com antimitóticos; 4)

Conhecer o comportamento meiótico e agrônômico em campo de bananeiras autotetraplóides, mixoplóides e aneuplóides<sup>13</sup>.

Na Figura 1, está representada de forma esquemática a metodologia de obtenção de autotetraplóides de bananeira e sua utilização na geração de híbridos triplóides secundários.

---

<sup>13</sup> Células aneuplóides se originam de perda ou ganho de cromossomos ou cromátides devido à falhas como, por exemplo, a segregação incorreta dos cromossomos por mau funcionamento do fuso mitótico.

### Obtenção e uso de autotetraplóides no melhoramento genético de bananeira

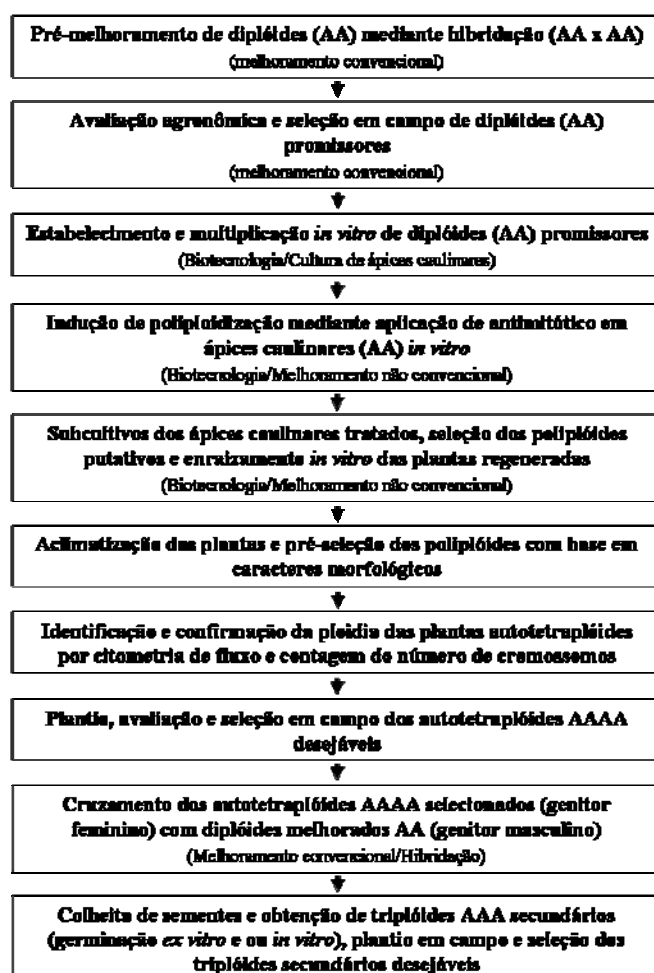


Figura 1 Esquema das etapas de obtenção e uso de autotetraplóides no melhoramento genético de cultivares estéreis de bananeira mediante poliploidização *in vitro* com antimitóticos.

#### 2.4.1 Etapas do processo de indução de poliplóides *in vitro*

A indução de poliploidização em bananeira consiste na aplicação de antimitóticos, colchicina ou orizalina, em explantes meristemáticos, tais como agregados de brotos axilares (*Clusters*), ápices caulinares, meristemas e, com menor frequência, sementes pré-germinadas. A aplicação do antimitótico é geralmente feita com uma concentração do produto e tempo de exposição ideais pré-determinados. Para tanto, a concentração ideal (obtida a partir de solução estoque, previamente preparada e esterilizada a frio) é adicionada ao meio de cultura líquido já autoclavado e o tratamento aplicado sob condições *in vitro*. O tipo, o tempo de exposição ao tratamento e a concentração do antimitótico é variável, entre 1,25 a 5 mM, para colchicina, e 15 a 30  $\mu$ M, para orizalina. Para uma maior eficiência, a aplicação dos tratamentos é realizada sob agitação (100-120 rpm). Quanto ao uso do APM, apenas Rodrigues (2010) utilizou esse antimitótico e os resultados ainda são considerados inconclusivos, uma vez que não houve confirmação das plantas autotetraplóides putativas.

Após o período de tratamento, específico para cada antimitótico, tipo de explante e genótipo, procede-se a lavagem dos explantes para eliminar o excesso do produto. Em seguida, os explantes são regenerados, em um processo de organogênese. Para tanto, efetua-se a indução de brotos axilares mediante subcultivos (no mínimo três) em meio suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) para redução de quimeras e dissociação dos autotetraplóides. Por fim, as brotações são alongadas e enraizadas, e, finalmente, aclimatizadas. A representação esquemática das etapas do processo de poliploidização *in vitro* utilizado em bananeira é ilustrada na Figura 2.

### Indução de poliploidização em ápices caulinares *in vitro*

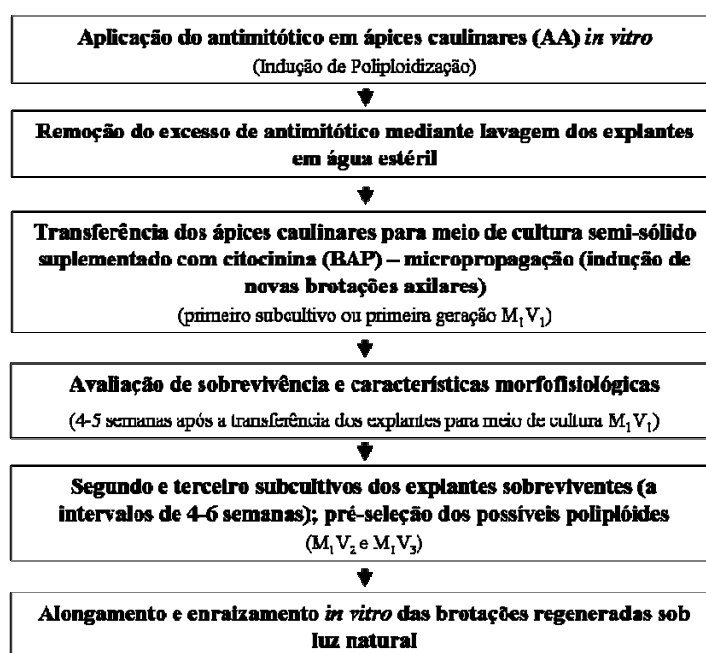


Figura 2 Etapas do processo de indução de poliploidização em ápices caulinares de diplóides promissores de bananeira.

É importante destacar, ainda, que durante o primeiro ou segundo subcultivos, é possível realizar uma pré-seleção dos poliplóides putativos, observando-se a morfologia dos brotos regenerados. Neste momento, deve-se identificar cada poliplóide putativo, bem como sua progênie, de modo a evitar a multiplicação desnecessária de indivíduos ou células diplóides e potencializar as chances de clonagem de setores autotetraplóides estáveis. Além disso, o número de plantas diplóides procedentes de explantes tratados é reduzido no momento da aclimatização, o que facilita o posterior trabalho do melhorista nas etapas de pré-seleção *ex vitro* e confirmação dos autotetraplóides.

Medidas preventivas que reduzam ou eliminem a multiplicação desnecessária de plantas ou setores diplóides ou ainda mixoplóides são fundamentais em trabalhos de poliploidização *in vitro*, em especial em Musáceas. Isso porque, embora a colchicina apresente uma alta fitotoxicidade quando aplicada em altas concentrações e período longo de tempo de aplicação, a capacidade morfogênica dos explantes em induzir brotos axilares é restabelecida, após um ou dois subcultivos, resultando em proliferação de brotos em escala exponencial. Fato este mais expressivo em bananeiras diplóides, em decorrência de suas características de maior capacidade de adaptação. Já na indução de poliplóides com orizalina, tem-se um efeito fitotóxico menor nos explantes e, na maioria dos casos, um aumento na indução de brotos axilares. Portanto, contrário a colchicina, o número de brotos por tratamento, ao final dos subcultivos, tende a ser bem maior.

#### **2.4.2 Pré-seleção e identificação dos autotetraplóides putativos**

Em geral, depois de aplicados os antimitóticos, efetuado as repicagens e o enraizamento *in vitro* das brotações, um grande número de plantas são produzidas e devem ser submetidas à aclimatização *ex vitro*. Todavia, entre as plantas tratadas e regeneradas algumas, ou mesmo a maioria pode não ter os cromossomos duplicados surgindo assim as mixoplóides, diplóides ou aneuplóides. Por essa razão, na fase *in vitro* e ou *ex vitro* (aclimatização) deve-se realizar a pré-seleção dos prováveis poliplóides (poliplóides putativos). Para tanto, normalmente, a seleção baseia-se nas características morfológicas e ou estruturais. No caso *in vitro*, a pré-seleção é conduzida durante os subcultivos imediatamente posteriores à poliploidização.

O principal objetivo da pré-seleção é diferenciar as plantas não duplicadas (diplóides) dos poliplóides e assim reduzir significativamente o trabalho de multiplicação e o número de plantas produzidas. Desta forma, é possível reduzir o número de plantas que terão que ser analisadas para confirmação da ploidia que poderá ser feita pela quantificação do DNA nuclear, por citometria de fluxo, e ou contagem do número de cromossomos em meristemas de raízes, que é muito mais trabalhosa.

O método mais simples de identificar poliplóides putativos é aquele que baseia-se na morfológica das plantas. A associação entre o nível de ploidia e as características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliplóides, principalmente porque esses apresentam células e órgãos maiores, ou “efeito gigas” (SOUZA; QUEIROZ, 2004). Em bananeira, os poliplóides normalmente apresentam folhas arcadas e com limbo mais espesso, maior razão entre largura e comprimento foliar, maior pigmentação nas folhas, pseudocaule mais espesso, plantas robustas, plantas mais compactas e crescimento lento. Poliplóides também demonstram maior resistência à perda de água pelas folhas.

Contudo, nem sempre é possível distinguir os diferentes níveis de ploidia com base somente em características morfológicas, principalmente por causa de fatores ambientais expressos no fenótipo, sendo necessária a posterior confirmação da ploidia mediante citometria de fluxo ou contagem de cromossomos. No entanto, a confirmação por esses métodos é laboriosa e dificultada quando se trabalha com elevado número de plantas.

Uma estratégia promissora na identificação rápida dos poliplóides pode ser aquela baseada na espessura da folha. No entanto, a medida precisa da espessura foliar também não é prática. Buscou-se então medir esta característica de forma indireta, com base na densidade foliar. A este respeito, estudos realizados na Embrapa Mandioca e Fruticultura têm demonstrado ser possível

selecionar poliplóides de bananeiras de maior espessura de folha, mediante o resultado da relação peso e área foliar. Esta técnica consiste na retirada de discos, de área conhecida, na região do terço médio do limbo foliar, com a posterior obtenção do peso fresco e seco. Com isso, é possível determinar a densidade específica foliar (razão entre o peso seco ou fresco de discos foliares e a área do disco). Assim, os poliplóides estariam entre os indivíduos que apresentassem maior densidade das folhas.

Até o presente, os resultados demonstraram haver uma boa correlação entre a relação peso e área foliar e o nível de ploidia em bananeira. Em geral, as plantas poliplóides apresentam uma maior densidade foliar se comparada a plantas diplóides, sendo essa relação maior quando se considera o peso fresco.

#### **2.4.3 Citometria de fluxo**

O uso das características morfológicas na identificação de poliplóides, embora seja de fácil aplicação, não é preciso. Em trabalhos de poliploidização de diplóides de bananeira, o principal objetivo é obter plantas com o número de cromossomos duplicados e estáveis, que possam ser utilizadas em cruzamentos. Para tanto, é imprescindível determinar com precisão a ploidia das plantas submetidas aos tratamentos para duplicação.

Um método simples e seguro de avaliar a ploidia é por meio da determinação do conteúdo de DNA em núcleos de células, utilizando-se para isso a citometria de fluxo (DOLEZEL; BARTOS, 2005; DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007). Esta técnica baseia-se na análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (DOLEZEL, 1997). Desta forma é possível distinguir um diplóide do poliplóide,

tetraplóide, mixoplóide e até mesmo aneuplóides, a depender dos procedimentos e refinamentos da técnica. Além disso, a técnica de citometria de fluxo é bem estabelecida e vem sendo usada com sucesso em bananeira (DOLEZEL; DOLEZELOVÁ; NOVÁK, 1994; LYSÁK et al., 1999; NSABIMANA; STADEN, 2006; ROUX et al., 2003).

Por ser um método de fácil aplicação, a quantidade de amostras de bananeira analisada por citometria de fluxo pode ser elevada, quando comparada à contagem do número de cromossomos em células em metáfase, que é uma técnica muito trabalhosa. Vale ressaltar que, graças à citometria de fluxo, citoquimeras (mixoplóides) podem ser identificadas e descartadas. Este descarte pode também ser realizado ao nível de plantas *in vitro*, o que possibilita o descarte de plantas mixoplóides antes mesmo da etapa de aclimatização (BAKRY et al., 2007).

Comparado aos métodos citológicos clássicos, a citometria de fluxo apresenta uma série de vantagens descritas a seguir: o menor tempo requerido para analisar grande quantidade de plantas; pode ser aplicado a qualquer tecido da planta, portanto, não requer tecido contendo células meristemáticas e apresenta melhor ajuste para pré-selecionar grande número de plantas poliplóides (DOLEZEL; BARTOS, 2005; DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007; LEUS et al., 2009). Ademais, a citometria de fluxo possibilita identificar de forma eficiente e rápida aneuplóides em *Musa* spp., que são tradicionalmente detectados por contagem de cromossomos, um método mais laborioso e inadequado para uso em grande escala. Desta forma, a detecção de aneuplóides mediante citometria de fluxo é de particular importância para a bananeira, onde, a ocorrência deste tipo de plóidia é frequente (ROUX et al., 2003), como o tipo mosaico observado por Reuveni et al. (1986) em bananeiras multiplicadas *in vitro*.

A comparação da citometria de fluxo com a contagem do número de cromossomos na identificação dos aneuplóides de bananeira foi realizada por Roux et al. (2003) que utilizaram plantas da quarta geração oriundas de ápices caulinares irradiados ( $^{60}\text{Co}$ , 35 Gy), que obtiveram uma alta correlação ( $R^2=0,90$ ) entre os resultados do conteúdo de DNA (índice de DNA) e de contagem de cromossomos, tanto em plantas euplóides (33 cromossomos) quanto aneuplóides (31 ou 32 cromossomos).

Na prática, contudo, é importante destacar que as análises de citometria de fluxo requerem disponibilidade de mão-de-obra para preparar as amostras e obter a suspensão de núcleos, principalmente se houver necessidade de avaliar um grande número de plantas em pouco tempo. Igualmente importante é a disponibilidade de citômetro e de pessoa treinada corretamente para operar o aparelho e interpretar os histogramas. Portanto, como todo método, há limitações e vantagens, devendo-se considerar o objetivo do trabalho e se os resultados alcançados justificam a aplicação do método.

