

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E ANATÔMICA DE FOLHAS DE ACESSOS
DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS**

MANUELA RAMOS DA SILVA

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

Março - 2012

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E ANATÔMICA DE FOLHAS DE ACESSOS DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS

MANUELA RAMOS DA SILVA

Engenheira Agrônoma
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva
Co-orientador: Prof. Dra. Janay de Almeida dos Santos-Serejo
Co-orientador: Prof. Dr. Edson Perito Amorim

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2012

FICHA CATOGRÁFICA

S586 Silva, Manuela Ramos da.
Caracterização física e anatômica de folhas de acessos de
bananeira com diferentes ploidias / Manuela Ramos da
Silva. _ Cruz das Almas, BA, 2012.
59f.; il.

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva.
Coorientadores: Janay de Almeida Santos-Serejo e
Edson Perito Amorim.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,
Ambientais e Biológicas.

1.Banana – Cultivo. 2.Melhoramento genético.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e
Biológicas. II. Título.

CDD: 634.772

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MANUELA RAMOS DA SILVA**

Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Prof. Dra. Ana Cristina Vello Loyola Dantas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Dissertação (ou tese) homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em
Recursos Genéticos Vegetais em.....

Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em
.....

A Deus pela minha existência.
À minha mãe, Maria Antônia, que com amor e
carinho, se dedicou à minha formação.
Ao amor da minha vida, Rudival, companheiro em
todos os momentos da minha trajetória.
Essa conquista é nossa!

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo discernimento para adquirir os conhecimentos, aprender e escrever esta dissertação.

Agradeço de coração ao meu esposo, Rudival Mota de Jesus, que me incentivou sempre nos meus estudos e por causa dele consegui concretizar este sonho. Agradeço também pela compreensão da minha ausência em alguns momentos da nossa vida.

À minha mãe, Maria Antônia Ramos da Silva, pela paciência, compreensão e carinho.

Ao meu querido tio Domingos Souza Ramos, que com dedicação fez parte desta conquista.

À minha amada sobrinha Evellyn Ramos da Silva Coelho, pelos momentos de carinho e alegria.

Ao meu orientador Dr. Sebastião de Oliveira e Silva pelos conhecimentos, ensinamentos e pelo apoio.

Aos meus co-orientadores, Dr^a. Janay de Almeida dos Santos-Serejo e Dr. Edson Perito Amorim, pelos ensinamentos, por estarem sempre dispostos a me ajudar e pela dedicação.

À Lucymeire Morais, por toda força e ajuda na condução dos experimentos realizados.

À Leila Aparecida Pio pela prestatividade e pela colaboração nesta dissertação.

Aos amigos Tâmis e Antonio Hélder que colaboraram muito nos experimentos, acordando cedo para me ajudar.

Ao colega Alexandre Dutra, pela ajuda no experimento.

À amiga Joseane Costa, pela amizade e pela força.

Ao amigo Sinésio, pelo incentivo e pelos conselhos dados.

Aos amigos do Laboratório de Práticas Culturais e do Laboratório de Cultura de Tecidos.

Aos colegas do Curso de Mestrado, em especial a Edvaldo, Jucicléia, Marília, Tuany e Viviane pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, em especial a Tatielle e René.

Ao Sr. Raimundo Santana “Bizunga”, pela dedicação e auxílio nos meus experimentos.

À Daniela Silveira, pela atenção, dedicação e colaboração para a concretização desta dissertação.

Ao Dr. Maurício Coelho, pela colaboração.

Ao Dr. Adonai Calbo Gimenez, pelos ensinamentos e pela paciência.

Aos professores da UFLA Evaristo Mauro de Castro e Fabrício José Pereira.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e à Embrapa Mandioca e Fruticultura pela oportunidade de realizar o curso de mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

À CAPES pela bolsa de estudo.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo 1	
ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE DNA DE <i>Musa acuminata</i> Colla COM DIFERENTES PLOIDIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	13
Capítulo 2	
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DE ACESSOS DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS.....	26
Capítulo 3	
AVALIAÇÃO DA TURGESCÊNCIA FOLIAR DE ACESSOS DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
ANEXOS.....	59

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E ANATÔMICA DE FOLHAS DE ACESSOS DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS

Autora: Manuela Ramos da Silva

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientador: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientador: Edson Perito Amorim

RESUMO: A duplicação de cromossomos pode ser usada no melhoramento genético de cultivares de bananeiras para geração de triploides secundários. Em trabalhos dessa natureza necessitam-se de métodos para a estimativa da ploidia. Esse trabalho teve por objetivo avaliar o conteúdo de DNA, a espessura foliar, a caracterização anatômica e a turgescência foliar de genótipos de bananeira di, tri e tetraploides, para posteriormente, relacionar tais caracteres com o número de cromossomos, e com uso dessa informação, estabelecer uma forma rápida de estimar ploidia. A avaliação do conteúdo de DNA foi realizada por citometria de fluxo nos diploides AA (Calcutta e NBA), triploides AAA (Grande Naine e Caipira) e tetraploides AAAA (Calypso e Bucanero). Para cada amostra foram realizadas quatro repetições e analisados cinco mil núcleos. A análise da massa específica foi feita utilizando três discos retirados de cada uma das duas partes do limbo foliar, nas posições apical, mediana e basal da primeira, segunda e terceira folhas expandidas das mudas dos diploides AA (Calcutta e Lidi), triploides AAA (Grande Naine e Williams) e tetraploide AAAA (Bucanero e Calypso), utilizando-se quatro plantas para cada genótipo. Avaliou-se a massa fresca, seca (mg) e específica (mg cm^{-2}) dos discos para os diferentes genótipos. A caracterização anatômica foi feita em amostras foliares seccionadas em cortes transversais e paradérmicos (face abaxial e adaxial) das mesmas plantas diploides, triploides e tetraploides usadas no experimento anterior, utilizando o microscópio Ken-a-vision. Já a avaliação da turgescência foliar foi feita usando o aparelho Wiltmeter[®], por meio de análise direta das folhas e de discos foliares dos diferentes genótipos. Os resultados obtidos para o conteúdo de DNA mostraram que os genomas dos diploides possuem menor peso (0,96 pg), os triploides Grande Naine (1,48 pg) e

Caipira (1,63 pg) apresentaram pesos intermediários, enquanto os tetraploides, Calypso (1,90 pg) e Bucanero (2,26 pg) foram os que apresentaram DNA mais pesados. A massa específica obtida da massa fresca dos discos foliares retirados da parte apical da folha apresentou uma boa relação com a ploidia. Assim os genótipos com maior ploidia foram os que apresentaram a mais alta massa fresca do disco foliar. No estudo anatômico observou-se que os genótipos tetraploides apresentaram estômatos maiores e em menor quantidade em comparação aos triploides e diploides. O potencial de turgescência está relacionado à ploidia, quando observado diretamente na planta pelo aparelho Wiltmeter[®] em leituras realizadas às 6:30 h da manhã. Plantas com maiores ploidias apresentam maior turgescência.

Palavras chave: *Musa acuminata*, diploides, triploides, tetraploides, discos foliares e turgescência.

PHYSICAL AND ANATOMIC CHARACTERIZATION OF LEAVES OF BANANA ACCESS WITH DIFFERENT PLOIDY LEVELS

Author: Manuela Ramos da Silva

Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-advisor: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-advisor: Edson Perito Amorim

ABSTRACT: Chromosome duplication may be used in genetic breeding of banana cultivars for developing secondary triploids. Methods for estimating ploidy levels are needed. The objective of the present work is to evaluate DNA content, leaf thickness, anatomic characterization and leaf turgor of di, tri and tetraploid banana genotypes to later correlate with the number of chromosomes and establish a quicker method for estimating ploidy levels. The evaluation of DNA content was carried out by flow cytometry in the AA (Calcutta and NBA) diploids, AAA triploids (Grande Naine and Caipira) and the AAAA tetraploids (Calypso and Bucanero). Four replicates were carried out for each sample and five thousand nuclei were analyzed. The specific mass analysis was carried out using three discs taken from each of the two parts of the foliar limb in the apical, medium and basal positions of the first, second and third expanded leaves of plantlets of the AA diploids (Calcutta and Lidi), AAA triploids (Grande Naine and Williams) and AAAA tetraploids (Bucanero and Calypso), using four plants per each genotype. Fresh, dry (mg) and specific (mg cm⁻²) mass of the discs for the different genotypes, were evaluated. The anatomic characterization was carried out in leaf samples of the same diploid, triploid and tetraploid plants used in the previous experiment by the Ken-a-vision microscope. The evaluation of leaf turgor was carried out using the Wilmeter equipment by direct analysis of leaves and foliar discs of the different genotypes. Results regarding DNA content showed that the diploid genomes weigh less (0.96 pg); the triploid Grande Naine (1.48 pg) and Caipira (1.63 pg), intermediate weights and the tetraploids Calypso (1.90 pg) and Bucanero (2.26 pg), presented the heaviest DNAs. The specific mass obtained for the fresh mass of the foliar discs taken from the apical part of the leaf presented good relationship with the

ploidy level. Therefore, the genotypes with greater ploidy level were those which presented highest fresh mass of the leaf discs. For the anatomic study, the tetraploid genotypes presented larger stomata and in less amount in comparison to the triploid and diploid genotypes. The turgor potential is related to ploidy level when directly observed in the plant using the Wiltmeter equipment in readings carried out at 6:30 a.m. Plants with higher ploidy level presented increased turgor pressure.

Key words: *Musa acuminata*, diploids, triploids, tetraploids, leaf discs and turgor.

INTRODUÇÃO

O cultivo da bananeira é uma importante atividade do agronegócio brasileiro e possui relevante papel econômico e social no mundo, com uma área de plantio estimada de 4,1 milhões de hectares, em 107 países, e uma produção de 70 milhões de toneladas. O Brasil é o quinto produtor mundial de banana, tendo produzido 6,8 milhões de toneladas em 2009, em uma área aproximada de 480 mil hectares, onde se estima que a produção dessa fruta emprega 960 mil pessoas (FAO, 2011).

A banana é a fruta mais consumida no mundo, não seria exagero concluir que é também a mais importante. Consumida em sua quase totalidade na forma *in natura*, essa fruta constitui parte integrante da alimentação das populações de baixa a alta renda, não só pelo seu valor nutritivo, como pelo seu baixo custo e sabor agradável. Ademais, a banana pode ser utilizada na preparação de pratos culinários, banana chips e outros produtos industriais, além do uso medicinal, ornamental e na confecção de artigos de decoração (BAKRY et al., 2009).

O centro de origem da maior parte do germoplasma de banana está localizado no Continente Asiático. Outros centros secundários ocorrem na África Oriental, em algumas ilhas do Pacífico e uma considerável diversidade genética na África Ocidental (CHAMPION, 1967). As cultivares encontradas nestas regiões evoluíram de espécies selvagens e apresentam três níveis cromossômicos, existindo diploides com 22 cromossomos (2x), triploides com 33 cromossomos (3x) e tetraploides com 44 cromossomos (4x), que são múltiplos do número básico ($n=11$), sendo que a origem de triploides a partir de diploides e de tetraploides a partir dos triploides é facilmente constatada por meio de cruzamentos experimentais (SHEPHERD, 1984).