Com base nos resultados já obtidos, a quantificação precisa de DNA usando o citômetro, às vezes, se torna difícil devido aos histogramas que não expressam com exatidão o verdadeiro conteúdo cromossômico, o que pode levar a resultados imprecisos. A estratégia para contornar tais problemas seria realizar diversas repetições por planta, o que na prática torna-se impossível.

#### **2.4.4 Contagem de cromossomos**

Embora apresente uma série de vantagens para determinação da ploidia, a citometria de fluxo não é tão precisa como a contagem de cromossomos, que se constitui no método mais seguro e barato para caracterizar a ploidia (BAKRY; SHEPHERD, 2008). Porém, as dificuldades no uso dessa técnica

citológica clássica a coloca em desvantagem comparada à quantificação do DNA nuclear, sobretudo, quando se dispõe de grande número de plantas (BAKRY et al., 2007). Outra limitação da contagem de cromossomos é que esta técnica não reflete a ploidia de todas as três camadas histogênicas (LI, LII e LIII), uma vez que apenas a camada LIII é representada nos meristemas de raízes (ROUX et al., 2003).

Por outro lado, a determinação do número de cromossomos é uma técnica muito simples, segura e não depende de equipamentos caros como o citômetro. Isso é possível porque as mudanças mais evidentes que ocorrem nos cromossomos, em mitose, são perfeitamente observadas mediante preparações de lâminas simples, obtidas de tecidos com células em divisão, tais como ponta de raízes (KASAHARA, 2001).

Em bananeira, a contagem do número de cromossomos é dificultada por problemas na preparação das lâminas tais como obtenção de várias células metafásicas com cromossomos bem espalhados sem sobreposição, além do pequeno tamanho dos cromossomos (1 a 2  $\mu\text{m}$ ). As limitações na preparação das lâminas e obtenção de boas metafases estão associadas principalmente à rigidez da parede celular (DOLEZEL et al., 1998).

Entre os protocolos de obtenção de células metafásicas existentes, a maioria utiliza meristemas extraídos de ponta de raízes. Um método inovador foi proposto por Dolezel et al. (1998) e se baseia no isolamento de protoplastos de meristemas de raízes. De acordo com esses autores, embora seja um método mais laborioso do que o tradicionalmente empregado, o uso de protoplastos para contagem de cromossomos apresenta várias vantagens importantes, a saber: a) as raízes pré-tratadas com antimitóticos e até mesmo os protoplastos isolados podem ser armazenados em freezer e utilizados para preparação de lâminas quando necessário; b) partindo de um simples procedimento de isolamento, 10 a

20 lâminas podem ser preparadas em pouco tempo; c) sob condições ótimas, o método resulta em cromossomos espalhados com alta qualidade; d) os cromossomos não são sobrepostos por uma parede celular. Além disso, a coloração do citoplasma é fraca ou mesmo completamente ausente, o que facilita a contagem e análise dos cromossomos.

Conforme pode ser verificado, as etapas de pré-seleção e confirmação da ploidia (por citometria de fluxo ou análise citogenética) são determinantes em trabalhos de duplicação de cromossomos com antimitóticos e o posterior uso dos autotetraplóides na produção de triploides secundários. Portanto, em adição a um método eficiente e prático de indução de autotetraplóides, a técnica de poliploidização *in vitro* requer também métodos práticos e seguros para a pré-seleção dos indivíduos poliplóides e posterior confirmação da ploidia, seja em condições *in vitro* ou *ex vitro* (aclimatização ou no campo).

Além dos métodos já citados, a pré-seleção e ou identificação dos poliplóides pode ser verificado com base em características anatômicas e morfológicas como espessura do limbo foliar (anatomia foliar), tamanho de células e análise do tamanho e densidade de estômatos (DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; HAMMIL; SMITH; DODD, 1992). Esse método tem sido bastante útil, pois têm possibilitado a distinção de plantas diplóides das plantas supostamente poliplóides, reduzindo significativamente o número de plantas que devem ser submetidas à confirmação de sua ploidia mediante análises citogenéticas (contagem de cromossomos), acelerando assim o processo de seleção (SOUZA; QUEIROZ, 2004). Todavia, estas características são também influenciadas pelas condições ambientais.

Outro método usado na determinação do nível de ploidia, também conhecido como método indireto, é a caracterização citoanatômica e morfológica do grão de pólen, útil para plantas em produção (SOUZA;

QUEIROZ, 2004; TENKOUANO et al., 1998), bem como mediante características como o número de cloroplastos nas células-guarda dos estômatos (GANGA; CHEZHIYAN, 2002; GANGA; CHEZHIYAN; KUMAR, 2002; TENKOUANO et al., 1998). Conforme se pode observar, a ploidia pode ser verificada por diversos métodos, mais ou menos precisos, cujos resultados podem ser correlacionados estatisticamente. No entanto, o mais adequado depende da natureza do trabalho.

#### **2.4.5 Utilização dos autotetraplóides na geração de triplóides secundários**

Com relação ao comportamento das plantas autotetraplóides resultantes da duplicação do número de cromossomos com antimitóticos, sob condições de campo, existem poucos relatos. Entre os trabalhos já realizados, apenas Bakry et al. (2007) conduziram estudos de tal natureza, o que evidencia a necessidade de pesquisas nesta área.

De acordo com Bakry et al. (2007), as plantas autotetraplóides apresentaram, após diferentes ciclos vegetativos, as seguintes características: arquitetura arcada das folhas, redução global do vigor em todos os genótipos de *Musa acuminata* (AA) e uma alta inibição na emissão de brotações, mais acentuada em genótipos com presença do genoma. Quanto ao reduzido vigor observado nos autotetraplóides, os autores atribuíram esse fenômeno à redução global da heterose decorrente da poliploidização. Todavia, esses autores não consideram a redução no vigor como sendo uma limitação, pois o interesse não está no próprio fenótipo dessas plantas, mas na habilidade dessas em transmitir o valor fenotípico do diplóide original às progênies triplóides.

Ainda quanto ao comportamento em campo, Bakry et al. (2007) afirmam que todas as plantas duplicadas floresceram sob condições tropicais, com flores

masculinas e femininas bem formadas. Ademais, essas plantas foram utilizadas em cruzamentos com clones diplóides, tendo como resultado a produção de triplóides, indicando que os gametófitos derivados dos autotetraplóides eram diplóides. É importante acrescentar que, todas as plantas autotetraplóides permaneceram estáveis após sua transferência para o campo e após alguns anos de observações. Além disso, nenhuma reversão para o nível diplóide foi observada, sendo esta estabilidade atribuída ao resultado de uma acurada seleção realizada sob condições *in vitro* e por citometria de fluxo.

Na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical plantas tetraplóides já foram obtidas. As primeiras tentativas de cruzamentos usando os tetraplóides como genitor feminino não obtiveram êxito com nenhum dos diplóides melhorados na Embrapa. Novos ciclos de cruzamentos estão sendo realizados e desta vez usando os diplóides como genitores femininos e tetraplóides como fornecedores de pólen, já que os testes de viabilidade têm mostrado que os grãos pólen dos autopoliplóides são viáveis.

## **2.5 Limitações e desafios no uso da poliploidização no melhoramento de bananeira**

Embora a técnica de poliploidização *in vitro* venha se tornando uma importante estratégia de melhoramento não-convencional em bananeira, existem dificuldades em produzir plantas autotetraplóides estáveis em grande quantidade. Os resultados têm comprovado haver certa especificidade entre fatores como tipo de antimitótico, genótipo, tipo de explante e manipulação deste antes e após o tratamento de poliploidização. Assim, estes fatores têm limitado o uso rotineiro e em escala de um único protocolo nos diversos centros de pesquisa.

Os ápices caulinares são os principais explantes usados na duplicação de cromossomos em Musáceas, o que constitui em outro fator limitante ao sucesso da poliploidização, já que esta estrutura está associada à ocorrência de mixoplóides<sup>14</sup>. Os ápices caulinares possuem três ou mais camadas de células histogênicas independentes em diferentes fases de divisão celular, apresentam várias bainhas e ou primórdios foliares que recobrem o domo meristemático e com isso dificultam a atuação homogênea e efetiva do antimitótico aplicado. Por isto faz-se necessário o subcultivo do ápice, pelo menos por três vezes, após a indução de poliploidização, com o objetivo de dissociar os autotetraplóides estáveis dos mixoplóides e diplóides. Dessa forma, facilitar o posterior trabalho do melhorista na identificação e confirmação das bananeiras autotetraplóides (ROUX et al., 2004). Os mixoplóides em geral não são interessantes para o melhoramento, já que esse nível de ploidia invariavelmente leva à infertilidade parcial ou total da planta.

Uma alternativa atualmente proposta para contornar o problema de mixoploidia é utilizar protoplastos ou suspensões de células embriogênicas como explante. Esta técnica possibilita a manipulação de grandes quantidades de material vegetal além de minimizar ou evitar a produção de mixoplóides, uma vez que a planta regenerada terá origem de uma célula simples. O uso de explante unicelular facilita a atuação e eficiência do agente antimitótico, dispensa os subcultivos para dissociação das plantas desejadas, reduz o tempo e aumenta a quantidade de autotetraplóides obtidos, por eliminar a clonagem de plantas não duplicadas. No entanto, até o presente, não há relato de protocolo sobre o tratamento de células diplóides com colchicina ou orizalina para indução de autotetraplóides de bananeira com o uso de suspensões de células

---

<sup>14</sup> Mixoplóide é aqui considerado como uma planta que apresente células do mesmo tecido com várias ploidias diferentes (2x-4x, por exemplo)

embriogênicas. Portanto, para utilizar essa técnica, torna-se necessário estabelecer protocolos eficientes e de fácil reprodução para indução de células embriogênicas de diplóides de bananeira e de regeneração de plantas tratadas com antimitóticos.

A esse respeito, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa – vem conduzindo estudos com o objetivo de obter suspensão de células embriogênicas de bananeiras diplóides e utilizá-las na duplicação de cromossomos.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- a) Pode-se concluir que existe uma grande perspectiva de uso de poliploidia no melhoramento da bananeira, desde que se contorne o problema da mixoploidia. No entanto, não há uma técnica eficiente sobre a aplicação da duplicação de cromossomos em bananeira. Nesse contexto, nota-se grande variação nos protocolos utilizados para poliploidização em bananeira.
- b) A duplicação do número de cromossomos de bananeiras diplóides *in vitro* é atualmente utilizada em programas de melhoramento genético de países como França, Malásia, Índia, Áustria, Austrália e Brasil. Os maiores progressos têm sido obtidos na França (CIRAD-Bios, Montpellier), com a utilização de autotetraplóides como parentais e geração de híbridos triplóides secundários promissores.
- c) Apesar dos avanços já alcançados, há necessidade de estabelecer, com base em correlações entre caracteres morfológicos e a ploidia, técnicas mais práticas e seguras de pré-seleção dos poliplóides putativos. A este respeito, os resultados alcançados na Embrapa têm possibilitado o uso da massa específica de discos foliares na distinção de diplóides e poliplóides oriundos da poliploidização *in vitro*. Ademais, faltam estudos sobre o comportamento meiótico, agrônômico em campo e utilização dos autotetraplóides na geração de triplóides secundários.
- d) Os autotetraplóides produzidos deixam a desejar com relação à fertilidade. Portanto, necessita-se produzir centenas desses poliplóides de forma a se detectar plantas que sejam férteis. Ao resolver este problema, resta buscar indivíduos com características

agronômicas desejáveis como genitor masculino ou feminino, fato este que implica na demanda de um maior número de plantas.

- e) A indução de poliplóides em células embriogênicas ainda apresenta uma série de entraves tais como: definição de protocolos eficientes para obter células embriogênicas de bananeiras diplóides de interesse e que sejam de fácil reprodução; determinar o tipo de antimitótico, a concentração e o tempo de exposição eficiente à obtenção de plantas autotetraplóides; desenvolver protocolo eficiente de regeneração das plantas duplicadas após a poliploidização *in vitro*.
- f) Em médio e longo prazo, a perspectiva é obter suspensão de células embriogênicas de diplóides promissores e utilizá-las como explante para duplicação cromossômica. Outra estratégia em potencial é associar a sincronização do ciclo celular mediante tratamento dos explantes com hidroxauréia antes da aplicação do antimitótico. Tais estratégias podem contornar não apenas a esterilidade observada em genótipos triploides, como também evitar ou reduzir o problema de mixoploidia frequente em trabalhos de indução de poliploidização em bananeira. Contudo, até o presente momento inexistem trabalhos conclusivos a este respeito.

## REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP Consultoria e Comércio, 2009. 194 p.
- ALEZA, P. et al. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, n. 12, p. 1837-1846, Dec. 2009.
- ASIF, M. J.; MAK, C.; YASMIN, O. R. Polyploid induction in a local wild banana (*Musa acuminata* spp. malaccensis). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahone, v. 3, n. 5, p. 740-743, 2000.
- BAKRY, F. et al. Genetic improvement of banana. In: JAIN, S. M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Ed.). **Breeding plantation tree crops: tropical species**. London: Springer, 2009. p. 3-46.
- \_\_\_\_\_. In liquid medium colchicines treatment inducuz non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, Paris, v. 62, n. 1, p. 3-12, Jan. 2007.
- BAKRY, F.; SHEPHERD, K. Chromosome count on banana root tip squashes. **Fruits**, Paris, v. 63, n. 3, p. 179-181, May/June 2008.
- BOUVIER, L. et al. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 123, n. 2, p. 255-262, Jan. 2002.
- CARVALHO, J. F. R.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 80, n. 1, p. 69-75, Jan. 2005.
- CHAI, M. et al. Biotechnology and *in vitro* mutagenesis for banana improvement. In: JAIN, S. M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular, biology, and induced mutations**. Leuven: Science Publishers, 2004. p. 59-77.
- CHEN, Z. J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 377-406, Sept. 2007.

DICTIONARY of agriculture. 3. ed. London: A & C Black, 2006. 269 p.

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

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Feb. 2005.

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

DOLEZEL, J. et al. A novel method to prepare slides for high resolution chromosome studies in *Musa* spp. **Infomusa**, Montpellier, v. 7, n. 1, p. 3-4, 1998.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, London, v. 2, p. 2233-2244, Sept. 2007.

DUREN, M. van et al. 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.

ESCANDÓN, A. S.; HAGIWARA, J. C.; ALDERETE, L. M. A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro* polyploidization. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 9, n. 3, p. 181-186, 2006. Special issue.

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

GANGA, M.; CHEZHIAN, N.; KUMAR, N. Stomatal and chloroplast traits as ploidy assessment techniques for ploidy screening of *in vitro* induced tetraploids of banana. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 52, n. 2/3, p. 113-120, 2002.

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

HANSEN, A. L. et al. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, n. 2, p. 231-237, June 1998.

HANSEN, N. J. P.; ANDERSEN, S. B. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 88, n. 1, p. 159-164, July 1996.

\_\_\_\_\_. *In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 102, n. 1, p. 101-108, July 2003.

JESUS-GONZALES, L. de; WEATHERS, P. J. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 8, p. 809-813, Apr. 2003.

JOUBÈS, J.; CHEVALIER, C. Endoreduplication in higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, n. 5/6, p. 735-745, Aug. 2000.

KASAHARA, S. **Práticas de citogenética**. Rio Claro: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. 70 p.

KHOSRAVI, P. et al. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. **Euphytica**, Wageningen, v. 160, n. 2, p. 267-275, Mar. 2008.

KOHLER, C.; SCHEID, O. M.; ERILOVA, A. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploidy plants. **Trends in Genetics**, London, v. 26, n. 3, p. 142-148, Jan. 2010.

LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Genomic plasticity and diversity of polyploid plants. **Science**, New York, v. 320, n. 5875, p. 481-483, Apr. 2008.

LEUS, L. et al. Flow cytometry for plant breeding. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 836, p. 221-226, Aug. 2009.

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

MADON, M. et al. Poliploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. **Journal of Oil Palm Research**, Benin City, v. 17, p. 110-123, Dec. 2005.

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

NSABIMANA, A.; STADEN, J. van. Ploidy investigation of bananas (*Musa* spp.) from the National Banana Germplasm Collection at Rubona Rwanda by flow cytometry. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 2, p. 302-305, May 2006.

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

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 467-501, Nov. 1998.

REUVENI, O. et al. Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. In: INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES MEETING, 1., 1986, Rome. **Resumes...** Rome: IBPGR, 1986. p. 36.

RODRIGUES, F. A. **Amiprofós-metil e colchicina na indução de tetraplóides em bananeira**. 2010. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RODRIGUES, M. G. V.; LEITE, M. A. V. Aspectos socioeconômicos da bananicultura. In: RODRIGUES, M. G. V.; DIAS, M. S. C.; PACHECO, D. D. (Org.). **Bananicultura irrigada: inovações tecnológicas**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2008. p. 7-13.

ROUX, N. S. et al. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 5, p. 483-490, Jan. 2003.

\_\_\_\_\_. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutant in *Musa* spp. In: JAIN, S. M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular, biology, and induced mutations**. Leuven: Science Publishers, 2004. p. 33-43.

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

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; AGNOL, M. D. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 31-36, jan./fev. 2001.

SHAO, J.; CHEN, C.; DENG, X. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 241-246, Dec. 2003.

SHEPHERD, K. Banana breeding: past and present. **Acta Horticulturae**, Palo Alto, n. 196, p. 37-43, Mar. 1987.

SILVA, S. O. et al. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.

\_\_\_\_\_. Cultivares. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. rev. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 85-105.

\_\_\_\_\_. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 157 p.

SILVA, S. O.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V. Variedades. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 29, n. 245, p. 78-83, 2008.

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, maio/jun. 2004.

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

TENKOUANO, A. et al. Ploidy determination in *Musa* germplasm using pollen and chloroplast characteristics. **HortScience**, Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 889-890, May 1998.

UDALL, J. A.; WENDEL, J. F. Polyploidy and crop improvement. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 1, p. S3-S14, Nov. 2006. Supplement.

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

\_\_\_\_\_. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. **American Journal of Botany**, New York, v. 54, n. 1, p. 24-36, Jan. 1967.

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

ZENG, S. et al. In vitro induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, n. 1, p. 85-93, Oct. 2006.

**CAPÍTULO 3: Indução de autotetraplóides em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos *in vitro***

## RESUMO

Estratégias de melhoramento genético não-convencional como a poliploidização *in vitro* são de grande importância para contornar o problema de esterilidade em bananeira e gerar novas cultivares triploides. No entanto, as pesquisas sobre a duplicação de cromossomos ainda são incipientes e pouco se sabe acerca das respostas morfofisiológicas *in vitro* dos explantes após o tratamento de poliploidização especialmente, no Brasil. O objetivo deste trabalho foi determinar as respostas morfofisiológicas de ápices caulinares de diplóides de *Musa acuminata* Cola submetidos à poliploidização *in vitro*. Foram avaliados os antimitóticos colchicina (0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mM) e orizalina (0; 15; 22,5 e 30  $\mu$ M) e dois tempos de poliploidização (24 e 48 horas para colchicina, 3 e 7 dias para orizalina). Observou-se que a aplicação de colchicina reduz significativamente a sobrevivência e o número médio de brotos, respostas estas intensificadas com o aumento da concentração e do tempo de exposição ao antimitótico. Já a orizalina, nas concentrações e nos tempos de exposição avaliados, teve um baixo efeito negativo na sobrevivência dos ápices caulinares. Ao contrário do verificado para colchicina, o número médio de brotos por explante foi influenciado positivamente pelo tratamento com orizalina. Embora haja alta mortalidade e níveis acentuados de oxidação dos explantes primários tratados e regenerados, com ambos os antimitóticos, a capacidade morfogênica destes é restabelecida após sucessivos subcultivos em meio fresco, de forma que as brotações produzidas são alongadas/enraizadas e aclimatizadas com sucesso. Ambos os antimitóticos colchicina e orizalina em concentração e tempo de exposição, adequados, podem ser usados na poliploidização de bananeira. Vale ressaltar que a colchicina apresenta maior fitotoxicidade, do que a orizalina, no entanto, promove maior variabilidade morfológica nas plantas regeneradas e pré-selecionadas como poliploides putativos.

Palavras-chave: *Musa acuminata*. Biotecnologia. Antimitóticos. Morfogênese *in vitro*.

## ABSTRACT

Non-conventional breeding strategies such as *in vitro* polyploidization are very important to overcome sterility problems and develop new triploid banana varieties. However, research efforts regarding chromosome duplication are still small and little is known about the *in vitro* morphophysiological responses of explants after the polyploidization treatment. The objective of the present work was to determine the morphophysiological responses of shoot apex of diploid *Musa acuminata* Cola submitted to *in vitro* polyploidization. The antimytotics colchicine (0; 1,25; 2,5; 3,75 and 5 mM) and oryzaline (0; 15; 22,5 e 30  $\mu$ M) and two polyploidization periods (24 and 48 hours for colchicine and 3 and 7 days for oryzaline), were evaluated. The application of colchicine reduced the survival and average number of shoots considerably; responses which were intensified by the increase in the concentration and time of exposure to the antimytotic. For oryzaline, in the concentrations and periods of exposure evaluated, a negative effect in the survival of the shoot apex was observed. Contrary to the results with colchicine, the average number of shoots per explant was positively influenced by the oryzaline treatment. Although high mortality and accentuated oxidation of primary treated and regenerated explants occurred, with both antimytotics, their morphogenetic capacity was re-established after successive sub-cultivations in fresh media, so that the shoots produced were elongated/rooted and acclimatized successfully. Both antimytotics, colchicine and oryzaline in adequate concentration and time of exposure, can be used in banana polyploidization. It is worth mentioning that colchicine presents greater phytotoxicity than oryzaline; however, it promotes greater morphologic variability in regenerated and pre-selected plants as putative polyploids.

Keywords: *Musa acuminata*. Biotechnology. Antimytotic agents. *In vitro* morphogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

As variedades tipo Cavendish (Grande Naine e Nanicão) são as únicas com características adequadas para exportação e representam mais de 45% da produção mundial de bananas. Todavia, estes genótipos apresentam susceptibilidade às principais pragas da cultura da banana, possuem uma estreita base genética e necessitam de estudos que viabilizem seu melhoramento e garantam sua proteção fitossanitária (BAKRY et al., 2009; SILVA et al., 2002).

O método de melhoramento mais utilizado em bananeira é o convencional mediante o cruzamento de diplóides pré-melhorados AA com triplóides comerciais com a geração de híbridos tetraplóides com boas características de fruto e resistência a pragas. Essa é a metodologia mais empregada na Embrapa e já possibilitou obter uma série de cultivares. No entanto, este método é ineficiente para criação de cultivares triplóides AAA do Subgrupo Cavendish, por causa da esterilidade e partenocarpia observadas nesses genótipos.

Uma das alternativas para contornar a esterilidade em bananeira é o uso da duplicação do número de cromossomos *in vitro* com antimitóticos, técnica que pode complementar as atividades convencionais de melhoramento genético. Dessa forma, é possível obter híbridos triplóides secundários resistentes a pragas e com boas características agronômicas, mediante a produção *in vitro* de plantas autotetraplóides férteis que, depois de avaliadas e selecionadas no campo, são utilizadas como genitor em cruzamentos com diplóides melhorados (BAKRY et al., 2007; DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; SILVA et al., 2001).

A principal forma de induzir autotetraplóides em bananeira consiste na aplicação de colchicina em ápices caulinares sob condições *in vitro*, seguido de

sucessivos subcultivos para regeneração das plantas, pré-seleção e identificação dos tetraplóides estáveis. No entanto, a colchicina ( $C_{22}H_{25}NO_6$ ) possui alta toxicidade ao ser humano, elevada fitotoxicidade *in vitro* e, quando utilizada em altas concentrações, pode aumentar a frequência de mixoploidia (DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002). Por estas razões, outros compostos como a orizalina têm sido estudados em protocolos de duplicação de cromossomos. Este antimitótico tem como vantagens a baixa fitotoxidez *in vitro*, maior afinidade com a proteína do fuso mitótico (tubulina) e por consequência uma alta atividade de poliploidização. Além disso, por causa de sua maior afinidade com a tubulina, a orizalina é geralmente utilizada em concentrações micromolares, com eficiência similar ou mesmo superior à colchicina (KHOSRAVI et al., 2008).

Vários são os fatores que determinam o sucesso da poliploidização *in vitro* tais como o tipo, concentração, período de exposição e formas de aplicação do agente antimitótico; o tipo, condição fisiológica e a manipulação dos explantes antes e após o tratamento; além do genótipo utilizado. Assim, esses fatores devem ser pré-requisitos para o desenvolvimento da técnica de duplicação de cromossomos em Musáceas (ASIF; MAK; YASMIN, 2000; BAKRY et al., 2007; GANGA; CHEZHIYAN, 2002). Acrescenta-se ainda que, até o presente, a maioria dos protocolos de duplicação cromossômica tem empregado altas concentrações de colchicina variável principalmente em função do genótipo.

Uma etapa indispensável em trabalhos de poliploidização induzida consiste em determinar a sensibilidade dos explantes quanto ao tipo, concentração e período de aplicação do antimitóticos, bem como avaliar as respostas morfo genéticas e fisiológicas *in vitro* e *ex vitro* dos ápices caulinares. Para isto, os parâmetros avaliados incluem a redução da sobrevivência, altura de

brotos ou plantas, determinação da concentração que ocasione 50% de letalidade, quantidade de novas brotações e número total de plantas regeneradas.

O trabalho teve por objetivo determinar os efeitos *in vitro* da aplicação de agentes antimitóticos, colchicina e orizalina, em ápices caulinares de diplóides de *Musa acuminata* Cola.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, no Município de Cruz das Almas, Estado da Bahia.

### **2.1 Material vegetal**

Foram utilizados os genótipos diplóides de bananeira (AA) Tong Dok Mak (TDM), NBA-14 e Malbut, escolhidos por possuírem boa qualidade de fruto. O material vegetal foi obtido do Banco Ativo de Germoplasma de Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

### **2.2 Obtenção dos ápices caulinares**

Os ápices caulinares foram inicialmente estabelecidos *in vitro* em meio MS com 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) e posteriormente subcultivados no mesmo meio com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP por três vezes, a intervalos de 37 dias. O meio foi suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), Phytigel (1,7 g L<sup>-1</sup>) e pH 5.8. Os explantes desenvolveram-se em sala de crescimento artificial com fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes (40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), a temperatura de 25 °C.

### **2.3 Tratamento dos ápices caulinares com colchicina e orizalina**

A poliploidização foi efetuada em ápices caulinares de 5-8 mm, obtidos a partir de brotações axilares da quarta geração *in vitro*. Para isto, os brotos

tiveram o pseudocaule cortado 5-8 mm acima da base e remoção de algumas bainhas foliares (Figura 3) para facilitar a atuação do antimitótico nas células meristemáticas.

Os tratamentos consistiram de concentrações de colchicina (0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mM) (Sigma<sup>®</sup>) com o tempo de 24 e 48 horas e orizalina (0; 15; 22,5 e 30  $\mu$ M) (Supelco<sup>®</sup>), com exposição, de 3 e 7 dias, disposto em esquema fatorial 5x2 e 4x2 respectivamente para colchicina e orizalina.

Para isso, soluções estoque de colchicina (0,1 M) e orizalina (1 mM) foram preparadas dissolvendo-se os antimitóticos em álcool 95% e completando o volume final com água Mili Q. Em seguida, a solução foi esterilizada a frio em filtro milipore (0,22  $\mu$ m) e as concentrações finais (tratamentos) adicionadas ao meio líquido já autoclavado. Foram utilizados seis frascos de 250 mL, cada um contendo 20 mL do tratamento e cinco explantes, os quais permaneceram em agitação (120 rpm) em sala de crescimento artificial (temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas a  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecido por lâmpadas fluorescentes tubulares do tipo luz do dia especial). Após a aplicação dos tratamentos, os explantes (dez por frasco) foram mantidos em 40 mL de água destilada e autoclavada, por 24 horas a 120 rpm. Por fim, os explantes foram transferidos para seis frascos (cinco explantes por frasco) contendo 40 mL de meio fresco semi-sólido (Figura 1), fase denominada de primeiro subcultivo pós-tratamento.

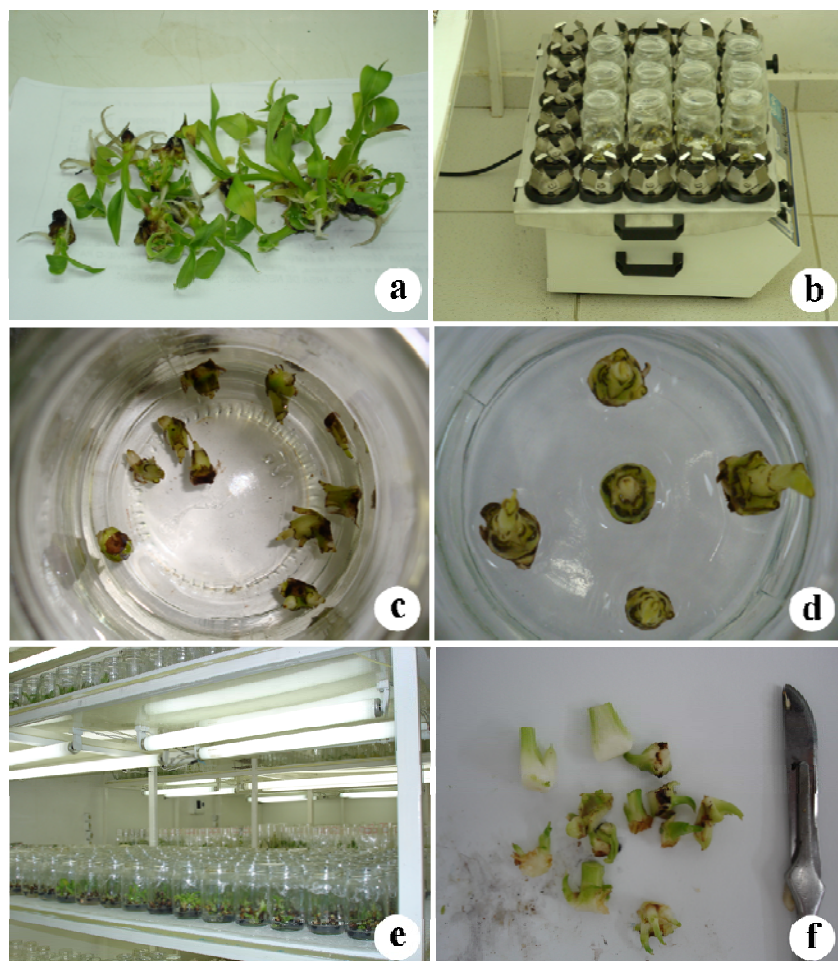


Figura 3 Etapas do processo de poliploidização de bananeira. (a) Brotações axilares (genótipo NBA-14) utilizada para obtenção de ápices caulinares; (b) tratamento dos antimitóticos sob agitação; (c) explantes tratados com colchicina, no momento do enxágüe em água esterilizada e (d) gemas recém-transferidas para meio de cultura semissólido; (e) primeiro subcultivo após a aplicação dos tratamentos; (f) manuseio dos explantes para retirada das partes oxidadas e subdivisão dos brotos formados.