Cruzamentos interespecíficos entre *M. acuminata* Colla (genoma A, $2n=2x=22$) e *M. balbisiana* Colla (genoma B, $2n=2x=22$), deram origem à maioria dos genótipos de bananeiras atualmente em uso para alimentação, razão pela qual as plantas geradas destes cruzamentos apresentam características das duas

espécies (SIMMONDS, 1973). Estudos realizados por Simmonds & Shepherd (1955) constataram os seguintes grupos genômicos: diploides AA, AB e BB; triploides AAA, AAB e ABB; e tetraploides AAAA, AAAB, AABB e ABBB, sendo esta classificação adotada em todo o mundo. Além dos grupos genômicos, foi estabelecido o uso do termo subgrupo, para denominar um complexo de cultivares, originárias, por meio de mutações de uma única cultivar original (SHEPHERD et al., 1984), como no caso do grupo AAA, subgrupo Cavendish e grupo AAB, subgrupos Prata e Terra, no Brasil.

Entre os problemas que impedem a obtenção de altos rendimentos na cadeia produtiva da banana estão as sigatokas amarela e negra, e o mal-do-Panamá, principais pragas que causam perdas significativas na produção. As cultivares mais conhecidas (Prata, Pacovan, Maçã, Grande Naine e Terra) são muito suscetíveis à Sigatoka-negra e, à exceção da 'Terra' e 'Maçã', são também suscetíveis à Sigatoka-amarela. Com relação ao mal-do-Panamá, as cultivares Grande Naine e Terra, são resistentes, a 'Maçã' é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis.

Uma das estratégias para a solução dos problemas relacionados a essas doenças é a criação de novas variedades resistentes, uma vez que seu uso não depende da ação do produtor durante a fase de crescimento das plantas, não é prejudicial ao meio ambiente e, geralmente, é compatível com outras técnicas de manejo. Embora no Banco de Germoplasma de Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura exista variabilidade genética suficiente (diploides AA), o melhoramento é dificultado pela esterilidade constatada em alguns diploides e triploides e a falta de conhecimento do tipo de herança das resistências. As dificuldades resultantes da baixa produção de sementes ou em alguns casos, ausência de sementes em cruzamentos, podem ser contornadas, mediante a escolha adequada dos genitores e ou pelo uso de tecnologias não convencionais de melhoramento. Vale ressaltar que, por meio de hibridações uma série de cultivares já foi desenvolvida e recomendada pela Embrapa (SILVA, et al., 2011a; SILVA et al., 2011b).

A introdução e a avaliação de germoplasma constituem-se nas primeiras etapas de desenvolvimento de variedades superiores. Entre os acessos avaliados, alguns reúnem tantas características desejáveis que podem ser recomendados sem nenhum processo de melhoramento, como exemplo, podem

ser citadas as cultivares Caipira e Thap Maeo. No entanto, a maioria das introduções apresenta uma ou poucas características importantes e precisa ser modificada em programa de melhoramento genético, de modo a torná-la agronomicamente útil.

O método de melhoramento mais utilizado em bananeira é o convencional, mediante o cruzamento de diploides pré-melhorados AA (genitor masculino) com triploides comerciais e consequente geração de híbridos tetraploides. Esta metodologia usando a cultivar triploide AAA – Gros Michel foi desenvolvida na década de 1920, em Trinidad e Jamaica, e continua empregada até hoje. Na Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde se usa triploides AAB, do tipo Prata e Maçã, a técnica é usada desde 1982 até os dias atuais, com relativo sucesso (SILVA et al., 1999; SHEPHERD, 1987; SILVA et al., 2011b). Os novos tetraploides produzidos, embora resistentes à doença, apresentam alguns problemas como polpa flácida, despencamento, menor tempo de prateleira e firmeza reduzida (SILVA et al., 2002)

Mais recentemente, o cruzamento de tetraploides com diploides com a geração de triploides (AAAB x AA = AAA ou AAB) está sendo incrementado no melhoramento genético de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura (SILVA et al., 2011b).

As dificuldades da hibridação na maioria das variedades têm levado o desenvolvimento de novas técnicas de melhoramento de bananeira para a criação de cultivares resistentes às doenças, as quais complementam e dão suporte às atividades convencionais. Entre elas estão, a hibridação somática, a fertilização *in vitro*, a mutação, a duplicação de cromossomos e a transformação genética (SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2011b).

Dentre as técnicas citadas, a duplicação de cromossomos permite a produção de autotetraploides férteis, os quais serão utilizados em cruzamentos com diploides melhorados para geração de triploides secundários. Desta forma é possível introduzir resistência a pragas nos híbridos gerados, selecionar e recomendar novas cultivares, tipo Cavendish, com frutos de boas características e partenocárpicas (STOVER & BUDDENHAGEN, 1986, SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2011b).

A duplicação de cromossomos *in vitro* é baseada na aplicação de substâncias antimitóticas (colchicina e orizalina) em explantes, como ápices

caulinares e ou suspensões de células embriogênicas, sob condições assépticas (VAN DUREN et al., 1996; GANGA & CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007), com a posterior identificação e seleção dos autotetraploides estáveis.

Antimitóticos ou agentes poliploidizantes são substâncias, 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); a orizalina ($C_{12}H_{18}N_4O_6S$ – 3,5-dinitro-N4,N4-dipropylsulfanilamide), um herbicida dinitroanilina e a 8-hidroxiquinolina (8-HQ). Outros compostos, como o Amiprofós-metil (APM), Trifluralina (herbicida dinitroanilina) e a cafeína, também têm sido utilizados como alternativa à colchicina para poliploidização (HANSEN & ANDERSON, 1996; PETERSEN et al., 2002; MADON et al., 2005; KHOSRAVI et al., 2008). Eles atuam na dinâmica de polimerização dos microtúbulos, de maneira similar à colchicina, embora sejam menos tóxicos que essa substância (MOREJOHN & FOSKET, 1984). A eficiência do APM e trifluralina é variável, mas a maioria dos resultados tem sido promissores (KHOSRAVI et al., 2008).

Os agentes antimitóticos agem em células de tecidos meristemáticos em divisão inibindo, durante a metáfase, a formação do fuso mitótico. O mecanismo molecular da ação desses produtos 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, a partir de diploides, 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 tetraploide que pode ser 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 à ação dos agentes antimitóticos, há relatos na literatura que a colchicina liga-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 (COSTA, 2010).

Em bananeira a duplicação de cromossomos é tradicionalmente realizada pelo uso de colchicina (DOLEZEL et al., 1994; BAKRY et al., 2007), 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 mixoploides (WAN et al., 1989; CARVALHO et al., 2005). Além disso, a colchicina possui alta toxicidade ao ser humano e pode ocasionar esterilidade e crescimento anormal nas plantas regeneradas (WAN et al., 1989). Por isso, visando maior eficiência do tratamento têm-se variado a forma de aplicação, a concentração e o tempo de exposição ao antimitótico.

A cafeína e herbicidas baseados em dinitroanilina (orizalina) têm mostrado alta atividade de poliploidização com baixa fitotoxicidade (PETERSEN et al., 2002; MADON et al., 2005). Porém, ainda não se conhece o efeito da cafeína na duplicação de cromossomos de bananeira. A orizalina possui uma alta atividade de despolimerização de micro-túbulo devido sua grande afinidade com a tubulina vegetal. Além disso, essa substância pode ser aplicada em concentrações mil vezes menor que a colchicina com a mesma eficiência na obtenção de autotetraploides estáveis (DOLEZEL et al., 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.

Em geral, depois de aplicados os antimitóticos, efetuadas as repicagens e o enraizamento *in vitro* das brotações, um grande número de plantas é produzido e deve ser submetido 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 mixoploides, diploides ou aneuploides. Por essa razão, na fase *in vitro* e ou *ex vitro* (aclimatização) deve-se realizar a pré-seleção

dos prováveis poliploides (poliploides putativos), de forma a diferenciar, por características morfológicas, os poliploides das plantas não duplicadas (diploides) podendo reduzir significativamente o trabalho posterior para confirmação da ploidia.

A determinação do nível de ploidia em plantas submetidas à duplicação cromossômica pode ser realizada diretamente por meio da contagem dos cromossomos em células mitóticas e ou meióticas (GUERRA, 1989; VILLA, 1995). No entanto, a análise citogenética exige muita experiência do pesquisador, sendo um procedimento laborioso e demorado, e principalmente, quando se trata de análises em grande número de plantas (MAGALLANES et al., 1996; SARI et al., 1999).

O método mais simples de identificar poliploides putativos é aquele que baseia na morfologia das plantas. A associação entre o nível de ploidia e as características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliploides, principalmente porque esses apresentam células e órgãos maiores, ou “efeito gigas” (MAGALLANES et al., 1996; SOUZA & QUEIROZ, 2004). Em bananeira, os poliploides 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 e mais compactas e crescimento lento. Poliploides também demonstram maior resistência à perda de água pelas folhas (BAKRY, 2009).

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 principalmente, quando se trabalha com elevado número de plantas.

Uma estratégia promissora na identificação rápida dos poliploides pode ser baseada na espessura da folha, que pode ser estimada pela massa específica. No entanto, a medida da massa específica foliar ainda não é adotada como uma prática segura para diferenciar a ploidia em bananeira. A técnica precisa ser adequada para ser empregada com êxito na pré-seleção de plantas duplicadas com antimitóticos. Estudos realizados por Costa (2010) na Embrapa Mandioca e Fruticultura com bananeiras duplicadas com diferentes concentrações de

colchicina, sugerem uso da espessura das folhas para diferenciar os níveis de ploidias. Esta técnica consiste na retirada de discos, de área conhecida, do limbo foliar, com a posterior obtenção da massa fresca e seca. Com isso, determina-se a densidade específica foliar (razão entre a massa seca ou fresca de discos foliares e a área do disco). Assim, espera-se que os poliploides estejam entre os indivíduos que apresentem folhas mais espessas.

Outro método usado para a identificação do nível de ploidia, também conhecido como método indireto, é a caracterização anatômica, como diâmetro do grão de pólen, número e tamanho de cloroplastídeos, tamanho de células (VILLA, 1995; MAGALLANES et al., 1996; SOUZA & QUEIROZ, 2004). Trata-se de técnica relativamente rápida e fácil para a avaliação do nível de ploidia e que permite estimativa de correlações estatísticas (SOUZA & QUEIROZ, 2004).

Além desses métodos indiretos mencionados, a turgescência das células foliar poderia também ser empregada para diferenciar diploides de poliploides, uma vez que, os indivíduos com maior ploidia normalmente apresentam células mais túrgidas (BAKRY et al., 2009). Medidas da turgescência celular de folhas podem ser facilmente obtidas, com o uso de um aparelho denominado Wiltmeter[®] (CALBO et al., 2010). Embora esse aparelho, ainda não tenha sido testado para bananeira, já foi utilizado em outras culturas como nas folhas de couve, alface e chicória, para determinar turgescência (CALBO et al., 2008 e 2010). Espera-se que seja eficiente também, para medir a turgescência das folhas de bananeira. O Wiltmeter[®] é um tipo de aplanador para medir a firmeza relacionada à turgescência celular de folhas e de segmentos planares de órgãos, como por exemplo, partes de hortaliças e flores. É um equipamento simples, portátil e de fácil manuseio, que faz medidas objetivas durante o desenvolvimento da planta (CALBO et al., 2008).