Em todas as etapas, utilizaram-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com BAP ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH 5.8, e autoclavado por 20 min. Somente na fase de aplicação dos tratamentos foram utilizados meio líquido, nas demais fases o meio foi solidificado com Phytigel ( $1,7 \text{ g L}^{-1}$ ).

#### **2.4 Avaliações morfogênicas e fisiológicas *in vitro***

Trinta dias após os tratamentos dos ápices caulinares, primeiro subcultivo, foram avaliados os seguintes parâmetros: percentual de sobrevivência de explante, número de brotações em cada explante inicial, níveis de oxidação fenólica, presença de calo, número total de brotos.

Após as avaliações, os explantes sobreviventes (brotações axilares e gemas existentes) foram subcultivados, por mais duas vezes em meio fresco, em intervalos de 35 a 40 dias. Os indivíduos produzidos desenvolveram-se em sala de crescimento artificial. Em seguida, as brotações foram alongadas e enraizadas em meio MS desprovido de BAP, sob luz natural, e as plantas obtidas aclimatizadas.

O delineamento usado foi inteiramente ao acaso, com seis repetições, cada uma representada por um frasco e cinco explantes, num total de 30 explantes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, e foram ajustadas equações, quando apropriado. Dados referentes à percentagem de sobrevivência e número de brotos foram transformados para arco seno  $(x/100)^{0,5}$  e  $(x+1)^{0,5}$  respectivamente.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As respostas morfo genéticas e fisiológicas dos ápices caulinares submetidos à poliploidização variaram com o tipo de antimitótico (colchicina ou orizalina), sua concentração e tempo de aplicação do tratamento. Diferenças também foram observadas entre os genótipos.

#### **3.1 Respostas morfofisiológicas dos ápices caulinares tratados com colchicina**

Os resultados de sobrevivência dos ápices caulinares em resposta à aplicação *in vitro* de colchicina, para os três genótipos estudados, estão apresentados na Figura 4. Conforme pode ser observado, interação significativa entre os fatores avaliados (concentração x tempo de exposição) foi verificada para os genótipos Tong Dok Mak e Malbut, enquanto para o diplóide NBA-14, apenas o fator tempo de exposição foi significativo. Além disso, um bom ajuste das equações de regressão para as características avaliadas ( $R^2 > 0,90^{**}$ ) foi observado, em todos os genótipos.

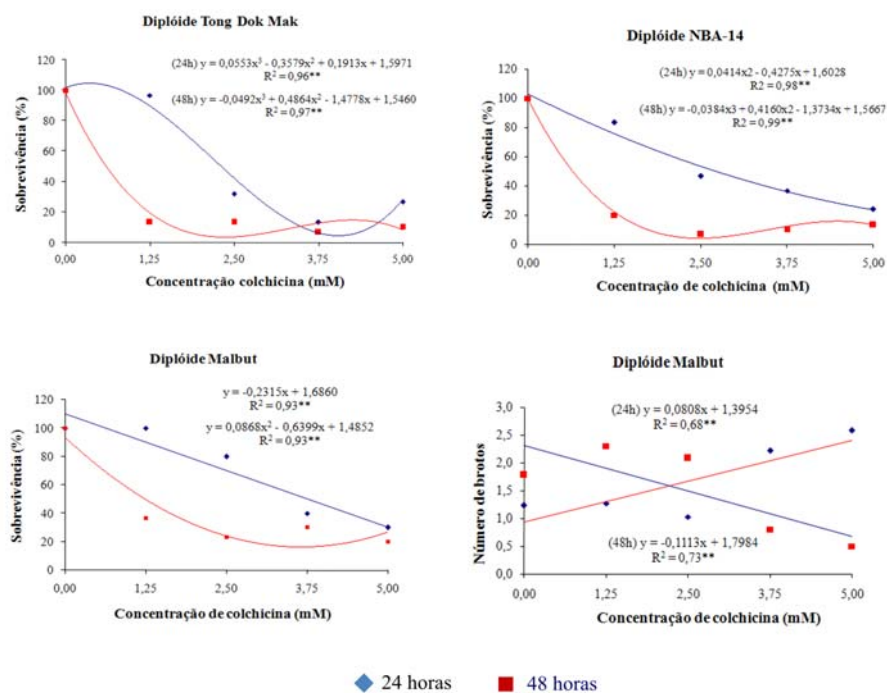


Figura 4 Equações de regressão para a sobrevivência e número de brotações, por genótipo diplóide, em função das concentrações de colchicina e do tempo de exposição (24 horas e 48 horas). Média de seis repetições. \*\* Significativos a 1% de probabilidade. Cruz das Almas-BA, 2010.

De modo geral, houve uma tendência de redução na sobrevivência com o aumento da concentração e tempo de exposição, diminuição essa intensificada a partir de 1,25 mM e em 48 horas (Figuras 2 e 3), com relação a essa característica, o Malbut foi o menos sensível ao tratamento (Figura 2).

Ao induzir poliploidização em embriões ginogênicos de *Allium cepa* L., Grzebelus e Adamus (2004) observaram que a colchicina provocou redução significativa na taxa de sobrevivência dos explantes, em comparação com o

controle; ao contrário do tempo de exposição, que não teve efeito significativo sobre a taxa de regeneração dos embriões.

Para número de brotos, nenhum modelo polinomial (até o 3º grau) foi ajustado no genótipo TDM, que apresentou médias variando de 0,63 brotos (0 mM) a 1,67 brotos (5 mM), e de 1,27 brotos (0 mM) a 0,08 brotos (5 mM), com 24 e 48 horas de exposição. No genótipo NBA-14, não houve efeito significativo do fator concentração, diferentemente do tempo de exposição, onde maior e menor número de brotos foi observado com 24 horas (1,46 brotos) e 48 horas (0,50 brotos) respectivamente (teste t,  $P < 0,05$ ). Já no diplóide Malbut, houve uma tendência de aumento do número de brotos com o aumento da concentração às 24 horas de exposição, ao passo que, às 48 horas, essa tendência foi de redução, principalmente após 2,5 mM de colchicina (Figura 5).

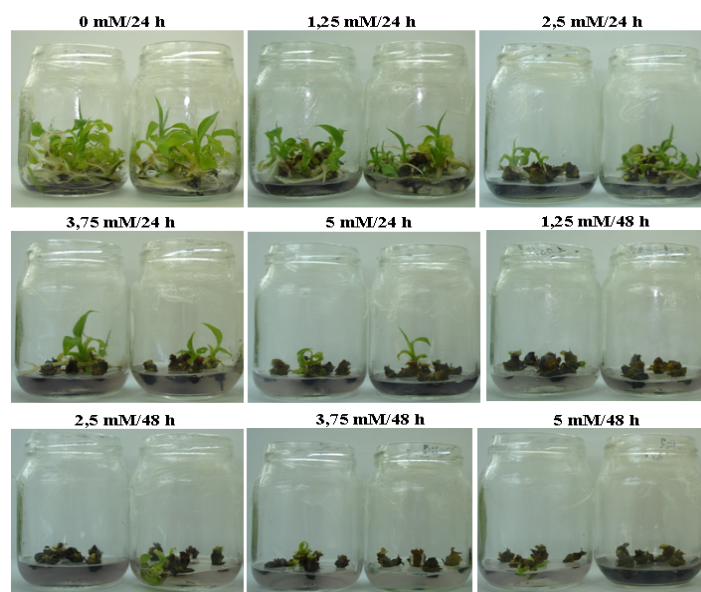


Figura 5 Efeitos morfofisiológicos *in vitro* da indução de autotetraplóides no genótipo NBA-14 pelo uso de colchicina, aos 30 dias após o tratamento (primeiro subcultivo). Cruz das Almas-BA, 2010.

É importante destacar que, após uma semana do tratamento, foi observado que a maioria dos explantes tinha cor verde, mas, após duas semanas apresentavam extremidades oxidadas (coloração escura), o que resultou em necrose e morte do ápice caulinar primário. Embora uma alta mortalidade tenha sido observada nos explantes primários, verificou-se, na maioria dos casos, a ocorrência de gemas axilares na base dos explantes, provavelmente consequência da quebra de dominância apical. Portanto, a depender do tempo decorrido após a aplicação do antimitótico, explantes avaliados como mortos podem apresentar capacidade de produzir novas brotações.

Outros efeitos, resultantes da aplicação do antimitótico, tais como redução da emissão de raízes e de folhas, foram observados, principalmente com o aumento da concentração e do tempo de exposição à colchicina (Figuras 5 e 6). Embora o meio utilizado contenha BAP, cujo efeito principal é induzir brotos, foi observada a emissão de raízes após algum tempo de cultivo e principalmente nas baixas.

Os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com outros trabalhos, nos quais o tratamento com colchicina (2,5 mM a 10 mM), por 12, 24 e 36 horas, promoveu redução da sobrevivência dos explantes e do número de brotos regenerados e atraso na regeneração *in vitro* de brotos (emissão da primeira folha) em diplóides de bananeira AA e AB (DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002).

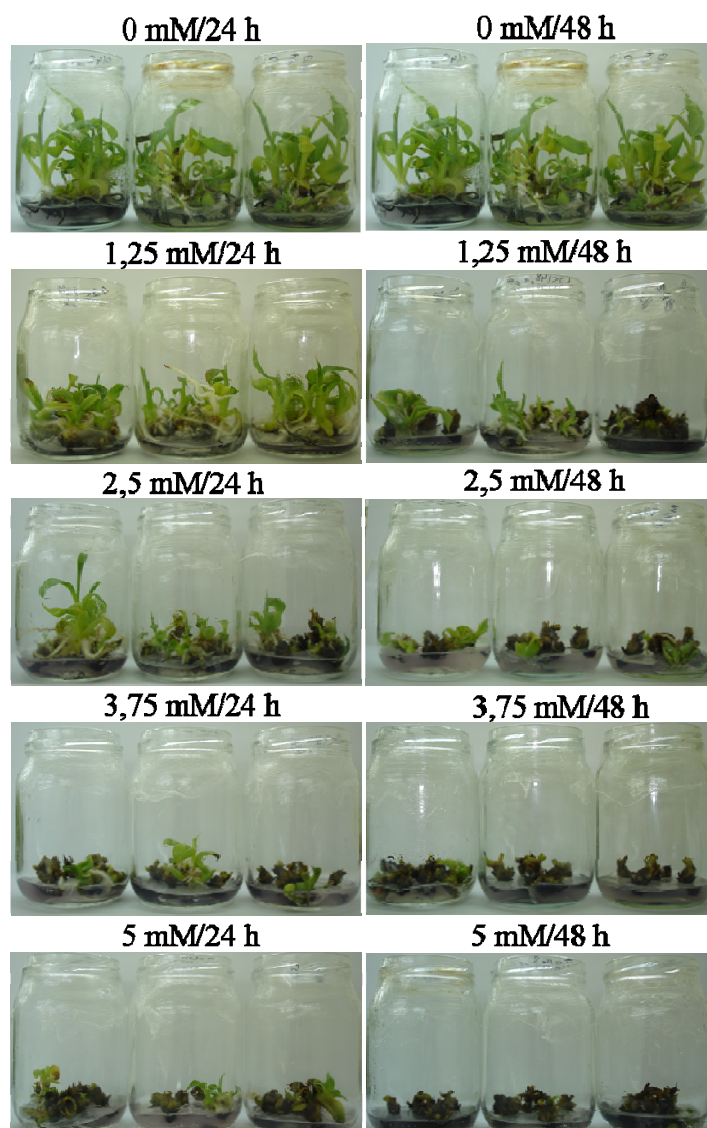


Figura 6 Efeitos morfofisiológicos *in vitro* da indução de autotetraplóides no genótipo Malbut pelo uso de colchicina, aos 30 dias do primeiro subcultivo. Cruz das Almas, 2010.

Acrescenta-se, ainda, que trinta dias após o tratamento com colchicina (primeiro subcultivo), sobretudo nas concentrações mais altas, houve formação de massas de células não-diferenciadas, tais como calos compactos na base dos explantes (Figura 7).

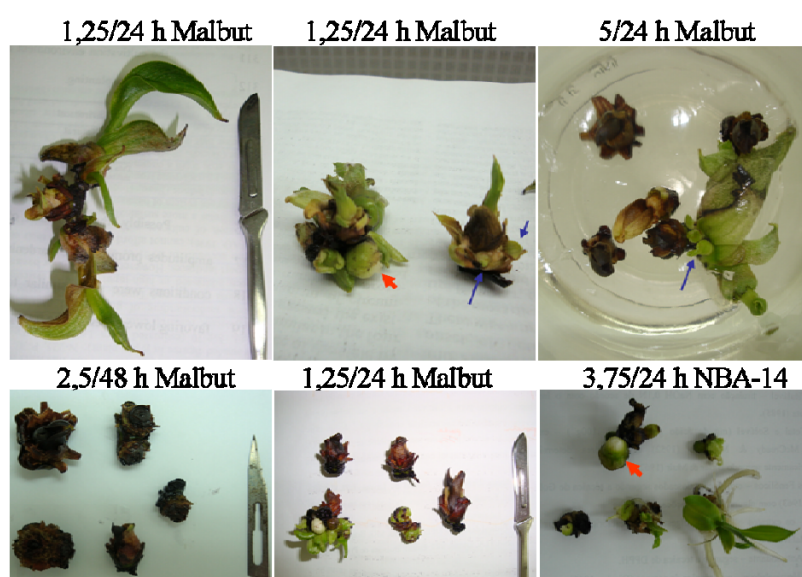


Figura 7 Efeitos morfofisiológicos *in vitro* da indução de autotetraplóides no genótipo Malbut pelo uso de colchicina, aos 30 dias após o tratamento. Cruz das Almas-BA, 2010.

Outro problema observado em trabalhos de poliploidização é aumento do número de brotos hiperhidricados durante a regeneração dos embriões tratados com colchicina, que impossibilita a obtenção de plantas totalmente desenvolvidas e por consequência sua aclimatização *ex vitro* (GRZEBELUS; ADAMUS, 2004). No presente trabalho, brotos com aspecto hiperhídrico foram observados em alguns casos, principalmente em concentrações altas de colchicina, além de níveis elevados de oxidação fenólica. Outro problema

observado no presente trabalho foi o aumento excessivo na indução de novas brotações quando se utilizou a orizalina.

### **3.2 Respostas morfofisiológicas dos ápices caulinares tratados com orizalina**

Os resultados de sobrevivência e número de brotos por explante de ápices caulinares, dos genótipos NBA-14 e TDM tratados com orizalina, estão apresentados nas Figuras 8-10.

À exceção do número de brotos no diplóide NBA-14, interação significativa foi observada entre os fatores estudados (concentração e tempo de exposição), com bom ajuste das equações de regressão para as variáveis avaliadas. Em geral, para os dois genótipos – TDM e NBA-14 – houve uma tendência de redução na sobrevivência com o aumento da concentração de orizalina, independente do tempo de exposição (Figura 8).

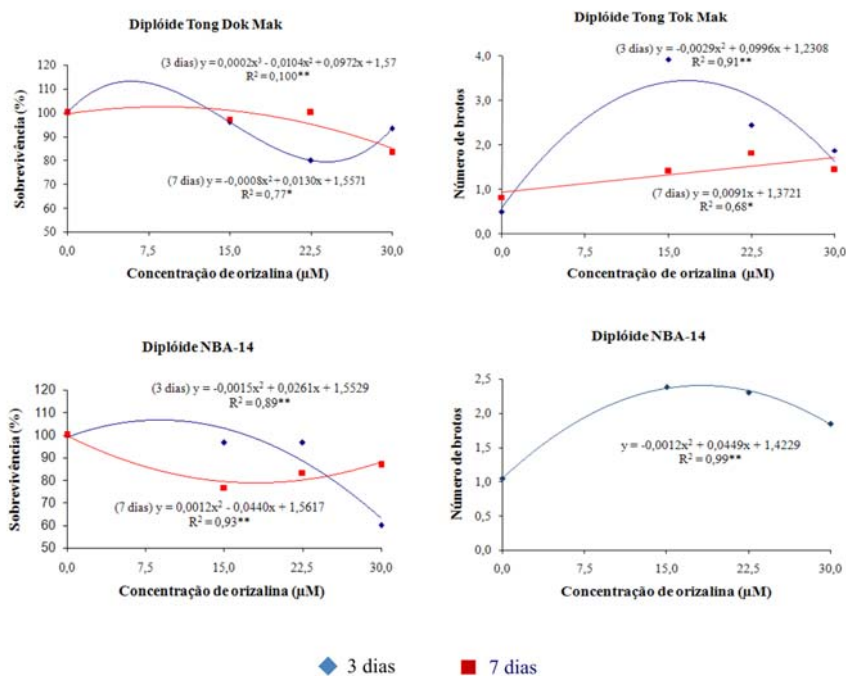


Figura 8 Equações de regressão para a sobrevivência e o número médio de brotações, por genótipo diplóide (TDM e NBA-14), em função das concentrações de orizalina e do tempo de exposição (3 dias e 7 dias). Média de seis repetições. \* e \*\* significativo a 5% e a 1% de probabilidade. Cruz das Almas-BA, 2010.

Quanto ao número de brotos, o genótipo Tong Dok Mak apresentou um comportamento quadrático quando os ápices caulinares foram tratados por três dias, enquanto aos sete dias houve uma resposta linear, com tendência de aumento do número de brotos com o incremento da concentração de orizalina. Para o genótipo NBA-14, apenas o fator concentração de orizalina teve efeito significativo, com comportamento quadrático (Figura 8). O aumento da proliferação de brotações em resposta à aplicação de orizalina está em concordância com outros trabalhos, e este efeito é atribuído ao fato de alguns

herbicidas do grupo das dinitroanilinas, como a orizalina, estimular o crescimento de plantas quando usado em baixas concentrações (DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002).

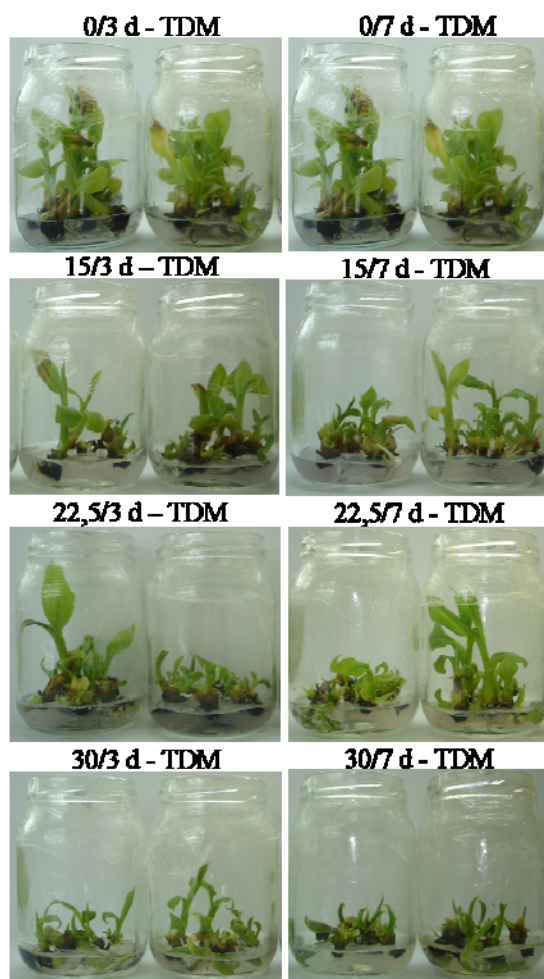


Figura 9 Efeitos morfofisiológicos *in vitro* da indução de autotetraplóides no genótipo Tong Dok Mak pelo uso orizalina, aos 30 dias após o tratamento. Cruz das Almas-BA, 2010.

No presente trabalho, a indução de poliploidia com orizalina promoveu diferentes respostas morfogênicas tais como a ocorrência de multibrotações na maioria dos ápices caulinares tratados (Figura 8). Esta resposta dificultou a imediata individualização dos brotos após o primeiro subcultivo. A estratégia usada nos primeiros dois subcultivos foi retirar as partes oxidadas e subdividir os explantes em pequenos fragmentos, ou grupo de pequenas brotações “clusters”, até uma melhor diferenciação de gemas em brotos, que só ocorreu no segundo e terceiro subcultivos. A este respeito, destaca-se a importância em conhecer os efeitos *in vitro* da aplicação de antimetabólitos, pois irá fornecer subsídios à tomada de decisões nas etapas de planejamento e condução de experimentos semelhantes.



Figura 10 Aspecto geral das brotações formadas no genótipo NBA-14 após 35 dias da indução de poliploidização com orizalina. Cruz das Almas-BA, 2010.

Além dos efeitos já mencionados, a aplicação de altas concentrações de orizalina também causou redução no crescimento dos ápices caulinares e brotações regeneradas e diminuição no número de folhas expandidas (Figuras 9 e 10).

### **3.3 Comparação dos efeitos da indução de poliploidização com colchicina e orizalina em ápices caulinares**

Ao se comparar os efeitos de ambos os antimitóticos pode-se verificar que, em relação à orizalina, a indução da duplicação de cromossomos com colchicina causa alta fitotoxidez e eleva os níveis de oxidação fenólica nos explantes. Ademais, a aplicação de colchicina promove maior ocorrência de tecido de calo e aumenta a variabilidade morfológica nas brotações regeneradas.

Embora a poliploidização com colchicina ocasione maior fitotoxicidade nos ápices caulinares do que a orizalina, a capacidade morfogenética dos explantes é retomada na medida em que se realizam os subcultivos (Figura 11), em ambos os antimitóticos.

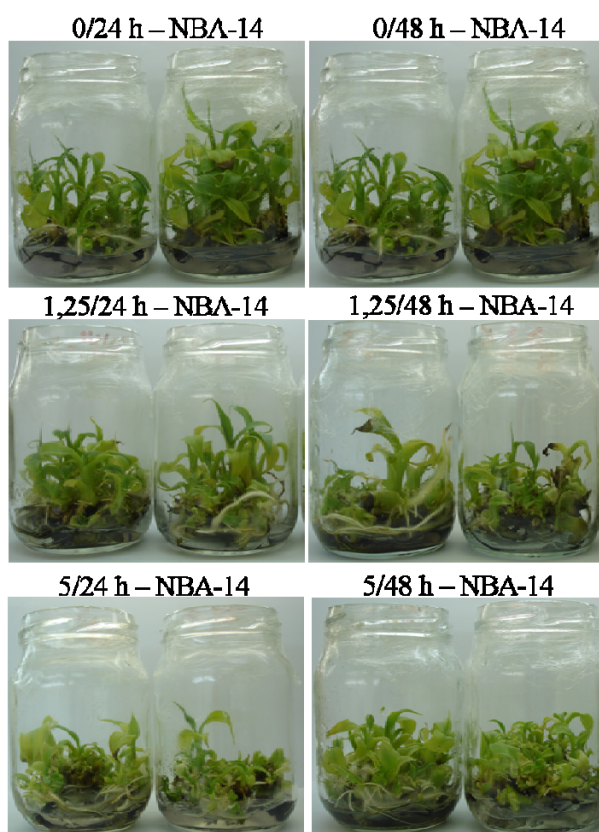


Figura 11 Aspecto geral das brotações do genótipo NBA-14 tratadas com colchicina e regeneradas, aos 40 dias do terceiro subcultivo após a indução de poliploidização.

Acrescenta-se ainda que o incremento no número de brotos, resultante da recuperação da capacidade morfogenética ou devido ao efeito positivo da orizalina, aumentou bastante a quantidade de plantas produzidas ao final do terceiro subcultivo (Figura 12a). As brotações tratadas e regeneradas, bem como àquelas procedentes do tratamento sem antimetabólico, foram alongadas e enraizadas com sucesso sob condições de luz natural (Figuras 12b-f).



Figura 12 (a) Vista geral de parte do material produzido ao final do terceiro subcultivo após a indução de poliploidização; (b e c) Visão externa e interna da estufa de enraizamento sob luz natural utilizada; (d-f) Aspecto das brotações em meio de alongamento e enraizamento, genótipo NBA-14 (d) e Malbut (e-f); (g-i) Plantas em processo de aclimatização em telado. Cruz das Almas-BA, 2010.

Todas as plantas produzidas com as diferentes concentrações dos antimitóticos apresentaram grande variação no tamanho (Figura 10h), ocorrendo em alguns casos morte de plantas após a transferência para a aclimatização. Tais perdas podem ter sido decorrentes do tamanho reduzido de algumas brotações e baixa quantidade de reservas existentes (acúmulo de matéria seca da parte aérea

e desenvolvimento do rizoma) (Figura 10h). No presente estudo, a alta percentagem de sobrevivência observada (Figura 10i), superior a 90% do total de plantas produzidas, é atribuída ao uso da luz natural na fase de enraizamento e alongamento *in vitro*. De acordo com Costa et al. (2009a, 2009b), o uso da luz natural na etapa de enraizamento *in vitro* promove rustificação e melhoria às plantas produzidas como, por exemplo, um maior espessamento dos parênquimas clorofilianos, paliçádico e esponjoso, além de reduzir a perda de água foliar e morte de plantas.

#### **4 CONCLUSÕES**

- a) Tanto a colchicina quanto a orizalina, em concentração e tempo de exposição adequados, podem ser usadas na poliploidização de bananeira;
- b) A colchicina apresenta maior fitotoxidez do que a orizalina, no entanto, promove maior variabilidade morfológica nas plantas regeneradas e pré-selecionadas como poliplóides putativos;
- c) A indução de poliploidização com orizalina aumenta a indução de novos brotos axilares.

## REFERÊNCIAS

- ASIF, M. J.; MAK, C.; YASMIN, O. R. Polyploid induction in a local wild banana (*Musa acuminata* spp. malaccensis). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 3, n. 5, p. 740-743, 2000.
- BAKRY, F. et al. Genetic improvement of banana. In: JAIN, S. M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Ed.). **Breeding plantation tree crops: tropical species**. New York: Springer, 2009. p. 3-46.
- \_\_\_\_\_. In liquid medium colchicines treatment inducuz non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, Paris, v. 62, n. 1, p. 3-12, Jan. 2007.
- COSTA, F. H. S. et al. Anatomical and physiological modifications of micropropagated 'caipira' banana plants under natural light. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 323-330, 2009a.
- \_\_\_\_\_. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 2, p. 303-311, 2009b.
- DUREN, M. van et al. 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.; CHEZHIAN, N. Influence of the antimitotic agents colchicines and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 77, n. 5, p. 572-575, Sept. 2002.
- GRZEBELUS, E.; ADAMUS, A. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 3, p. 569-574, Sept. 2004.
- KHOSRAVI, P. et al. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. **Euphytica**, Wageningen, v. 160, n. 2, p. 267-275, Sept. 2008.

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

SILVA, S. O. et al. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.

\_\_\_\_\_. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 101-157.

**CAPÍTULO 4: Técnicas de pré-seleção e identificação de poliplóides de bananeira oriundos da poliploidização *in vitro***

## RESUMO

A duplicação do número de cromossomos pode ser usada no melhoramento genético de cultivares de bananeiras estéreis, mediante a produção de autotetraplóides, com o posterior cruzamento com diplóides melhorados e geração de triplóides secundários. No entanto, essa técnica ainda necessita de algumas adaptações, sobretudo, na etapa de identificação dos prováveis poliplóides. O trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia eficiente e prática de pré-seleção e identificação de poliplóides de bananeira oriundos de diplóides tratados com colchicina e orizalina, em diferentes concentrações e tempos de aplicação. Para isto, as plantas induzidas à duplicação cromossômica foram submetidas à pré-seleção dos poliplóides putativos por meio de caracteres morfológicos. Em seguida, uma metodologia baseada na massa específica de discos foliares foi desenvolvida em genótipos de ploidia conhecida (diplóides AA, triplóides AAA e tetraplóide AAAA). Por fim, a técnica de discos foliares foi aplicada às plantas poliplóides pré-selecionadas. Pode-se concluir a colchicina induz maior variabilidade nas plantas regeneradas. É possível pré-selecionar poliplóides mediante caracteres morfológicos como arquitetura e altura da planta. A utilização da massa específica de discos foliares permite distinguir diplóides de tetraplóides, como também os poliplóides putativos oriundos da poliploidização *in vitro* com antimitóticos. A maioria das plantas poliplóides putativas identificadas utilizando-se a massa específica de discos foliares foi confirmada pela citometria de fluxo.

Palavras-chave: *Musa acuminata*. Duplicação cromossômica. Caracteres morfológicos. Citometria de fluxo.