Vários autores, no entanto, enfatizam que os métodos indiretos podem ser influenciados pelo ambiente e a análise individual de algumas variáveis poderá levar a erros na classificação do nível de ploidia de um indivíduo (MAGALLANES et al., 1996; SARI et al., 1999; SOUZA & QUEIROZ, 2004). Além disso, tais métodos possibilitam apenas distinção entre indivíduos poliploides e diploides, não sendo útil para separar, por exemplo, triploides de tetraploides (MAGALLANES et al., 1996; SARI et al., 1999). Mesmo assim, a aplicação dos métodos indiretos é importante no melhoramento de bananeira, uma vez que

descarta plantas diploides possibilitando uma considerável redução do número de indivíduos a ser submetido à análise citogenética o que reduz os custos do trabalho e acelera o processo de seleção (SOUZA & QUEIROZ, 2004).

Em vista do que foi exposto e considerando a importância dos métodos indiretos para determinação do nível de ploidia em plantas submetidas à duplicação cromossômica, esse trabalho teve por objetivo avaliar o conteúdo de DNA, a espessura foliar, a caracterização anatômica e a turgescência foliar de genótipos de bananeira di, tri e tetraploides, para posteriormente, relacionar tais caracteres com o número de cromossomos, e com uso dessa informação estabelecer uma forma rápida de estimar a ploidia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. **Plant Cell Reports**, Valencia, v. 28, p. 1837-1846, 2009.

BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HORRY, J. Genetic improvement of banana. In: JAIN, S. M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Eds.). **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species**. Springer, p.3-46. 2009.

BAKRY, F.; REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. 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, p. 3-12, 2007.

CALBO, A. G.; FERREIRA, M. D.; PESSOA, J. D. C. A leaf lamina compression method for estimating turgor pressure. **HortScience**, v. 45, n. 3, p. 418-423, 2010.

CALBO, A. G.; FERREIRA, M. D.; PESSOA, J. D. C. Medida da firmeza de folhas com Wiltmeter[®] - fundamento e método. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p.S4154-S4159, 2008.

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**, v. 80, p.69-75, 2005.

CHAMPION, J. **Les bananiers et leur culture**; Tome I: Botanique et genetique. Paris: IFAC, 1967. 214p.

COSTA, F. H. da S. **Poliploidia no melhoramento genético da bananeira**. 2010. 92p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT. 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acessado em: 14 Jul. 2011.

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

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

HANSEN, A. L. GERTS, A. JOERSBO, M.; ANDERSEN, S. B. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, v.101, p. 231-237, 1998.

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

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

KHOSRAVI, P.; KERMANI, M. J.; NEMATZADEH, G. A.; BIHAMTA, M.R.; YOKOYA, K. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. **Euphytica**, v. 160, p. 267-275, 2008.

MADON, M.; CLYDE, M. M.; HASMIM, H.; MOHD YUSUF, Y.; MAT, H.; SARATHA, S. Poliploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. **Journal of Oil Palm Research**, v. 17, p. 110-123, 2005.

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

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

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

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

SHEPHERD, K. Banana breeding – past and present. **Acta Horticulturae**, v. 196, p. 37-43, 1987.

SHEPHERD, K.; ALVES, E.J.; FERREIRA, R. Classificação dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Banana (BAG) do Centro Nacional de Pesquisa

de Mandioca e Fruticultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis-SC: SBF/EMPASC, 1984, p.213-219.

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

SILVA, S. de O.; SHEPHERD, K.; ALVES, E. J. Cultivares de banana. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Brasília: Embrapa- SPI, 1999. p.85-105.

SILVA, S. O.; MORAIS, L. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. Melhoramento Genético de Bananeira para Resistência às Doenças. In: ROMANO R.; RAMOS, R. E. S. (Org.). **Recursos Genéticos Vegetais no Estado da Bahia**. Feira de Santana: UEFS, v.1, 2005. p. 49-67.

SILVA, S.O.; MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z. J. M.; LIMA, M. J. C.; AMORIM, E. P. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do mal-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 125-132, 2011a.

SILVA, S.O.; MORAIS-LINO, L.S.; SEREJO, J. A. S. Melhoramento genético de bananeira para resistência à Sigatoka-negra. In: CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. de; Silva, S. de O. (Org.). **Recomendações técnicas sobre a Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: Nova Civilização Ltda., v. Único, 2011b. p. 61-70.

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 1

ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE DNA DE *Musa acuminata* COLLA COM DIFERENTES PLOIDIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO¹

¹ Artigo que será submetido ao comitê editorial do periódico Ciência e Agrotecnologia.

ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE DNA DE *Musa acuminata* COLLA COM DIFERENTES PLOIDIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Autora: Manuela Ramos da Silva

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientador: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientador: Edson Perito Amorim

RESUMO: A citometria de fluxo é uma técnica bastante confiável para a determinação do conteúdo de DNA em espécies vegetais, portanto, é perfeitamente possível separar níveis diferentes de ploidia de uma mesma espécie por essa técnica. Essa informação é muito importante, principalmente em programas de melhoramento genético que envolvem poliploides, a fim de possibilitar a escolha adequada dos materiais vegetais com ploidia adequada, com os quais se deseja trabalhar. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o conteúdo de DNA de dois acessos de bananeira diploides AA (Calcutta e NBA), dois triploides AAA (Grande Naine e Caipira) e dois tetraploides (AAAA) Calypso e Bucanero. Amostras de folhas frescas desses genótipos foram trituradas, juntamente com o padrão de referência interno (*Pisum sativum*) no tampão LB01. As suspensões de núcleos obtidas foram filtradas em gaze e tela de 50 µm adicionando-se 25 µL de iodeto de propídeo. Para cada amostra foram realizadas quatro repetições e analisados 5 mil núcleos. Os resultados obtidos para o conteúdo de DNA mostraram que os diploides Calcutta e NBA possuem o genoma de menor peso (0,96 pg), os triploides Grande Naine e Caipira apresentaram pesos de 1,48 pg e 1,63 pg, respectivamente e os tetraploides Calypso e Bucanero, tiveram pesos respectivos de 1,90 pg e 2,26 pg, confirmando assim que os diploides têm o menor genoma, os triploides apresentam genoma intermediário e os tetraploides têm os maiores genomas.

Palavras chave: diploide, triploide, tetraploide, bananeira.

ESTIMATION OF THE DNA CONTENT IN *Musa acuminata* COLLA WITH PLOIDY LEVEL DIFERENTS BY FLOW CYTOMETRY

Author: Manuela Ramos da Silva

Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-advisor: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-advisor: Edson Perito Amorim

Abstract: Flow cytometry is a reliable technique for the determination of DNA content in plant species; therefore is it possible to separate different ploidy levels of the same species using this technique. This information is very important especially for genetic breeding programs involving polyploids in order to enable the right choice of plant material with the correct ploidy level chosen to work with. The objective of the present work was to evaluate the DNA content of two diploid AA (Calcutta and NBA), two triploid AAA (Grande Naine and Caipira) and two tetraploid (AAAA) Calypso and Bucanero, banana accessions. Samples of fresh leaves of these genotypes were crushed together with the internal reference standard (*Pisum sativum*) in LB01 buffer. The nuclei suspension was filtered in gauze and 50 μm filters. 25 μL of propidium iodide were added. For each sample, four replicates were carried out and five thousand nuclei were analyzed. The following results were obtained for DNA content: Calcuta and NBA, diploids, have the lightest genome (0.96 pg), the triploids Grande Naine and Caipira presented genomes with 1.48 pg and 1.63 pg, respectively, and the tetraploids Calypso and Bucanero, presented the heaviest genomes with 1.90 and 2.26 pg, respectively, confirming that diploids have smaller genomes than triploids and these, smaller than tetraploids, which presented the largest genome.

Key words: Diploid, triploid, tetraploid, banana.

1 INTRODUÇÃO

As dificuldades ocorridas na hibridação de algumas variedades de bananeira têm levado o desenvolvimento de novas técnicas de melhoramento para a criação de cultivares resistentes às doenças. As técnicas de biotecnologia como mutação, duplicação de cromossomos, hibridação somática e transformação genética complementam e dão suporte às atividades convencionais, por possibilitar o melhoramento de genótipos com problema de esterilidade (SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2011). A duplicação de cromossomos permite a produção de autotetraploides férteis, que poderão ser utilizados em cruzamentos com diploides melhorados, para geração de triploides secundários, permitindo assim o melhoramento genético de cultivares estéreis como as do tipo Cavendish.

A duplicação de cromossomos *in vitro* baseia-se na aplicação de substâncias antimitóticas (colchicina, orizalina e cafeína) em explantes, tais como ápices caulinares e ou suspensões de células embriogênicas, sob condições assépticas (VAN DUREN et al., 1996; GANGA & CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007), com a posterior identificação e seleção dos autotetraploides estáveis.

A determinação do nível de ploidia em plantas submetidas à duplicação cromossômica pode ser realizada por métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos compreendem a contagem dos cromossomos em células mitóticas e ou meióticas (GUERRA, 1989; VILLA, 1995) e avaliação do conteúdo de DNA pela citometria de fluxo. Entre os métodos indiretos que poderiam ser utilizados citam-se as características morfológicas e anatômicas das plantas.

A análise citogenética exige muita experiência do pesquisador, além de ser laboriosa e demorada, principalmente quando se trata de análises em grande número de plantas (MAGALLANES et al., 1996; SARI et al., 1999).

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve análises de dispersão da luz, fluorescência, radiação, laser, fluxo hidrodinâmico e substâncias fluorescentes (fluorocromos) na determinação de algumas características

estruturais e funcionais de partículas biológicas (células, núcleos, cromossomos, organelas), para isso é necessário utilizar um equipamento denominado citômetro de fluxo.

Os métodos de análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo foram originalmente desenvolvidos para células humanas. Posteriormente foi introduzido como método de avaliação de ploidia e de quantificação de DNA, com alta resolução, em diferentes espécies de plantas (TIERSCH et al., 1989).

O princípio da técnica baseia-se na análise das propriedades ópticas de partículas que fluem em uma suspensão líquida (tampão de extração) em direção a uma câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente “sheath fluid” que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida. Por causa da diferença de velocidade entre os dois fluidos, as partículas a serem analisadas são forçadas a moverem-se, individualmente, no centro do fluxo, fenômeno esse conhecido como focagem hidrodinâmica (DOLEZEL, 1997). Essas partículas interceptam, uma a uma, o feixe de laser ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (DOLEZEL & BARTOS, 2005). Essa fluorescência é separada pela utilização de uma série de espelhos dicróicos, filtros e fotomultiplicadores (EECKHAUT et al., 2005). Os circuitos dentro do aparelho convertem esses sinais fluorescentes em valores digitais que são armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL et al., 2007; OCHATT, 2011). Como as partículas são analisadas individualmente e em alta velocidade, grandes populações podem ter o conteúdo de DNA mensurado em um curto espaço de tempo (SHAPIRO, 2004).

Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de material genético - DNA (LOUREIRO & SANTOS, 2004).

Pela informação gerada por meio da determinação do conteúdo de DNA com alta resolução, é possível estimar o nível de ploidia das amostras de interesse. Este estudo tem sido empregado com sucesso em trabalhos de

melhoramento genético de várias espécies vegetais, inclusive para a cultura da bananeira.

Usando a citometria de fluxo em bananeira foi observado que, genótipos com maior ploidia apresentam maior quantidade de DNA e que o genôma A apresenta 12% mais material genético que o B. Observaram-se também, variações no tamanho do genoma A e resultados semelhantes aos de classificação taxonômica de banana (DOLEZEL et al., 1994; MADAIL, 2011).