## ABSTRACT

The duplication of the number of chromosomes can be used in genetic breeding of sterile banana cultivars by the production of autotetraploids and further crossing with improved diploids developing secondary triploids. However, this technique still needs some adaptations, above all, regarding the identification stage of probable polyploids. The objective of the present work was to develop a practical and efficient methodology of pre-selection and identification of banana polyploids from diploids treated with colchicine and oryzaline in different concentrations and time of application. Therefore, plants induced to duplicate their chromosomes were submitted to the pre-selection of putative polyploids by morphologic characteristics. Afterwards, a methodology based in the specific mass of leaf disks was developed in genotypes with known ploidy level (AA diploids, AAA triploids and AAAA tetraploids). Furthermore, the leaf disk technique was applied to the pre-selected polyploid plants. It can be concluded that colchicine induced greater variability in the regenerated plants. It is possible to pre-select polyploids by morphologic characteristics such as plant height and architecture. The use of specific mass of leaf disks enables to distinguish tetraploids as well as putative polyploids from *in vitro* polyploidization with antimytotics. Most of the putative polyploid plants identified by the specific mass of leaf disks were confirmed by flow cytometry.

Key-words: *Musa acuminata*. Chromosome duplication. Morphological characteristics. Flow cytometry.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de métodos não convencionais de melhoramento, a exemplo da indução de poliploidização *in vitro*, é uma importante estratégia para contornar a esterilidade em bananeira e gerar novas variedades triplóides. A duplicação cromossômica de diplóides promissores permite a produção de plantas autotetraplóides férteis que, depois de avaliadas e selecionadas em campo, são utilizadas em cruzamentos com diplóides melhorados para geração de triplóides secundários. Desta forma, é possível introduzir resistência a pragas nos híbridos gerados, selecionar e recomendar novas cultivares com frutos de boas características e partenocárpicas (BAKRY et al., 2007; SILVA et al., 2002; STOVER; BUDDENHAGEN, 1986).

Vários são os fatores que podem determinar o sucesso da poliploidização em bananeira, destacando-se o genótipo; tipo, concentração, período de exposição e formas de aplicação do agente antimitótico; além do desenvolvimento e uso de técnicas práticas e seguras para pré-seleção e identificação dos poliplóides putativos (BAKRY et al., 2007; GANGA; CHEZHIYAN, 2002).

Em geral, depois de efetuada a indução da duplicação de cromossomos, efetuadas as repicagens e o enraizamento *in vitro* das brotações regeneradas, um grande número de plantas são produzidas e devem ser submetidas à aclimatização. No entanto, entre as plantas tratadas e regeneradas algumas, ou mesmo a maioria podem não ter os cromossomos duplicados surgindo assim os mixoplóides, diplóides ou aneuplóides. Por este motivo é imprescindível a realização de uma pré-seleção dos prováveis poliplóides (poliplóides putativos) visando reduzir o número de plantas que terão que ser analisadas para confirmação da ploidia mediante a quantificação do DNA nuclear, por

citometria de fluxo, e ou contagem do número de cromossomos em meristemas de raízes, que é muito mais trabalhosa (BAKRY et al., 2007).

Normalmente, a pré-seleção é efetuada na fase de aclimatização e baseia-se nas características morfológicas e ou estruturais como resultado dos efeitos da poliploidização. A associação entre o nível de ploidia e as características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliplóides, principalmente porque esses apresentam células, tecidos e órgãos maiores, ou “efeito gigas” (SOUZA; QUEIROZ, 2004). Em bananeira, os poliplóides normalmente apresentam folhas arcadas e com limbo mais espesso, maior razão entre largura e comprimento foliar, maior pigmentação nas folhas, pseudocaule mais espesso, plantas robustas, plantas mais compactas e crescimento lento. Poliplóides também demonstram maior resistência à perda de água pelas folhas.

Contudo, nem sempre é possível distinguir os diferentes níveis de ploidia com base somente em características morfológicas, por causa da interação genótipo e ambiente. Sendo assim, métodos mais seguros devem ser utilizados, tais como a citometria de fluxo ou a contagem de cromossomos. No entanto, a confirmação da ploidia por esses métodos é laboriosa e dificultada quando se trabalha com elevado número de plantas e quando não se dispõe de um citômetro, cujo preço de aquisição é elevado.

Uma alternativa para identificação rápida dos poliplóides pode ser aquela baseada na espessura da folha. Porém, a medida precisa da espessura foliar também não é prática. Outra estratégia é medir a espessura do limbo foliar de forma indireta, com base na massa de discos foliares. Esta técnica consiste na retirada de discos, de área conhecida, na região do terço médio do limbo foliar, com a posterior obtenção da massa fresca e seca. Com isso, é possível determinar a massa específica foliar (razão entre o peso seco ou fresco de discos

foliares e a área do disco). Assim, os poliplóides estariam entre os indivíduos que apresentassem maior massa específica foliar.

O trabalho teve por objetivo avaliar morfologicamente plantas de bananeiras submetidas à indução da duplicação de cromossomos *in vitro* com colchicina e orizalina; desenvolver e aplicar uma técnica eficiente e prática de pré-seleção de poliplóides de bananeira com base na espessura foliar e identificar por citometria de fluxo as plantas poliplóides.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e Área Experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (Cruz das Almas, BA, Brasil).

### 2.1 Pré-seleção de poliplóides putativos com base em características

A pré-seleção foi realizada em plantas de *Musa acuminata* aclimatizadas por 90 dias, resultantes dos tratamentos de indução de poliploidização com colchicina (0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mM, por 24 e 48 horas) e orizalina (0; 15; 22,5 e 30  $\mu$ M, aplicadas por 3 e 7 dias). Para a aclimatização, as plantas alongadas e enraizadas em sala de crescimento de luz natural foram retiradas dos frascos de cultivo, submetidas à lavagem e poda de suas raízes, e, imediatamente transferidas para tubetes de 0,3 L preenchidos com substrato composto do substrato comercial Rendmax Citrus: vermiculita (3:1 v/v). Em seguida, as plantas foram mantidas em telado por 90 dias, coberto com filme de polietileno transparente (150 microns) e sombrite (50% de interceptação luminosa). A irrigação foi feita de forma manual e, a cada 15 dias, realizou-se adubação foliar com macro e micronutrientes.

Para a pré-seleção dos prováveis poliplóides utilizaram-se os seguintes parâmetros: altura da planta (cm), diâmetro do pseudocaule (mm) e número de folhas expandidas fotossinteticamente ativas. Em adição, foi determinado o percentual de sobrevivência das plantas, observada a arquitetura da planta e a espessura da folha (determinada mediante o tato), como também a ocorrência de variação somaclonal.

O delineamento foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos a estatística descritiva, enquanto os poliplóides putativos e material controle (diplóides) foram comparados pelo teste F. A sobrevivência das plantas foi avaliada por simples observação visual e determinada pela razão entre o número de plantas desenvolvidas e o número total transferido para as condições *ex vitro*, não tendo sido submetidas à análise de variância.

## **2.2 Adequação e uso da massa específica de discos foliares na diferenciação de diplóides e poliplóides de *Musa acuminata* cola**

A relação entre a massa e a área foliar pode possibilitar a identificação de indivíduos que apresentem maior espessura de folha, conforme verificado por Benincasa (1988), Scalon et al. (2001) e Witkowski e Lamont (1991). Esta técnica, ainda não desenvolvida para bananeira, foi primeiramente avaliada em genótipos de ploidia conhecida e posteriormente aplicada na pré-seleção de poliplóides putativos.

Para o desenvolvimento da metodologia foram utilizadas inicialmente plantas de genótipos diplóides AA (Lidi, Ouro, Tong Dok Mak, Malbut e NBA-14), triplóides AAA (Gros Michel e Grande Naine) e tetraplóide AAAA (Bucaneiro), aclimatizadas por 150 dias. As plantas foram obtidas mediante micropropagação de ápices caulinares e aclimatizadas conforme metodologia descrita no item 2.1, com exceção do recipiente, pois se utilizaram sacos de polietileno de três litros de capacidade. A irrigação foi conduzida de modo manual, no final da tarde do dia anterior à coleta das folhas.

Para obtenção dos discos foliares, as folhas foram coletadas de plantas na mesma idade, nas primeiras horas de cada manhã, entre seis e sete horas. Imediatamente após a excisão das folhas, estas foram mantidas em sacos

plásticos fechados para manter a umidade e evitar a perda excessiva de água por transpiração. Ao final da coleta, os sacos foram conduzidos ao laboratório para determinação da massa fresca e seca dos discos.

Os discos foliares foram retirados na região mediana do limbo foliar da primeira, segunda e terceira folha expandida (direção ápice base) (Figura 13). Para tanto, utilizou-se um vazador de 1,608 cm de diâmetro ( $2,0297 \text{ cm}^2$  de área interna).

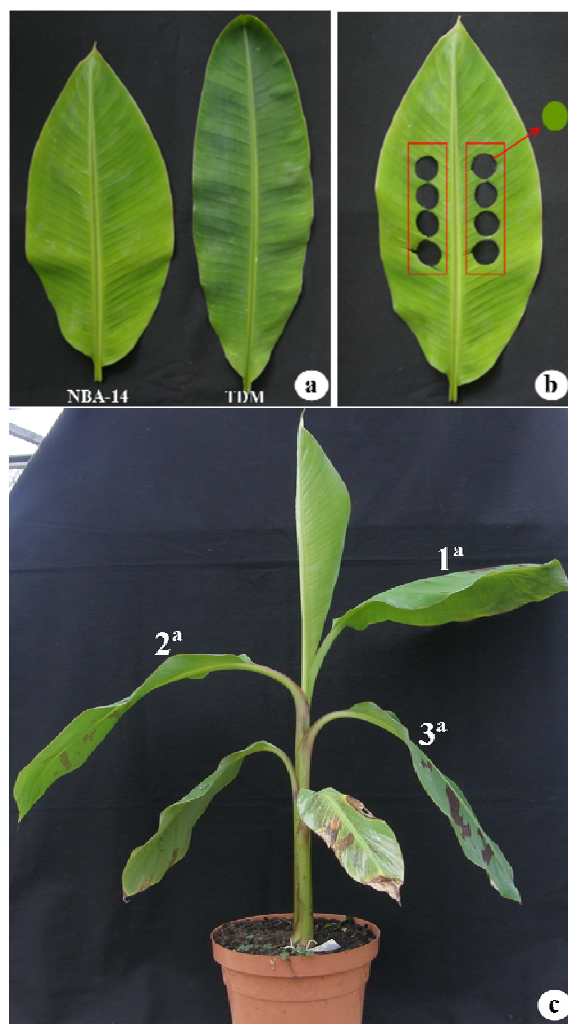


Figura 13 (a) Aspecto geral das folhas de bananeiras utilizadas para obtenção de discos foliares; (b) Detalhe da região mediana da folha utilizada para retirada dos discos foliares; (c) Planta do diplóide Malbut evidenciando a filotaxia das folhas na planta. Cruz das Almas-BA, 2010.

A massa fresca e seca de cada disco foi determinada em balança de precisão (0,001 g), sendo que a massa seca foi obtida após secagem em estufa de ventilação forçada (60 °C por 48 horas). Já a massa específica de cada disco, em  $\text{mg cm}^{-2}$ , foi determinada dividindo-se a massa fresca ou seca (mg) de cada disco pela área do vazador ( $\text{cm}^{-2}$ ).

Foram utilizadas de cinco a seis plantas por ploidia, sendo a quantidade de discos foliares retirados de cada folha variável conforme o tamanho desse órgão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

### **2.3 Uso de discos foliares na pré-seleção de poliplóides putativos de bananeira oriundos da poliploidização *in vitro* com agentes antimitóticos**

Nessa etapa, utilizaram-se plantas poliplóides putativas de *Musa acuminata* oriundas da etapa de pré-seleção *ex vitro* (item 2.1). No momento das avaliações, as plantas estavam acondicionadas em sacos de polietileno preto (3 litros) contendo a mistura composta de substrato comercial Rendmax Citrus® e fibra de coco (3:1). Durante este período, foi realizada adubação foliar e irrigação (item 2.1).

Cada planta pré-selecionada como provável poliplóide foi considerada aqui como um tratamento e comparada com plantas do tratamento controle (sem aplicação de colchicina ou orizalina). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-knot a 1% de probabilidade.

#### **2.4 Estimativa da quantidade de DNA nuclear e ploidia por citometria de fluxo**

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram conduzidos nos Laboratórios de Genética e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

Para cada planta induzida à poliploidização e pré-selecionada, foi utilizado aproximadamente de 20-30 mg de tecido foliar fresco, obtido a partir de uma amostra da folha mais jovem de cada planta. Como padrão externo de referência utilizou-se a mesma quantidade de tecido foliar de *Glycine max* e *Musa acuminata* Cola Calcutta4 (AA,  $2n=2x=22$ ). Para a preparação das amostras e obtenção de suspensão nuclear, o tecido foliar foi inicialmente triturado em um mililitro de tampão LB01 já adicionado à placa de Petri na presença de gelo. O tecido triturado em suspensão foi aspirado por meio de duas camadas de gaze e a suspensão de núcleos posteriormente filtrada em uma malha de 50  $\mu\text{m}$ . Em seguida, à suspensão nuclear foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio. Em cada amostra foram analisados pelo menos cinco mil núcleos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Pré-seleção de poliplóides putativos com base em características

Conforme pode ser verificado na Figura 14, uma grande quantidade de plantas foi submetida à aclimatização *ex vitro*. Em geral, não se verificou problemas de morte excessiva de plantas nessa etapa, de forma que alto percentual de sobrevivência foi obtido, independente do antimetabólico aplicado (dados não mostrados).



Figura 14 Aspecto geral da etapa de aclimatização das plantas de bananeiras submetidas à poliploidização *in vitro*. Cruz das Almas-BA, 2010.

Quando houve morte de plantas, esta foi associada ao tamanho reduzido de algumas brotações no momento da aclimatização (Figura 14b, c), provavelmente devido à baixa quantidade de reservas e dificuldade de superar o estresse decorrido da transferência para as condições *ex vitro*.

Com relação à morfologia das plantas, a indução da poliploidização com antimetabólitos, colchicina e orizalina, causou várias alterações, cujo tipo e frequência variaram com o genótipo, tipo, concentração e tempo de exposição ao antimetabólico. Como pode ser constatado na Figura 14d, logo após duas ou três semanas de aclimatização é possível distinguir entre as plantas aquelas com características de poliplóides.

Foi possível observar a ocorrência de variação somaclonal, sendo a mais evidente aquela associada ao aspecto de roseta da planta (enfazamento), caracterizado pela alteração na disposição das folhas no pseudocaule e arquitetura da planta, como também dificuldade de enraizamento de crescimento e aspecto coreáceo das folhas, que eram frágeis (Figura 15h-k). Ademais, verificaram-se plantas variegadas (Figura 15a, b), provavelmente em decorrência de alterações na expressão de genes responsáveis pela síntese de clorofila. Além dos efeitos já mencionados, deformações no limbo foliar foram constatadas entre as plantas submetidas à poliploidização (Figura 15c-f). Torna-se interessante que em programas de melhoramento se tenha variabilidade, de forma a facilitar a identificação e seleção de novos genótipos.