O presente trabalho objetivou avaliar o conteúdo de DNA do genoma de plantas diploides, triploides e tetraploides de *Musa acuminata* Colla por citometria de fluxo e confrontar esses dados com o grau de ploidia desses materiais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas frescas dos acessos de bananeira Calcutta e NBA (diploide AA), Grande Naine e Caipira (triploides AAA) e Calypso e Bucanero (tetraploides AAAA), obtidos na Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram submetidas a análise de citometria de fluxo no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Retiraram-se discos foliares dos acessos de bananeira, que foram posteriormente embalados em sacos plásticos com algodão umedecido com água destilada e colocados em isopor com gelo e em seguida transportados para Lavras. No Laboratório da UFLA as amostras foram trituradas em placas de petri, juntamente com o padrão de referência (*Pisum sativum* -9,09 pg de DNA) contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos LB01. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e tela de 50 µm e posteriormente corada com 25 µL de iodeto de propídeo (Figura 1). Todo esse processo foi realizado sob gelo triturado. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur 4 cores (Becton Dickinson – BD) e os histogramas obtidos no software Cell Quest™ e analisados no programa WINMDI (2011), assim a leitura da fluorescência emitida por cada núcleo é transformada em um ponto no histograma.

A determinação da quantidade de DNA foi feita pela posição relativa do pico G1 da planta analisada em relação à posição do pico G1 de um padrão de referência (9,09 pg). Os valores de conteúdo de DNA e os coeficientes de variação (CV) dos tratamentos (seis com quatro repetições) foram submetidos à

análise de variância, sendo os coeficientes de variação e índices de DNA comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% pelo programa estatístico SISVAR.

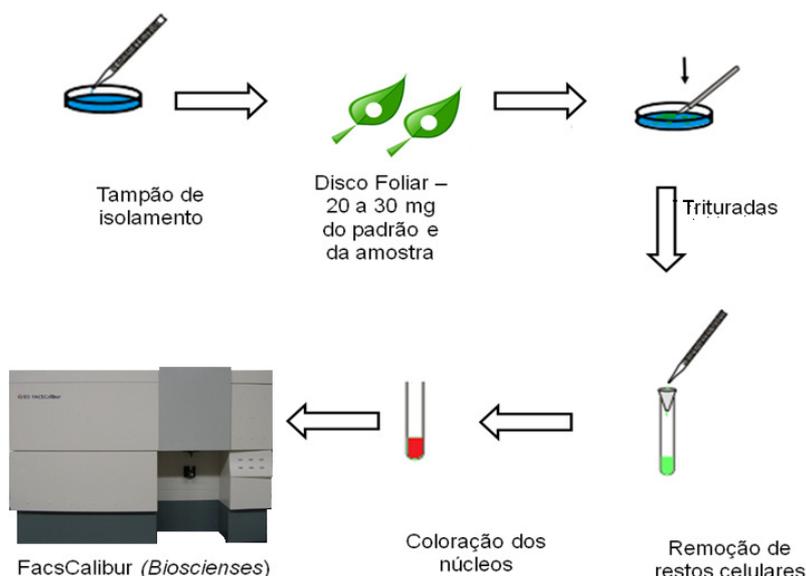


Figura 1- Diagrama da metodologia utilizada para analisar o conteúdo de DNA nuclear dos tecidos de bananeira por citometria de fluxo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2, estão representados os histogramas obtidos pelas análises de citometria de fluxo de seis genótipos (di, tri e tetraplóides) de *Musa acuminata* Colla. Os resultados geraram os picos G1 e G2 que representam respectivamente, a maior parte dos núcleos que estão na fase G1 da interfase e aqueles que estão na fase G2 da interfase juntamente, com os núcleos que estão em mitose. O pico G2 nem sempre é formado. O vale formado entre os dois picos representa o período de síntese de DNA, ou seja, a fase S da interfase. Como foram analisados simultaneamente dois materiais vegetais, os histogramas geraram dois picos G1. O primeiro referente à análise das amostras de bananeira, enquanto o segundo é o do padrão de referência interno (*Pisum sativum*). Os picos menores formados são referentes à fase G2 da interfase e mitose e não são necessários para as análises, portanto, são desconsiderados. A razão entre estes

dois picos (*Musa e Pisum*) foi utilizada como base para calcular o conteúdo de DNA das amostras de bananeira.

Nos histogramas é possível observar que quanto mais DNA tem a amostra mais à direita se forma o pico, portanto, o material diploide tem o pico formado mais à esquerda em relação ao tetraploide.

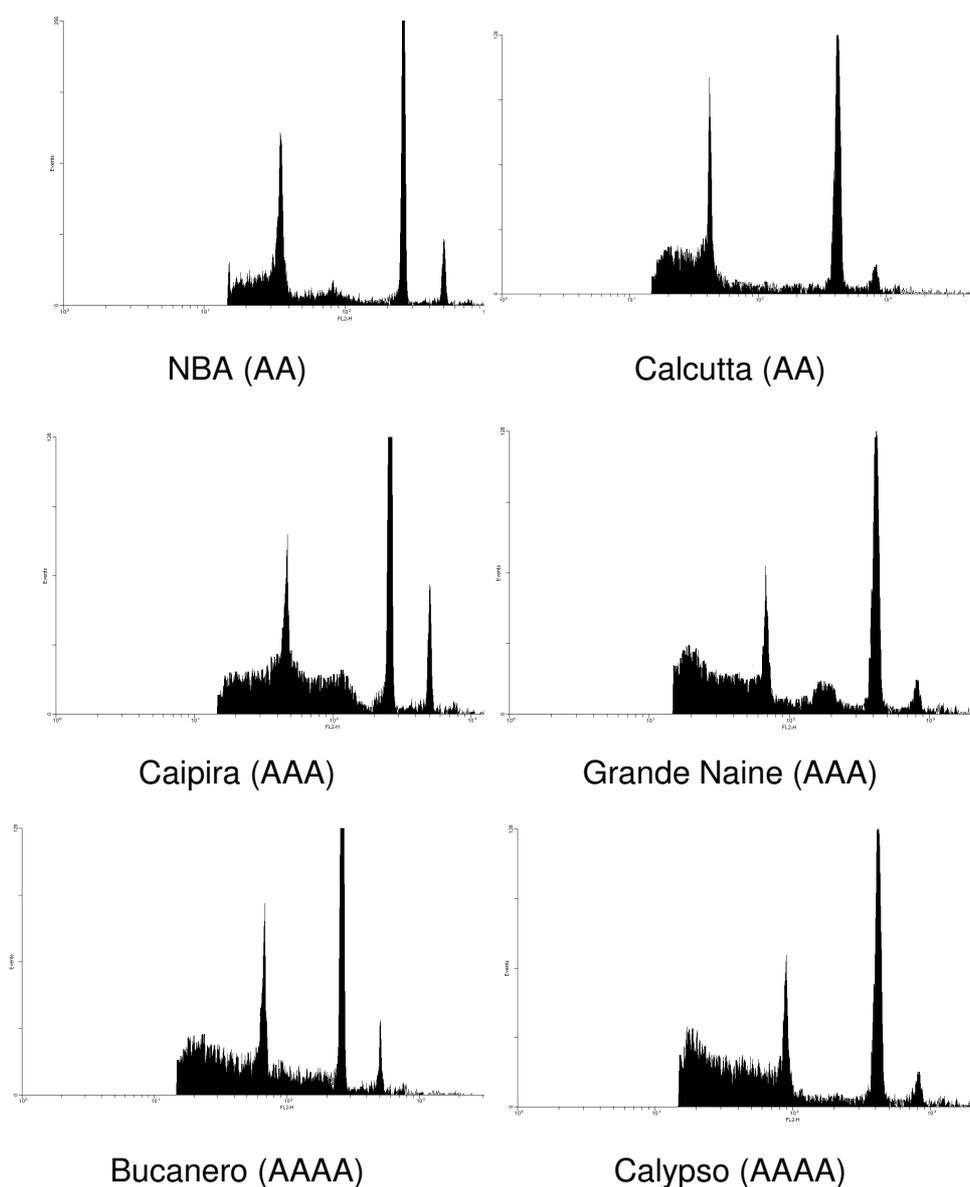


Figura 2. Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo em *Musa acuminata* Colla. O pico maior à esquerda de cada histograma corresponde ao G1 das amostras dos diploides (NBA e Lidi), triploides (Caipira e Grande Naine) e os tetraploides (Bucanero e Calypso) e os picos à direita ao padrão de referência (*Pisum sativum*).

No presente estudo, assim como no de Jesus (2010) e Madail (2011) foi utilizado como padrão interno a ervilha (*Pisum sativum*), que possui um conteúdo de 2 C de DNA de 9,09 pg. Este padrão foi escolhido por possuir um conteúdo de DNA cujo valor situa-se no meio do valor médio para a maioria dos conteúdos de DNA vegetal, podendo, desta forma, ser utilizado para avaliar tanto plantas com um pequeno genoma quanto aquelas com um genoma grande. Além disso, o genoma nuclear das ervilhas é estável e o preparo de suspensões de núcleos a partir das suas folhas não libera composto que interfere na coloração pelo iodeto de propídeo (DOLEZEL & BARTOS, 2005).

Na Tabela 1 são mostrados os resultados encontrados para o conteúdo de DNA estimado de seis acessos de bananeira com três diferentes níveis de ploidia.

Tabela 1. Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para acessos de bananeira (*Musa acuminata*) com diferentes níveis de ploidia.

Variedade	Genoma	Índice de DNA (pg)	CV
Calcutta	AA	0,96 a*	0,84 b
NBA	AA	0,96 a	1,15 b
Grande Naine	AAA	1,48 b	0,61 a
Caipira	AAA	1,63 c	1,01 b
Calypso	AAAA	1,90 d	0,64 a
Bucanero	AAAA	2,26 e	0,96 b
CV%		3,88	27,90

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

Os coeficientes de variação (CV) encontrados para os picos G1 variaram de 0,61 a 1,15 % (Tabela 1), caracterizando um excelente resultado, inferior ao encontrado em trabalhos bastante citados com bananeira, como o de DOLEZEL et al. (1994), cujos coeficientes ficaram entre 2,5 % e 4,5%. Segundo GALBRAITH et al. (2002) coeficientes de variação de até 5% são aceitáveis. Houve diferença entre os CVs dos genótipos de diferentes ploidias, no entanto, todos foram muito inferiores ao máximo aceitável.

Os índices de DNA para os diploides Calcutta e NBA foram de 0,96 pg. As variedades Grande Naine e Caipira, que são triploides, apresentaram 1,48 pg e 1,63 pg de DNA, respectivamente, formando dois grupos diferentes (b e c), ambos com diferença significativa do agrupamento dos diploides, que se encontram no grupamento a. A 'Caipira' apresentou tamanho de genoma ligeiramente maior que a Grande Naine, embora ambas sejam triploides. Os tetraploides Calypso (1,90 pg) e Bucanero (2,26 pg), também formaram dois grupos diferentes com os valores mais altos de DNA. Como eram esperados, os índices de DNA encontrados para os diploides foram os menores, para os triploides intermediários e nos tetraploides os maiores índices, foram observados. A diferença observada na quantidade de DNA de indivíduos de mesma ploidia, como em Grande Naine e Caipira, pode ser devida à origem diferentes dos acessos, como observado por DOLEZEL et al. (1994), existe variação de quantidade de material genético no genoma A.

MADAIL (2011), em trabalhos com 15 genótipos de bananeira encontrou o valor de DNA semelhante para a variedade Caipira (1,54 pg). Em acessos tetraploides, JESUS (2010) encontrou valores para o conteúdo de DNA que variaram entre 2,28 pg e 2,56 pg, portanto, próximos aos observados dos neste estudo.