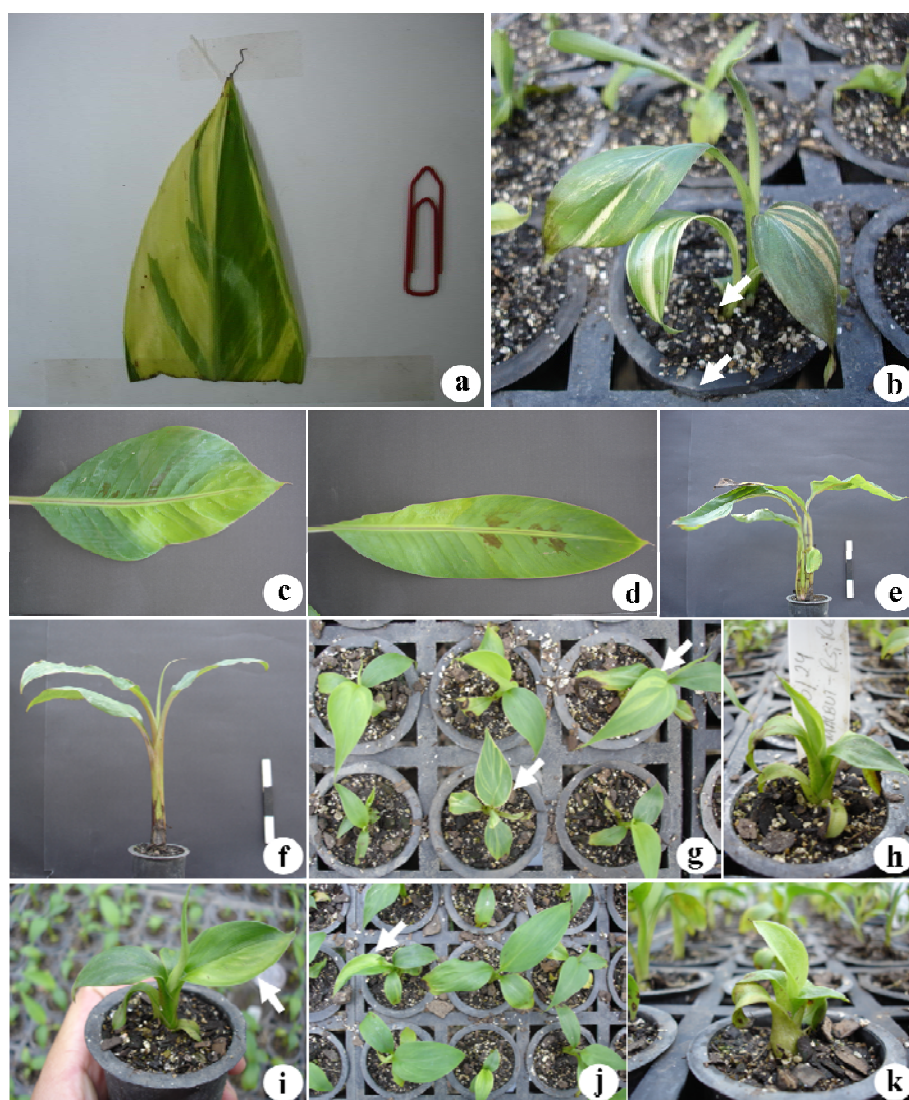


Figura 15 Variações somaclonais em plantas de bananeira oriundas da indução de poliploidização com antimitóticos. Cruz das Almas-BA, 2010.

A variabilidade existente permitiu a pré-seleção de dezenas de plantas com características poliplóides. Quando comparados às plantas controle (não

tratadas com antimetabólito), os poliplóides putativos pré-selecionados apresentaram folhas mais arcadas, menor crescimento e folhas mais largas e de cor verde mais intensa (Figuras 16-18). Foi possível, mediante o tato, a identificação de plantas com maior espessura do limbo foliar, fato que facilitou a pré-seleção.

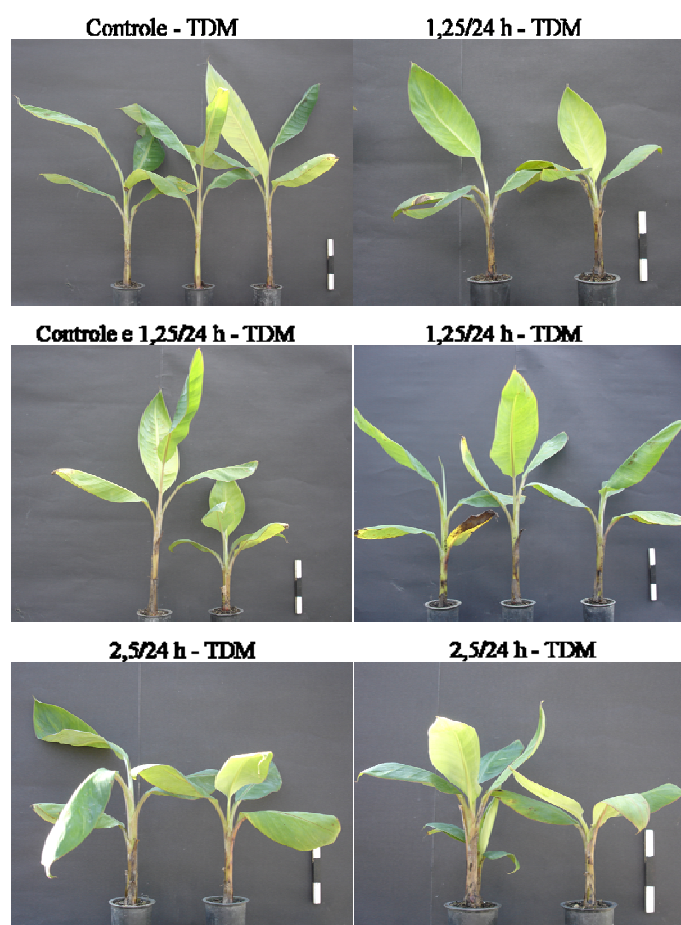


Figura 16 Plantas poliplóides putativas pré-selecionadas com base em caracteres morfológicos. Cruz das Almas-BA, 2010.

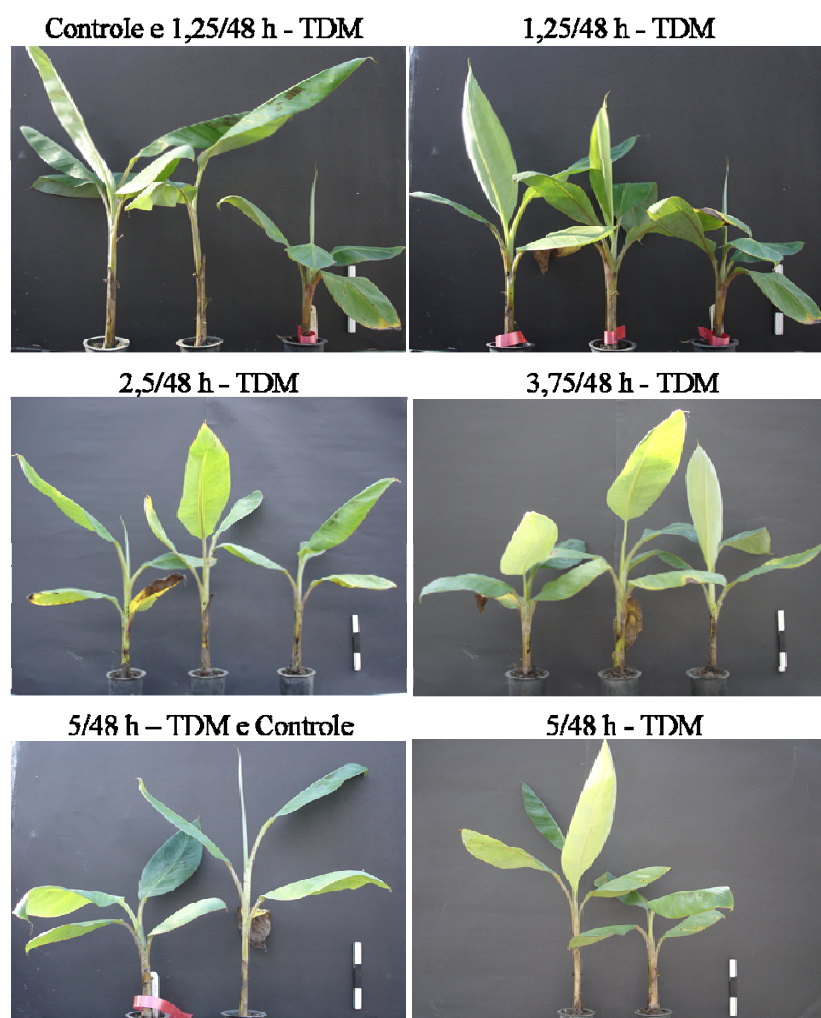


Figura 17 Plantas poliplóides putativos pré-selecionadas com base em caracteres morfológicos. Cruz das Almas-BA, 2010.

Outra alteração observada entre os prováveis poliplóides foi o aumento no conteúdo de antocianina nas folhas e pseudocaule (Figura 18a). Porém, esta modificação teve baixa frequência, ocorrendo em três ou cinco plantas no

máximo. Na Figura 18b é possível constatar a disposição em roseta das folhas e as deformações no limbo, conforme observado em algumas plantas no início da etapa de aclimatização (Figura 15h-k).

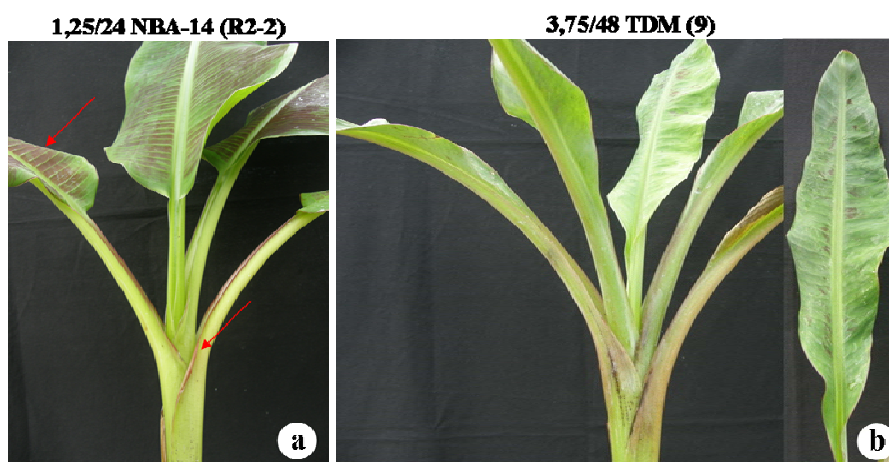


Figura 18 Alterações na pigmentação (a) e morfologia (b) em plantas poliplóides putativos pré-selecionadas. Cruz das Almas-BA, 2010.

A fase de pré-seleção é interessante, pois reduz a quantidade de plantas a serem avaliadas posteriormente quanto à quantidade de DNA nuclear (citometria de fluxo) e esta em relação às plantas analisadas mediante contagem do número de cromossomos.

## 2.2 Adequação e uso da massa específica de discos foliares na diferenciação de diplóides e poliplóides de *Musa acuminata* cola

Os resultados referentes à massa fresca e seca, bem como a massa específica dos discos foliares e umidade dos discos estão apresentados nas Tabelas 1-3. Como pode ser observado, foi possível distinguir plantas diplóides de tetraplóides e, em alguns casos, plantas diplóides de triplóides.

Tabela 1 Valores médios para massa fresca (PF) e seca (PS), em miligramas (mg); massa específica do disco foliar (base na massa fresca) (MED\_MF) e seca (MED\_MS), em miligramas por centímetro quadrado ( $\text{mg cm}^{-2}$ ); e umidade do disco foliar ( $\text{L m}^{-2}$ ) de plantas de bananeira, em função da ploidia. Cruz das Almas-BA, 2010.

Genótipo*	MF (mg)	MS (mg)	MED_PF ( $\text{mg cm}^{-2}$ )	MED_PS ( $\text{mg cm}^{-2}$ )	Umd_Disco ( $\text{L m}^{-2}$ )
<b>1ª Folha expandida</b>					
NBA-14 (AA)	95,73 ef	15,57 def	47,18 ef	7,67 def	0,40 ef
TDM (AA)	93,66 f	14,63 f	46,15 f	7,21 f	0,39 f
Lidi (AA)	91,74 f	15,19 ef	45,19 f	7,49 ef	0,38 f
Malbut (AA)	101,26 de	16,30 cd	49,89 de	8,03 cd	0,42 de
Ouro (AA)	103,24 d	15,66 de	50,87 d	7,72 de	0,43 d
Grande Naine (AAA)	128,73 b	20,33 a	63,42 b	10,01 a	0,53 b
Gros Michel (AAA)	118,21 c	16,33 c	58,24 c	8,29 c	0,50 c
Bucaneiro (AAAA)	136,73 a	18,28 b	67,36 a	9,01 b	0,58 a
F (Trat)	191,96**	62,48**	181,95**	62,45**	159,62**
CV (%)	9,29	10,51	9,29	10,51	10,67
Média geral	108,08	16,44	53,25	8,10	0,45

Médias seguidas por letras distintas, em cada variável resposta, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade. \* Plantas com 150 dias de aclimatização, sob condições de telado.

Tabela 2 Valores médios para massa fresca (PF) e seca (PS), em miligramas (mg); massa específica do disco foliar (base na massa fresca) (MED\_MF) e seca (MED\_MS), em miligramas por centímetro quadrado ( $\text{mg cm}^{-2}$ ); e umidade do disco foliar ( $\text{L m}^{-2}$ ) de plantas de bananeira, em função da ploidia. Cruz das Almas-BA, 2010.

Genótipo*	MF (mg)	MS (mg)	MED_PF ( $\text{mg cm}^{-2}$ )	MED_PS ( $\text{mg cm}^{-2}$ )	Umd_Disco ( $\text{L m}^{-2}$ )
<b>2ª Folha expandida</b>					
NBA-14 (AA)	100,23 de	16,04 bc	49,38 de	7,90 c	0,25 de
TDM (AA)	98,94 e	15,21 c	48,75 e	7,49 d	0,25 e
Lidi (AA)	98,38 e	15,16 c	48,47 e	7,47 d	0,25 e
Malbut (AA)	105,49 d	16,34 bc	51,97 d	8,05 c	0,26 d
Ouro (AA)	112,75 c	16,11 bc	55,55 c	7,94 c	0,28 c
Grande Naine (AAA)	140,93 a	21,94 a	69,43 a	10,81 a	0,35 a
Gros Michel (AAA)	122,18 b	19,63 ab	60,20 b	8,27 c	0,31 b
Bucaneiro (AAAA)	144,88 a	18,45 abc	71,38 a	9,09 b	0,36 a
F (Trat)	206,39**	5,58**	206,39**	136,13**	206,29**
CV (%)	8,76	42,69	8,76	8,08	8,77
Média geral	115,57	17,27	56,94	8,34	0,29

Médias seguidas por letras iguais, em cada variável resposta, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott, a 1% de probabilidade. Plantas com 150 dias de aclimatização, sob condições de telado.