4 CONCLUSÕES

A citometria de fluxo é um método confiável para determinação do nível de ploidia em *Musa acuminata* Colla.

Os genótipos diploides Calcutta e NBA possuem os menores genomas, os triploides Grande Naine e Caipira apresentam genoma intermediário e os tetraploides Calypso e Bucanero têm os maiores genomas, confirmando a relação esperada entre conteúdo de DNA e nível de ploidia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKRY, F.; REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. 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, p. 3-12, 2007.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, 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. 3, p. 99-110, 2005.

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

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. p. 41-65.

EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. V. Exploitation of flow cytometry for plant breeding. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 4B, p. 743-750, 2005.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

GALBRAITH, D. W.; LAMBERT, G.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J.; DARZYNKIEWICZ, Z.; DEAN, P.; DRESSLER, L.; RABINOVITCH, P.; STEWART, C.; TANKE, H.; WHEELLESS, L. (eds). **Current protocols in cytometry**. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2002. p. 1-22.

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

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

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

LOUREIRO, J.C.M.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v.77, p.18-29, 2004.

MADAIL, R. H. **Descritores morfológicos e conteúdo de DNA na caracterização de acessos de bananeira**. 2011. 104p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

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

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

SHAPIRO, H. M. The Evolution of Cytometers. **Cytometry Part A**, v. 58A, p.13–20. 2004.

SILVA, S. O.; MORAIS, L. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. Melhoramento Genético de Bananeira para Resistência às Doenças. In: ROMANO R.; RAMOS, R. E. S. (Org.). **Recursos Genéticos Vegetais no Estado da Bahia**. Feira de Santana: UEFS, v.1, 2005. p. 49-67.

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

TIERSCH TR, CHANDLER RW, WACHTEL SSM, ELLIAS S. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. **Cytometry**, v.10, p.706 – 710, 1989.

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

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

WINMDI. 2011. Disponível em:
<http://www.denovosoftware.com/site/fcsexpressvswinmdi.shtml?gclid=CJyb4cy3irACFQS0nQodZR0QLg/>. Acessado em: 10 set. 2011.

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DE ACESSOS DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS¹

¹Artigo que será submetido ao comitê editorial do periódico Ciência e Agrotecnologia.

CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DE ACESSOS DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS

Autora: Manuela Ramos da Silva

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientador: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientador: Edson Perito Amorim

RESUMO: Trabalhos com duplicação de cromossomos necessitam de estudos para a confirmação da ploidia que pode ser feita por métodos convencionais e por métodos indiretos. Esse estudo objetivou estimar indiretamente a espessura foliar, com base na massa de discos foliares e caracterizar anatomicamente folhas de genótipos de bananeira com diferentes ploidias para serem usadas na distinção de indivíduo diploide de tetraploide de bananeira. Utilizaram-se genótipos diploides AA (Calcutta e Lidi), triploides AAA (Grande Naine e Williams) e tetraploides AAAA (Bucanero e Calypso). Para análise da massa fresca, seca (mg) e suas massas específicas (mg cm^{-2}) foram usados discos foliares retirados de diferentes posições de folhas de quatro plantas de cada genótipo. O estudo anatômico foi realizado com amostras seccionadas em cortes transversais e paradérmicos (secção adaxial e abaxial da folha) e observadas em microscópio Ken-a-vision. A massa específica obtida da massa fresca dos discos retirados na parte apical da folha foi estatisticamente superior em relação às demais posições. Na posição apical, a média da massa específica dos diploides foi inferior à dos poliploides. Essa característica pode ser usada para estimar a ploidia dos genótipos de bananeira. Anatomicamente observou-se que os tetraploides tiveram estômatos maiores e em menor quantidade por em comparação às outras ploidias. Assim, a massa fresca e sua massa específica, com a retirada dos discos foliares na parte apical da folha e o estudo anatômico do tamanho e quantidade dos estômatos dos tetraploides podem ser utilizadas como método de pré-seleção para distinguir genótipos de bananeira com diferentes níveis de ploidia. Mais estudos com esses métodos indiretos precisam ser realizados.

Palavras chave: *Musa acuminata*, discos foliares, anatomia foliar.

ANATOMIC CHARACTERISTICS OF BANANA ACCESSIONS WITH DIFFERENT PLOIDY LEVELS

Author: Manuela Ramos da Silva

Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-advisor: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-advisor: Edson Perito Amorim

Abstract: Works of chromosome duplication need of study in order to confirm ploidy levels, which can be carried out by conventional methods (chromosome counts and flow cytometry) or by indirect methods (morphological or structural characteristics of plants). The objective of the present work is to indirectly estimate leaf thickness using the mass of leaf discs as the basis and automatically characterize leaves from banana genotypes with different ploidy levels to be used in order to distinguish between diploid and tetraploid bananas. The AA diploids (Calcutta and Lidi), AAA triploids (Grande Naine and Williams) and AAAA tetraploids (Bucanero and Calypso), were used. For the specific mass analysis, leaf discs were taken from different positions of the first, second and third leaves from four plants of each genotype. The anatomic study was carried out with samples taken of transversal and paradermic cuts (abaxial and adaxial surfaces). The material was observed under the Ken-a-vision microscope. The specific mass obtained from the fresh mass of the leaf discs taken from the apical section of the leaf was superior in comparison to the remaining positions for the genotypes in study. The average of the specific mass of the diploids was inferior of that poliploids on discs taken from this position. The ploidy level estimation of the banana genotypes was only possible using the fresh and specific mass of the leaf discs from apical position. For the anatomic studies of the leaves, the tetraploids sampled had the largest stomata and in less amount, in comparison to the other ploidy levels. These results show that the fresh and specific mass, with the withdrawl of the leaf discs from the apical section of the leaf and the size and amount of stomata may be used as a pre-selection method for distinguishing banana genotypes from different ploidy. More studies regarding these indirect methods are still needed.

Key words: *Musa acuminata*, leaf discs, leaf anatomy.

1 INTRODUÇÃO

A hibridação é o método de melhoramento genético mais empregado em bananeira. Apesar de muitas cultivares já terem sido desenvolvidas por esse sistema, os cruzamentos são normalmente dificultados pela esterilidade constatada em alguns diploides e triploides, que apresentam baixa ou nenhuma produção de sementes. Problemas dessa natureza podem ser contornados, mediante a escolha adequada dos genitores ou pelo uso de tecnologias não convencionais de melhoramento (SILVA et al., 2011).

O uso de métodos não convencionais de melhoramento genético de bananeira, a exemplo da duplicação de cromossomos, é uma importante estratégia para contornar a esterilidade e gerar triploides. A duplicação cromossômica de diploides permite a produção de plantas autotetraploides férteis, que depois de avaliados e selecionados em campo, podem ser utilizados em cruzamentos com diploides melhorados para geração de triploides secundários.

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. Para facilitar trabalhos, dessa natureza, faz-se necessário o desenvolvimento e uso de técnicas práticas e seguras para pré-seleção e identificação dos poliploides putativos (GANGA & CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007, SILVA et al., 2011).

Normalmente, após a indução da duplicação de cromossomos, são efetuadas multiplicações e o enraizamento *in vitro* das brotações regeneradas. Nesse processo, é obtido um grande número de plantas, que depois são aclimatizadas *ex vitro*. No entanto, entre as plantas tratadas e regeneradas algumas, ou mesmo, a maioria, pode não ter os cromossomos duplicados surgindo assim, os mixoploides, diploides ou aneuploides. Por este motivo é imprescindível a realização de uma pré-seleção dos prováveis poliploides (poliploides 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, processo esse que é muito trabalhoso (BAKRY et al., 2007; COSTA, 2010). Esses métodos, apesar de seguros e utilizados com frequência, tornam-se inadequados quando se trabalha com elevado número de plantas. Vale também ressaltar que nem sempre se dispõe de um citômetro, cujo preço de aquisição é elevado.

Em geral, sugere-se o uso da pré-seleção que é efetuada na fase de aclimatização e se baseia nas características morfológicas e ou estruturais como resultado dos efeitos da poliploidização (COSTA, 2010). A associação entre o nível de ploidia e as características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliploides, principalmente porque as células, tecidos e órgãos das tetraploides são maiores ou tem “efeito gigas” (SOUZA & QUEIROZ, 2004). Em bananeira, os poliploides normalmente são plantas vigorosas, mais compactas, com crescimento lento, apresentando folhas e pseudocaule mais espessos. Poliploides também demonstram maior resistência à perda de água pelas folhas (SILVA et al., 2008).

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), Witkowski & Lamont (1991), Scalon et al. (2001), e dessa forma constituir-se em um método rápido de determinação da ploidia pela estimativa indireta da espessura da folha (COSTA, 2010). 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 a massa seca ou fresca de discos foliares e a área do disco), sendo que os poliploides estariam entre os indivíduos que apresentam maior massa específica foliar. Porém, a medida precisa desta espessura foliar ainda não é uma metodologia adotada na pré-seleção de indivíduos de bananeira tratados com antimetabólitos. Costa (2010) utilizou esse método em plantas de bananeira tratadas com diferentes concentrações de colchicina.

Nem sempre é possível distinguir os diferentes níveis de ploidia com base somente nos métodos indiretos. Pois esses podem levar a uma classificação equivocada de determinados genótipos, uma vez que as características em que se baseiam os métodos indiretos podem ser influenciadas pelo ambiente. Porém,

quando se trata de um número muito grande de plantas, eles poderão ser utilizados como uma pré-seleção de prováveis poliploides (SARI et al., 1999; SOUZA & QUEIROZ, 2004).

Outro método indireto usado para a identificação do nível de ploidia é que se baseia em características anatômicas, como diâmetro do grão de pólen, número e tamanho de cloroplastídeos e tamanho de células (VILLA, 1995; MAGALLANES et al., 1996; SOUZA & QUEIROZ, 2004). Esta técnica além de ser relativamente rápida e fácil para a avaliação do nível de ploidia permite ainda estimar correlações estatísticas (SOUZA & QUEIROZ, 2004).

Assim, este estudo teve por objetivo adequar a metodologia de uso da espessura foliar com base na massa fresca e seca de discos foliares para ser usado na pré-seleção de genótipos com diferentes ploidias e efetuar a caracterização anatômica de acessos de bananeira di, tri e tetraploides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Espessura foliar na diferenciação de ploidia em bananeira

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas, BA, utilizando os genótipos, diploides AA (Lidi e Calcutta), triploides AAA (Williams e Grande Naine) e tetraploides AAAA (Bucanero e Calypso).

Utilizaram-se quatro mudas do tipo chifrinho de cada genótipo que foram plantadas em vasos plásticos contendo cinco litros de substrato vegetal e esterco de gado, em telado. A irrigação foi realizada manualmente, uma vez por dia. Após cinco meses foram retiradas amostras para o estudo de espessura de folha.

Três discos foram retirados de cada uma das duas partes do limbo foliar, nas posições (apical, mediana e basal) da primeira, segunda e terceira folha expandida das mudas de cada genótipo (Figura 1). Para tanto, utilizou-se um vazador de 3,5 cm de diâmetro. A coleta dos discos foliares foi realizada nas primeiras horas de cada manhã, a partir das sete horas. Imediatamente após a excisão as amostras foram colocadas 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 das massas dos discos.

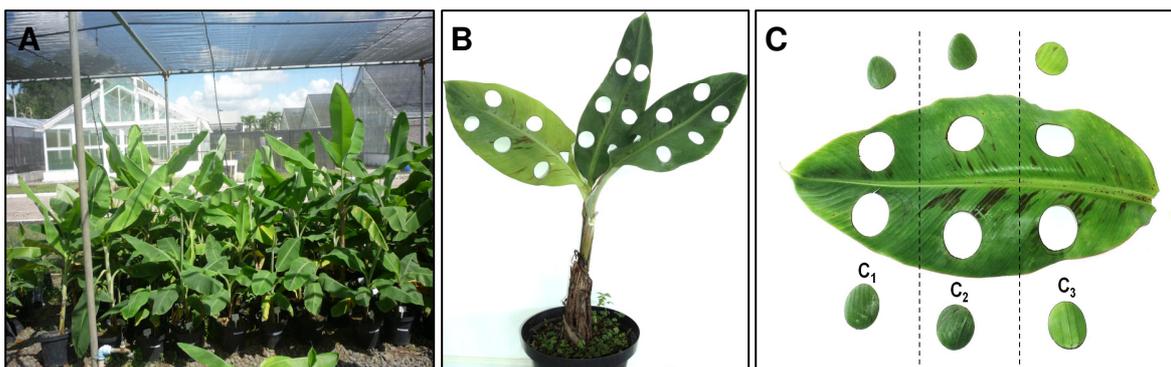


Figura 1. Mudas desenvolvidas em telado (A), retirada dos discos nas três primeiras folhas da planta (B), posição dos furos C (C_1 : apical, C_2 : mediana e C_3 : basal) nas duas lâminas da folha.

A massa fresca e seca de cada disco foi determinada em balança de precisão (0,001 g), sendo a massa seca obtida após secagem em estufa de ventilação forçada (60 °C por 48 horas). Já a massa específica de cada disco, em mg cm^{-2} , foi determinada dividindo-se a massa fresca ou seca (mg) de cada disco pela área do vazador (9,616 cm^2).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 (genótipos) x 3 (número de folhas) x 3 (posição do furo na folha) com quatro repetições por tratamento.

Os dados foram avaliados estatisticamente mediante a análise de variância, comparando-se as médias da massa fresca e seca pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2003).

Caracterização anatômica na diferenciação de ploidia em bananeira

Foram utilizados os genótipos Calcutta, Lidi, Grande Naine, Willams, Calypso e Bucanero oriundos do banco de germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram retiradas cinco amostras foliares (cinco plantas) entre o bordo e a nervura central na região mediana da segunda folha expandida de cada genótipo (Figura 2). As amostras foram previamente fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) por 72 horas e conservadas em álcool etílico 70% ($v v^{-1}$) e enviadas para análise no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

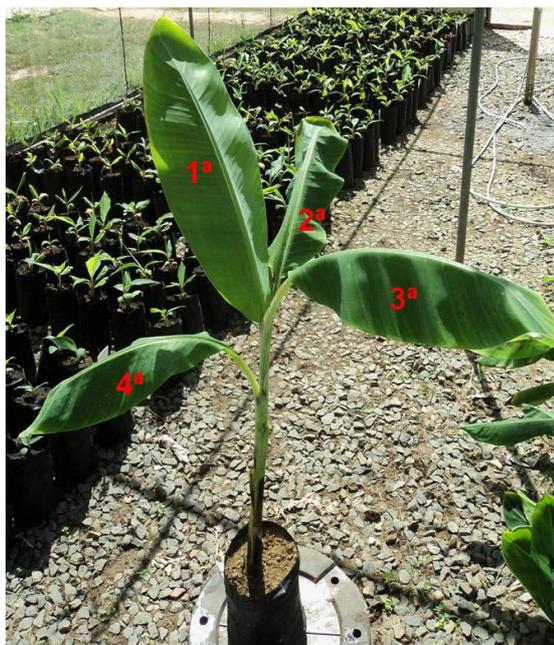


Figura 2. Planta de bananeira mostrando a posição da primeira, segunda e terceira folha.

As amostras foliares foram seccionadas em cortes transversais e paradérmicos (face abaxial e adaxial), obtidos em micrótomo de mesa manual e à mão livre, os quais foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio (1,0% -1,25% de cloro ativo) e tríplice lavagem em água destilada. As secções transversais foram coradas com solução safrablau (safranina 1% e azul de astra 0,1%, na proporção 7:3) e as secções paradérmicas coradas com safranina 0,1% e, posteriormente, montadas em lâminas semipermanentes com água glicerinada (KRAUS & ARDUIN, 1997). O material foi observado e fotografado em microscópio Ken-a-vision,

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espessura foliar

Houve diferenças entre os resultados de massa específica (ME) ao se usar os resultados da massa fresca (MF) e seca dos discos (MS) coletados nos seis genótipos de bananeira avaliados. As interações entre os genótipos e a posição dos furos na folha e entre genótipos e número da folha foram significativas para a ME obtida da massa fresca (MEMF) e para a ME da massa seca (MEMS) respectivamente (Tabela 1 e 2). As demais interações não foram apresentadas

pela falta de significância (F^{ns}) observada entre os valores de massa específica. (Anexo 1).

Para ME usando a massa fresca dos discos foliares (MEMF) retirados da posição apical da folha, os tetraploides Calypso e Bucanero e o triploide Grande Naine apresentaram as maiores médias, que não diferiram estatisticamente entre si, no entanto, a média da massa específica da Grande Naine também não apresentou diferença estatística da observada na Williams. Por sua vez, os diploides Lidi e Calcutta tiveram as menores médias de massa específica, embora diferentes entre si, essas médias também apresentaram diferenças estatísticas das observadas em triploides e nos tetraploides. Esses resultados de médias de massa específica, com exceção da MEMF da cultivar Grande Naine, que diferiu estatisticamente da Williams, foram observados nos discos retirados nas posições apical, mediana e basal (Tabela 1).

Também pode ser observado na Tabela 1, que a massa específica obtida da matéria fresca (MEMF) dos discos retirados na parte apical da folha foi estatisticamente superior em relação às das demais posições para todos os genótipos estudados.

Tabela 1. Massa fresca (MF) e massa específica com base na massa fresca (MEMF) dos discos retirados em três posições nas folhas dos genótipos de bananeira com diferentes ploidias. Cruz das Almas, BA, 2011.

Genótipo	Posição do Furo na Folha					
	Apical		Mediana		Basal	
	MF (mg)	MEMF (mg cm ⁻²)	MF (mg)	MEMF (mg cm ⁻²)	MF (mg)	MEMF (mg cm ⁻²)
Lidi	197,62	20,55 dA	184,21	19,16 dB	172,49	17,94 dC
Calcutta	209,92	21,83 cA	196,49	20,43 cB	184,44	19,18 cC
Grande Naine	265,73	27,63 abA	252,85	26,29 aB	222,31	23,12 aC
Williams	256,26	26,65 bA	234,92	24,43 bB	208,07	21,64 bC
Calypso	273,12	28,40 aA	254,00	26,41 aB	226,01	23,50 aC
Bucanero	269,74	28,05 aA	251,82	26,19 aB	226,40	23,54 aC
CV %	5,72					

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a média de massa específica com base na massa seca dos discos foliares, os maiores valores da interação genótipos e número da folha, foram observados no triploide Grande Naine nas três folhas, embora a MEMS desse

acesso não tenha diferido estatisticamente da média da massa específica da Williams e dos tetraploides Calypso e Bucanero na folha 1, da Lidi na folha 2, e da de todos os acessos, com exceção da média do diploide Calcutta, na folha 3 (Tabela 2). Também pode-se observar que não houve diferença significativa entre as folhas (1, 2 e 3) para o diploide Calcutta, triploide Williams e os tetraploides Bucanero e Calypso. Já para o diploide Lidi e o triploide Grande Naine, as maiores médias de MEMF foram observadas nas folhas 2 e 3. As médias de massa específica desses dois genótipos não diferiram estatisticamente em nenhuma das três folhas (Tabela 2). Com esses resultados não é possível estimar a ploidia dos acessos de bananeira estudados, com base na massa específica da massa seca, pois as médias dos genótipos poliploides não apresentaram diferenças estatísticas dos diploides.

Assim, a resposta distinta da massa específica com base na massa fresca, daquela obtida com massa seca, pode ser explicada pela maior turgidez dos acessos de maior ploidia, efeito esse que é eliminado, quando se retira a umidade, ao se usar a massa seca.

Tabela 2. Massa seca (MS) e massa específica com base na massa seca (MEMS) dos discos retirados em três folhas dos genótipos de bananeira com diferentes ploidias. Cruz das Almas, BA, 2011.

Genótipo	Número da Folha					
	1		2		3	
	MS (mg)	MEMS (mg cm ⁻²)	MS (mg)	MEMS (mg cm ⁻²)	MS (mg)	MEMS (mg cm ⁻²)
Lidi	349,57	36,35bcB	404,53	42,07abA	419,93	43,67aA
Calcutta	332,17	34,54cA	340,42	35,40cA	342,63	35,63bA
Grande Naine	406,75	42,30aB	447,00	46,50aA	421,13	43,79aAB
Williams	369,58	38,43abcA	398,67	41,46bA	399,29	41,52aA
Calypso	380,67	39,60abA	398,67	41,46bA	377,29	39,23abA
Bucanero	395,50	41,13aA	377,92	39,30bcA	410,13	42,65aA
CV (%)	14,35					

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Alguns autores relataram que a relação entre massa e área foliar possibilita a identificação de indivíduos que apresentem maior espessura de folha

(BENINCASA, 1988; WITKOWSKI & LAMONT, 1991; SCALON et al. 2001), e segundo Costa (2010) essa informação pode ser usada em um método rápido de determinação da ploidia em bananeira pela estimativa indireta da espessura da folha.

Os resultados desse trabalho demonstram que somente a massa específica baseada na massa fresca foi eficaz em distinguir os triploides e tetraploides dos diploides em bananeira. Também foi observado que os discos retirados na parte apical da folha foram os que tiveram os melhores resultados para todos os genótipos. Assim, essa técnica, com os devidos cuidados, pode ser utilizada para estimar a ploidia, como um método de pré-seleção para as plantas de bananeira duplicadas, apesar de Sari et al. (1999) e Souza & Queiroz (2004) afirmarem que nem sempre é possível distinguir os diferentes níveis de ploidia com base somente nos métodos indiretos, pois pode ocasionar uma classificação equivocada de determinados genótipos, uma vez que essas características podem ser influenciadas pelo ambiente. Esse problema não é tão grave uma vez que a ploidia poderá ser confirmada em etapas posteriores do melhoramento.

Caracterização anatômica

As folhas de bananeira amostradas dos diferentes genótipos apresentaram a mesma estrutura básica, com uma epiderme unisseriada revestindo tanto a face abaxial quanto adaxial das folhas. Abaixo da epiderme ocorre uma ou duas camadas de células alongadas no sentido periclinal, caracterizando uma morfologia tabular para as células da hipoderme. Ocorreram estômatos em ambas as faces da epiderme caracterizando folhas anfiestomáticas (Figura 3).

O clorênquima, em sua maior parte, era composto por duas camadas de células de parênquima paliçádico. Observou-se ainda, um parênquima esponjoso, que pode ser formado por células tabulares, onde ocorrem câmaras de ar, formando grandes espaços intercelulares maiores do que o tamanho de uma célula. Os feixes vasculares eram colaterais fechados com xilema voltado para a face adaxial e o floema para a face abaxial das folhas. Foi observada uma bainha do feixe parênquimática e bem desenvolvida, que em alguns genótipos, apresentava extensões de feixes compostas de fibras (Figura 3).