Tabela 3 Valores médios para massa fresca (PF) e seca (PS), em miligramas (mg); massa específica do disco foliar (base na massa fresca) (MED\_MF) e seca (MED\_MS), em miligramas por centímetro quadrado ( $\text{mg cm}^{-2}$ ); e umidade do disco foliar ( $\text{L m}^{-2}$ ) de plantas de bananeira, em função da ploidia. Cruz das Almas-BA, 2010.

Genótipo*	MF (mg)	MS (mg)	MED_PF ( $\text{mg cm}^{-2}$ )	MED_PS ( $\text{mg cm}^{-2}$ )	Umd_Disco ( $\text{L m}^{-2}$ )
<b>3ª Folha expandida</b>					
NBA-14 (AA)	105,37 d	15,71 cd	51,91 d	7,74 cd	0,44 d
TDM (AA)	102,81 d	14,60 e	49,76 d	7,20 e	0,43 d
Lidi (AA)	103,91 d	15,76 cd	51,20 d	7,76 cd	0,43 d
Malbut (AA)	105,59 d	16,64 c	52,02 d	8,20 c	0,44 d
Ouro (AA)	119,53 c	15,66 cde	58,89 c	7,72 cde	0,51 c
Grande Naine (AAA)	142,40 a	21,01 a	70,16 a	10,35 a	0,60 a
Gros Michel (AAA)	127,99 b	15,57 de	63,06 b	7,67 de	0,55 b
Bucaneiro (AAAA)	140,07 a	17,74 b	69,01 a	8,74 b	0,60 a
F (Trat)	131,38**	55,98**	111,20**	55,97**	112,38**
CV (%)	8,46	10,29	9,37	10,29	9,8
Média geral	118,19	16,46	58,11	8,11	0,50

Médias seguidas por letras iguais, em cada variável resposta, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott, a 1% de probabilidade. Plantas com 150 dias de aclimatização, sob condições de telado.

Como esperado, houve variação nos resultados em função da posição da folha na planta. Com relação aos parâmetros avaliados, a massa fresca de discos, massa específica de discos foliares (base na massa fresca) e umidade dos discos foliares permitiram distinguir de forma mais eficiente plantas diplóides AA de tetraplóides AAAA.

### **2.3 Uso de discos foliares na pré-seleção de poliplóides putativos de bananeira oriundos da poliploidização *in vitro* com agentes antimitóticos**

De forma semelhante ao observado para as plantas de ploidia conhecida (item 5.2, Tabelas 1-3), a técnica de discos foliares permitiu diferenciar plantas diplóides não tratadas com antimitóticos de poliplóides putativos (pré-selecionados com base em caracteres morfológicos).

Na Tabela 4 são mostrados os resultados referentes ao genótipo NBA-14. Conforme pode ser constatado, todos os prováveis poliplóides pré-selecionados pertenceram a grupo(s) diferente(s) do diplóide (controle). Os resultados observados são confirmados pela análise de citometria de fluxo, ressaltando a importância e utilidade da massa específica de discos foliares na identificação de poliplóides em bananeira.

Tabela 4 Ploidia, quantidade relativa de DNA nuclear, valores médios para massa fresca e seca (mg) e massa específica (MED, mg cm<sup>-2</sup>) de discos foliares de poliplóides putativos de bananeira e diplóide (não tratado com antimitótico). Cruz das Almas-BA, 2010.

<b>Tratamento (genótipo NBA-14)</b>	<b>MF (mg)</b>	<b>MS (mg)</b>	<b>Umd_Disco (L m<sup>-2</sup>)</b>	<b>MED_MF (mg cm<sup>-2</sup>)</b>	<b>MED_MS (mg cm<sup>-2</sup>)</b>	<b>Ploidia</b>	<b>DNA (pg)</b>
2ª Folha expandida							
15 µM/3 dias (R6-planta 20)	121,74 b	15,95 c	0,52 b	59,98 b	7,86 c	4X	2,2
22,5 µM /7 dias (R6-planta 39)	129,15 a	17,40 b	0,55 a	63,63 a	8,57 b	4X	-
0 µM (planta 12)	80,93 c	11,93 d	0,34 d	39,87 c	5,88 c	2X	1,29
22,5 µM /7 dias (R4-planta 87)	118,13 b	18,71 a	0,49 c	58,20 b	9,22 a	4X	2,55
22,5 µM /7 dias (R4-planta 95)	118,88 b	15,76 c	0,51 c	58,57 b	7,77 c	4X	-
22,5 µM /7 dias (R4-planta 111)	116,10 b	15,31 c	0,50 c	57,20 b	7,54 c	4X	2,29
F (Trat)	89,95**	142,63**	7,40**	89,95**	142,65**	-	-
CV (%)	4,88	3,69	5,68	4,88	3,69	-	-
Média geral	113,17	15,69	0,48	55,76	7,73	-	-
2ª Folha expandida							
15 µM/3 dias (R6-planta 20)	115,49 b	15,66 b	0,49 a	56,90 b	7,72 b	4X	2,2
22,5 µM /7 dias (R6-planta 39)	115,78 b	15,57 b	0,49 a	57,05 b	7,67 b	4X	-
0 µM (planta 12)	77,98 c	12,36 e	0,32 b	38,42 c	6,09 e	2X	1,29
22,5 µM /7 dias (R4-planta 87)	119,34 a	14,61 c	0,52 a	58,80 a	7,20 c	4X	2,55
22,5 µM /7 dias (R4-planta 95)	122,95 a	16,60 a	0,53 a	60,58 a	8,18 a	4X	-
22,5 µM /7 dias (R4-planta 111)	115,21 b	13,11 d	0,50 a	56,76 b	6,46 d	4X	2,29
F (Trat)	76,80**	63,71**	67,48**	76,81**	63,65**	-	-
CV (%)	4,80	3,92	5,47	4,79	3,92	-	-
Média geral	110,92	14,61	0,48	54,65	7,20	-	-

Médias seguidas por letras iguais, em cada variável resposta, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott, a 1% de probabilidade.

Na Figura 19 estão apresentados os histogramas referentes a uma planta diplóide (BAG banana, Embrapa) e de vários poliplóides de bananeira pré-selecionados com base em caracteres morfológicos e massa de discos foliares.

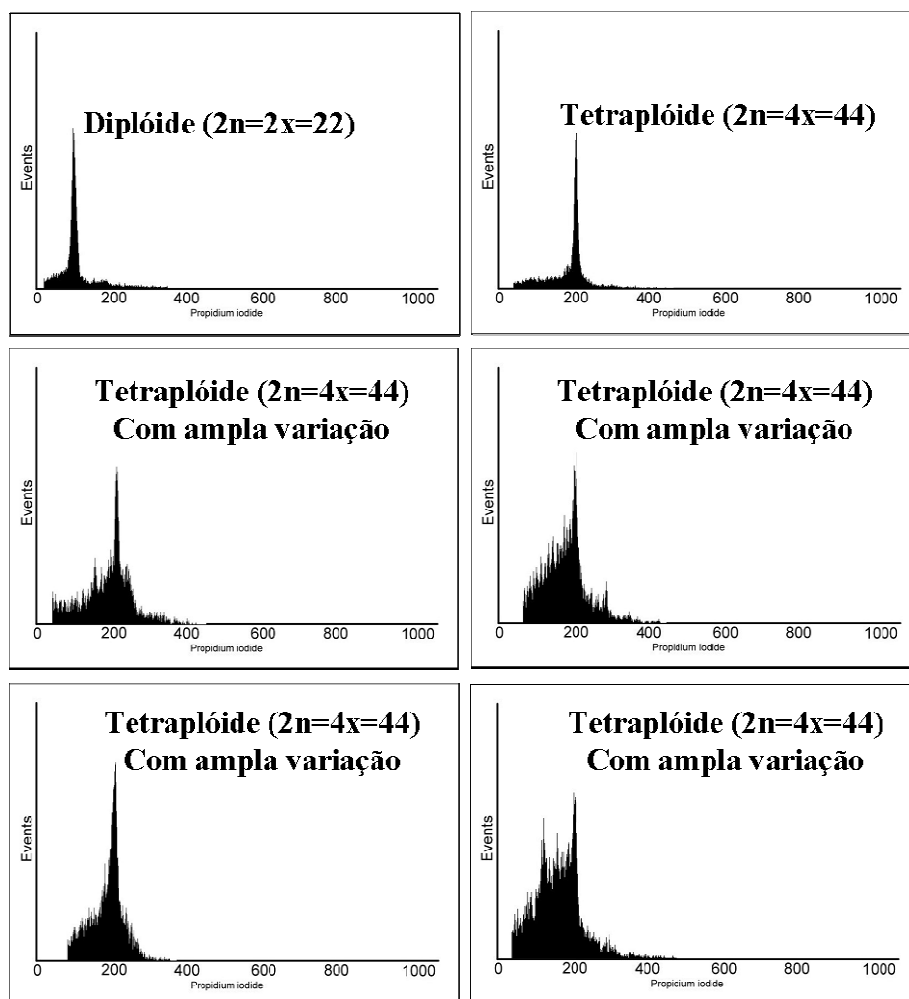


Figura 19 Histogramas de uma planta diplóide (controle) e vários poliplóides de *Musa acuminata* oriundos da indução da duplicação de cromossomos *in vitro*. Cruz das Almas-BA, 2010.

Como pode ser observado, o pico do lado esquerdo do histograma constitui o “Debris”. Núcleos de uma planta diplóide aparecem no canal 100 para a fase G1, enquanto plantas com o dobro do número de cromossomos têm seu pico G1 no canal 200, e portanto podem ser considerados autotetraplóides (Figura 19). É importante destacar que, em alguns casos, houve ampla variação no histograma, muitas vezes dificultando a análise precisa da ploidia do material. Em outros casos, por exemplo, houve o aparecimento de dois picos distintos, caso em que se considerou a planta como mixoplóide.

Uma estratégia utilizada para minimizar o problema da variação nos histogramas foi classificá-los segundo critérios arbitrários de qualidade visual, a saber: (a) histogramas de plantas tetraplóides com baixa variação; (b) histogramas de plantas tetraplóides com ampla variação e (c) histogramas com mais de um pico evidente (mixoploidia).

É importante destacar que as plantas poliplóides identificadas por citometria de fluxo devem ter a ploidia confirmada mediante a contagem do número de cromossomos para identificação dos autotetraplóides, aneuplóides e mixoplóides. Embora laboriosa, a determinação do número de cromossomos em células em metáfase é indispensável quando se deseja obter resultados mais seguros. Importante também é realizar estudos sobre o comportamento agrônomo dos autotetraplóides em campo a fim de identificar e selecionar os tetraplóides com características de interesse que, em fase posterior, serão utilizados em cruzamentos com diplóides melhorados para a geração de triplóides secundários.

Pela primeira vez, até a presente data, a massa de discos foliares foi utilizada como estratégia de pré-seleção de poliplóides putativos oriundos da poliploidização *in vitro*. Os resultados são promissores e novos trabalhos devem

ser conduzidos para validar a técnica em diferentes genótipos e fases de desenvolvimento da planta.

Na Figura 20, estão apresentadas algumas plantas poliplóides pré-selecionadas com base em caracteres morfológicos e que foram posteriormente identificadas mediante a massa específica de discos foliares.

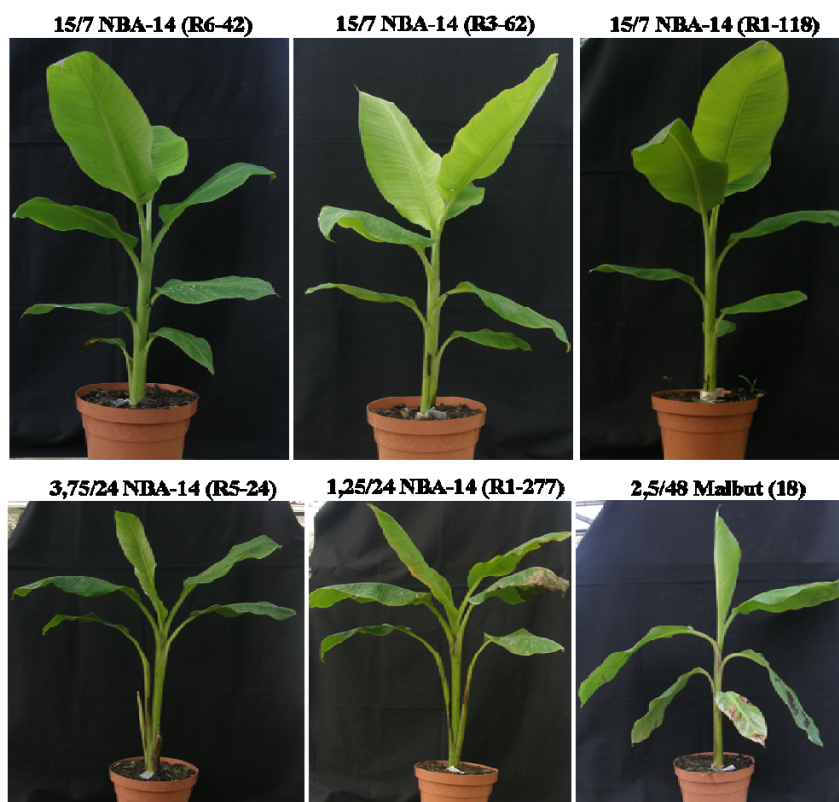


Figura 20 Alterações na pigmentação (a) e morfologia (b) em plantas poliplóides putativos pré-selecionadas. Cruz das Almas-BA, 2010.

### 3 CONCLUSÕES

- a) Os principais efeitos fenotípicos causados pela poliploidização de diplóides de bananeira são: plantas com folhas mais arcadas e com maior espessura do limbo foliar, reduzido crescimento;
- b) É possível pré-selecionar poliplóides putativos de bananeira mediante caracteres morfológicos;
- c) A técnica baseada na determinação da massa específica de discos foliares é eficiente para distinguir as bananeiras diplóides das tetraplóides, bem como os poliplóides putativos resultantes da poliploidização *in vitro*;
- d) Existe correlação entre plantas poliplóides identificadas pela técnica de discos foliares e aquelas analisadas por citometria de fluxo.

## REFERÊNCIAS

BAKRY, F. et al. In liquid medium colchicines treatment induce non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono-and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, Paris, v. 62, n. 1, p. 3-12, Jan. 2007.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1988. 41 p.

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

SCALON, S. P. Q. et al. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 3, p. 652-655, 2001.

SILVA, S. O. et al. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 101-157.

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, maio/jun. 2004.

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

WITKOWSKI, E. T. F.; LAMONT, B. B. Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. **Oecologia**, Berlin, v. 88, n. 4, p. 486-493, Dec. 1991.