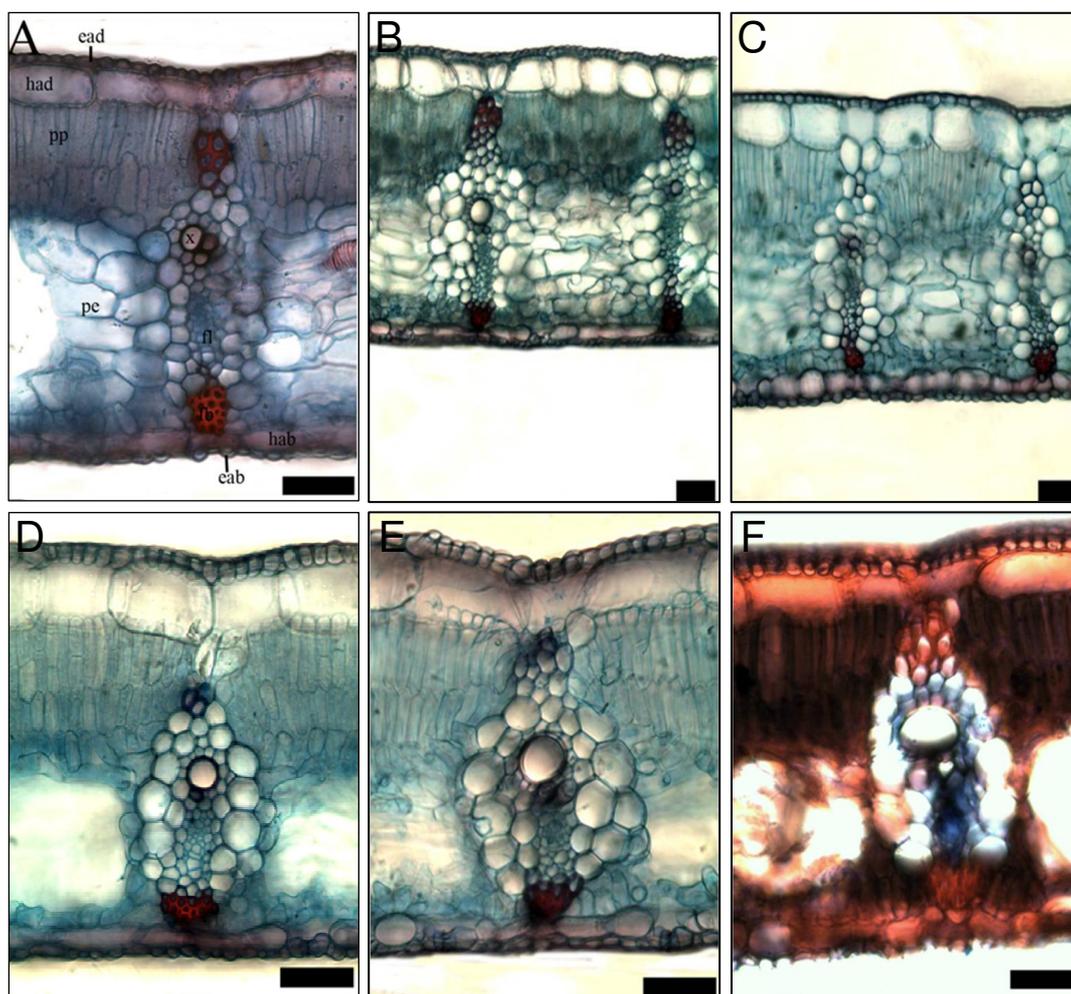


Figura 3. Secções transversais de folhas de diferentes genótipos de banana. A: AA Calcutta; B: AAA Grande Naine; C: AAAA Bucanero; D: AA Lidi; E: AAA Williams; F: AAAA Calypso; ead: epiderme da face adaxial; eab: epiderme da face abaxial; had: hipoderme da face adaxial; hab: hipoderme da face abaxial; pp: parênquima paliçádico; pe: parênquima esponjoso; x: xilema; fl: floema; fb: fibras. Barras: 50 µm.

Foram observadas diferenças na espessura dos diferentes tecidos foliares dos genótipos de bananeira amostrados, embora não tenham sido feitas medidas. Os genótipos AAAA Bucanero e AAA Grande Naine apresentaram espessura do limbo superior aos demais genótipos amostrados (Figura 3). Uma maior espessura do limbo permite o desenvolvimento de mais clorênquima, sendo típico de folhas de sol que apresentam folhas mais espessas (CASTRO et al., 2009).

Dessa forma, esses genótipos parecem demonstrar folhas com maior capacidade de aproveitar a radiação incidente, possuindo potencial para o cultivo em áreas com maior incidência de radiação e temperaturas. Os genótipos Bucanero e Grande Naine apresentaram também um maior número de camadas da bainha dos feixes vasculares, mostrando ainda células maiores nessa região em comparação com os demais genótipos. Esses genótipos tinham uma menor proporção de cavidades de ar no parênquima esponjoso, que era preenchido quase que totalmente por tecido parênquimático. A hipoderme da face adaxial foi particularmente espessa no genótipo AAAA Bucanero em relação aos demais (Figura 3).

A hipoderme pode ser uma eficiente barreira para reduzir a transpiração excessiva, podendo ainda atenuar a radiação que chega sobre o clorênquima e armazenar água, sendo importante em plantas sujeitas ao estresse hídrico e excesso de radiação (CASTRO et al., 2009). Dessa forma, o genótipo Bucanero pode ser uma alternativa interessante para ambientes secos por reunir um grande número de caracteres mais xeromorfos na folha.

Os estômatos dos genótipos de bananeira observados eram tetracíclicos, possuindo quatro células subsidiárias, duas paralelas e duas perpendiculares ao eixo longitudinal do estômato (Figura 4), estando presentes em ambas as faces das folhas, contudo, em maior quantidade na face adaxial (Figuras 4 e 5). Embora não tenham sido realizadas contagens e nem medidas, foram observadas diferenças entre o tamanho e o número de estômatos por área entre os diferentes genótipos, em ambas as faces das folhas. Os genótipos AA Calcutta, AAA Grande Naine, AAA Williams e AA Lidi apresentaram uma quantidade de estômatos maior que os genótipos tetraploides Bucanero e Calypso em ambas as faces das folhas, sendo que esses estômatos foram menores em tamanho (Figuras 4 e 5). Considerando que genótipos tetraploides apresentaram estômatos maiores e em menor quantidade em comparação aos diplóides, essa característica poderá ser usada para trabalhos de melhoramento por duplicação na identificação de poliploides.

Maiores densidades estomáticas podem estar relacionadas a uma maior capacidade de captação de CO₂ e podem otimizar o processo fotossintético (CASTRO et al., 2009). Contudo, os estômatos também são uma porta para a perda de água na forma gasosa (CASTRO et al., 2009). Dessa forma, os

genótipos AAAA Bucanero e AAAA Calypso podem apresentar menor quantidade de estômatos que pode restringir tanto a entrada de CO₂ quanto a perda de água e que certamente podem influenciar nas características de crescimento dessas plantas.

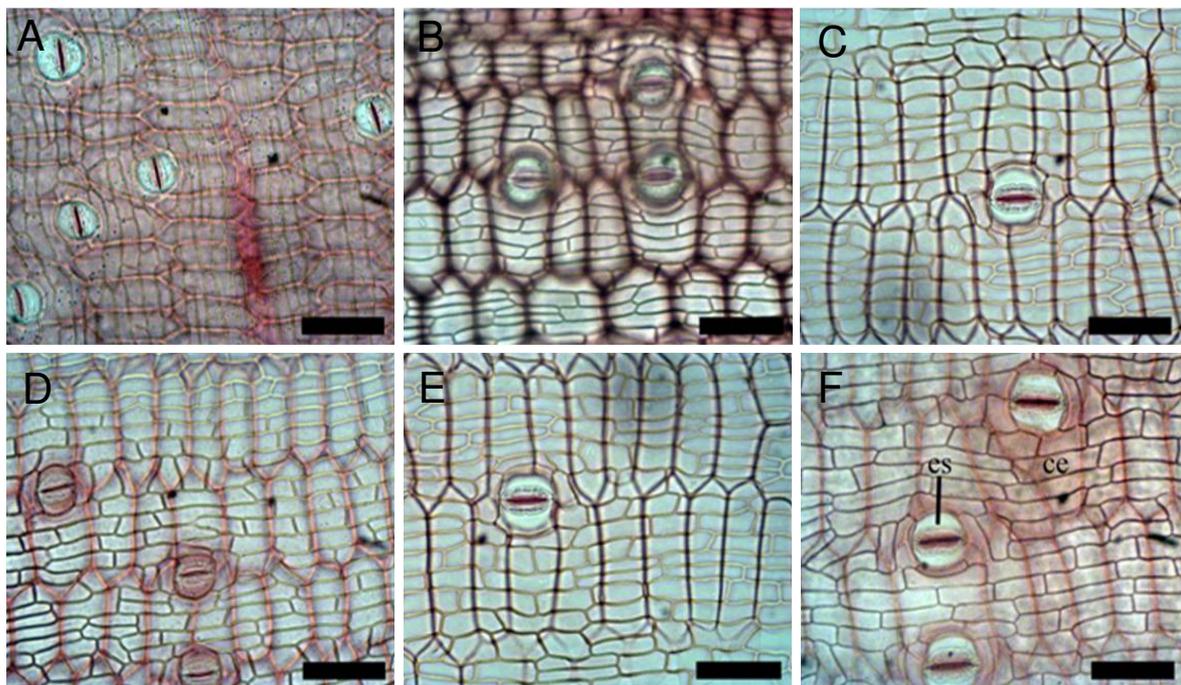


Figura 4. Secções paradérmicas da face abaxial de folhas de bananeira de diferentes genótipos. A: AA Calcutta; B: AAA Grande Naine; C: AAAA Bucanero; D: AA Lidi; E: AAA Williams; F: AAAA Calypso. es: estômato; ce: célula epidérmica regular. Barra: 50 µm.

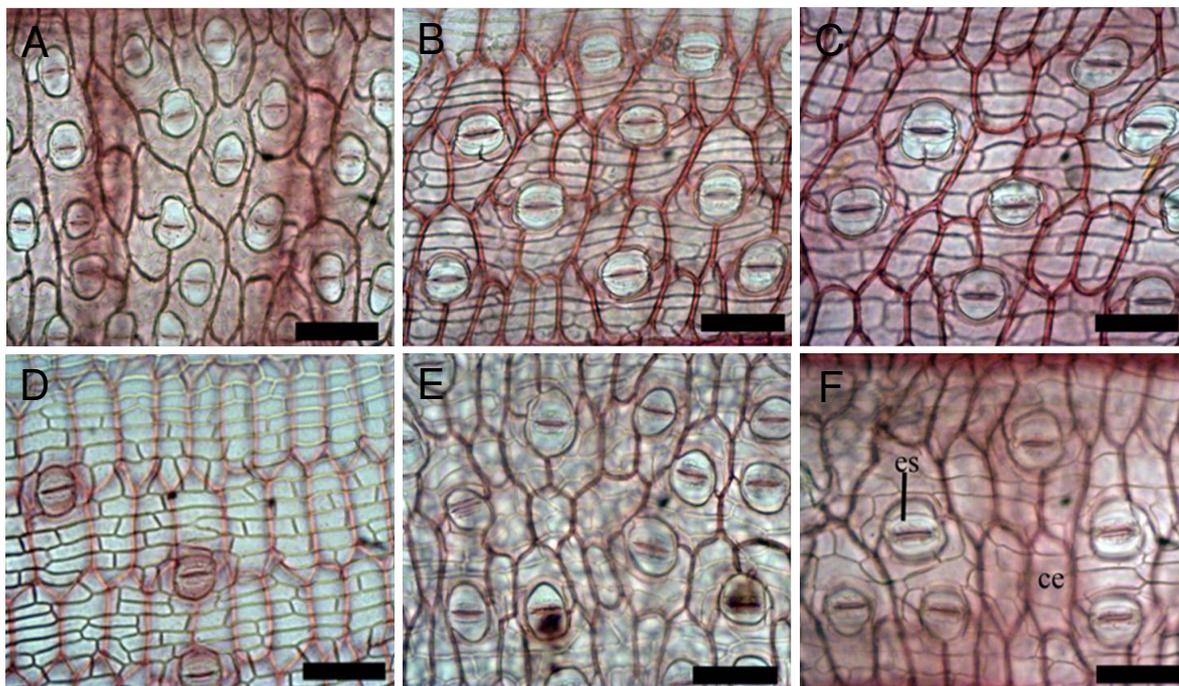


Figura 5. Secções paradérmicas da face adaxial de folhas de bananeira de diferentes genótipos. A: AA Calcutta; B: AAA Grande Naine; C: AAAA Bucanero; D: AA Lidi; E: AAA Williams; F: AAAA Calypso. es: estômato; ce: célula epidérmica regular barras: 50 μ m.

A estrutura interna das folhas de bananeira dos genótipos observados estão de acordo com trabalhos previamente publicados (COSTA et al., 2009) e a grande plasticidade observada entre os genótipos confirma a necessidade de estudos mais detalhados quantificando as diferenças observadas em resposta a diferentes condições ambientais.

4 CONCLUSÕES

A massa específica com base na massa fresca de discos foliares retirados na parte apical da folha pode ser utilizada para distinguir os diploides dos poliploides em bananeira.

A anatomia da folha especificamente, o tamanho e quantidade dos estômatos, podem ser usados para distinguir diploides de tetraploides em trabalhos de melhoramento por duplicação de cromossomos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKRY, F.; REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicines treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, Paris, v. 62, p. 3-12, 2007.

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

CASTRO, E; M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 234p. 2009.

COSTA, F. H. da S. **Poliploidia no melhoramento genético da bananeira**. 2010. 92p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COSTA, F. H. S.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 386-392, 2009.

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

FERREIRA, D. F. **SISVAR** – Versão 4.3. DEX/ UFLA. Lavras: 2003.

JOHANSEN, B.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523p.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198p.

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

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

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

SCALON, S. P. Q.; SCALON FILHO, H.; RIGONI, M. R.; VERALDO, F. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 652-655, 2001.

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

SILVA, S.O.; MORAIS-LINO, L.S.; SEREJO, J. A. S. Melhoramento genético de bananeira para resistência à Sigatoka-negra. In: CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. de; Silva, S. de O. (Org.). **Recomendações técnicas sobre a Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: Nova Civilização Ltda., v. Único, 2011. p. 61-70.

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

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

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

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

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA TURGESCÊNCIA FOLIAR DE ACESSOS DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS¹

¹Artigo submetido ao comitê editorial do periódico Ciência Rural.

AVALIAÇÃO DA TURGESCÊNCIA FOLIAR DE ACESSOS DE BANANEIRA COM DIFERENTES PLOIDIAS

Autora: Manuela Ramos da Silva

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientador: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientador: Edson Perito Amorim

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a turgescência celular das folhas dos genótipos diploides (Calcutta e Lidi), triploides (Grande Naine e Williams) e tetraploides (Bucanero e Calypso) de bananeira usando o aparelho Wiltmeter[®], com leitura direta na planta e por meio de discos foliares e relacionar esta característica com o nível de ploidia. Pelo método de leitura direta utilizou-se quatro plantas de cada genótipo, sendo feita as medições na segunda folha de cada planta. As leituras foram realizadas em três horários diferentes (6:30 h, 12:00 h e 16:30 h). Pelo método com discos coletou-se a segunda folha das plantas para a retirada dos discos foliares que foram utilizados para as análises da pressão de turgescência e conteúdo relativo de água. Na pressão de turgescência realizada diretamente nas plantas as maiores médias foram obtidas no triploide Williams (153,06 kPa) e no tetraploide Bucanero (137,91 kPa) e os diploides Lidi e Calcutta apresentaram os potenciais mais baixos (75,87 kPa e 83,99 kPa, respectivamente). Em relação aos horários das medições da pressão de turgescência a maior média foi encontrada as 6:30 h da manhã. A pressão de turgescência e o conteúdo relativo de água analisados com discos foliares não apresentaram diferenças entre os genótipos avaliados. Assim, pode-se concluir que a pressão de turgescência só pode ser usada para distinguir diploides dos poliploides, quando obtida diretamente na planta pelo aparelho Wiltmeter[®] e em leituras realizadas às 6:30 h da manhã.

Palavras chave: Wiltmeter[®], pressão de turgescência, *Musa* sp.

EVALUATION OF LEAF TURGOR IN BANANA ACCESSIONS WITH DIFFERENT PLOIDY LEVELS

Author: Manuela Ramos da Silva

Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-advisor: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-advisor: Edson Perito Amorim

This work aimed to evaluate the cell turgor of leaves from the di, tri and tetraploid banana genotypes using the Wiltmeter[®] equipment, with direct reading on the plant and by leaf discs, and relate this characteristic with the ploidy level. By the direct reading method, four plants of each genotype were used, whereas the readings were carried out directly in the second leaf of each plant. The readings were carried out in three different time periods (6:30 a.m., 12:00 p.m. and 16:30 p.m.). For the other method, the second leaf was collected for taking out leaf discs which were used for the analysis of turgor pressure and relative water content. As to the turgor pressure obtained directly on the plants, the highest averages were obtained for the Williams triploid (153.06 kPa) and the Bucanero tetraploid (137.91 kPa) and the Lidi and Calcutta diploids presented lower potentials (75.87 kPa and 83.99 kPa, respectively). In regard to the time periods of the measurement of the turgor pressure, the highest average was for 6.30 p.m. The turgor pressure and relative water content analyzed with the leaf discs did not present differences among the genotypes evaluated. Therefore, it can be concluded that the turgor pressure may only be used to distinguish diploids from polyploids, when obtained directly in the plant using the Wiltmeter equipment in readings carried out at 6:30 a.m.

Key words: Wiltmeter, turgor pressure, *Musa* sp.

1 INTRODUÇÃO

O método de melhoramento mais utilizado em bananeira é o convencional mediante o cruzamento de diploides pré-melhorados AA (genitor masculino) com triploides comerciais e conseqüente geração de híbridos tetraploides. Contudo, esse método não tem alcançado sucesso na geração de novas cultivares do Subgrupo Cavendish, devido à esterilidade observada nesses genótipos (BAKRY et al., 2007).

As dificuldades da hibridação na maioria das variedades têm levado ao desenvolvimento de novas técnicas de melhoramento de bananeira para a criação de cultivares resistentes às doenças, as quais complementam e dão suporte às atividades convencionais. As técnicas baseadas na biotecnologia, a exemplo da duplicação do número de cromossomos *in vitro*, assume grande importância para complementar as atividades convencionais do melhoramento genético de cultivares estéreis de bananeira.

A duplicação cromossômica de diploides permite produzir plantas autotetraploides férteis que ao cruzar com diploides melhorados geram triploides secundários, podendo, assim, introduzir resistência a pragas nos híbridos gerados e outras características desejáveis (SILVA et al., 2002; BAKRY et al., 2007; SILVA et al., 2011).

No entanto, em trabalhos dessa natureza, há grande necessidade de identificar rapidamente os autotetraploides, pois essa técnica pode gerar um grande número de plantas com diferentes ploidias. Para isso, faz-se necessário o uso de métodos diretos (contagem de cromossomos e citometria de fluxo) (GUERRA, 1989; VILLA, 1995) e indiretos (caracterização anatômica, como diâmetro do grão de pólen, número e tamanho de cloroplastídeos, tamanho de células) (VILLA, 1995; MAGALLANES et al., 1996; SOUZA & QUEIROZ, 2004) para estimar a ploidia das plantas duplicadas.

Além dos métodos indiretos já mencionados, a turgescência celular das folhas pode também ser empregada para diferenciar diploide de poliploide, uma

vez que, os indivíduos com maior ploidia normalmente apresentam células mais túrgidas (BAKRY et al., 2009). Segundo Calbo et al. (2010) as medidas do potencial de turgor de folhas podem ser facilmente obtidas, com o uso de um aparelho denominado Wiltmeter[®] (Figura 1A) que foi desenvolvido pela Empresa Instrumentação Agropecuária (CALBO & NERY, 1995).

O Wiltmeter[®] é um tipo de aplanador que serve para medir a firmeza dependente da turgescência celular de folhas e de segmentos planares de órgãos, como por exemplo, de hortaliças e flores (CALBO et al., 2008). Esse equipamento é portátil e de fácil uso, pois faz medidas objetivas diretamente na planta, utilizando discos foliares, podendo ser realizada durante toda vida da planta. Segundo Dutra et al. (2011) as medidas realizadas por esse equipamento em células do mesófilo possibilitam estudos sobre efeito de luz, temperatura e transpiração, além da possibilidade de ser utilizado na avaliação do estado hídrico e em manejo de irrigação.

Além do potencial de turgor pelo aparelho Wiltmeter[®], muitos consideram que o conteúdo relativo de água seja mais bem correlacionado com os fatores fisiológicos das plantas, por apresentar forte relação com volume celular, relevante no metabolismo de plantas sob o déficit hídrico (JHONES, 1992), entretanto, problemas metodológicos na determinação deste parâmetro, como determinação da massa túrgida e interferência da respiração e fotossíntese no ganho ou perda de massa do tecido tem dificultado a sensibilidade do índice e sua aplicação (DUTRA et al., 2011).

O conteúdo relativo de água pode ser estimado com precisão usando a relação entre a diferença de peso fresco e seco com a diferença de peso túrgido e seco, denominando peso relativo dos tecidos (SMART & BINGHAM, 1974). O uso de metodologia com hidratação rápida de tecido foliar tem eliminado a fonte de erro na determinação do conteúdo relativo de água e a alta correlação dessa característica com o potencial de água, possibilita estimá-lo adequadamente (CALBO et al., 2010).

Assim, este trabalho visou avaliar a turgescência celular das folhas dos genótipos di, tri e tetraploides de bananeira usando o aparelho Wiltmeter[®], com leituras diretas na planta e em de discos foliares e relacionar o conteúdo de água com o nível de ploidia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas jovens de bananeira dos genótipos diploides AA (Lidi e Calcutta), triploides AAA (Williams e Grande Naine) e tetraploides AAAA (Bucanero e Calypso) desenvolvidas em vasos plásticos contendo cinco litros de substrato vegetal constituído por terra e esterco de gado, em casa de vegetação em ambiente monitorado (Tabela 1).

Tabela 1. Temperatura média (Tmed) e umidade relativa (UR) da casa de vegetação referente ao período da realização dos experimentos de turgescência foliar. Cruz das Almas, BA. 2011.

Período	Tmed (°C)	UR (%)
03/10/2011	30,25	55,10
04/10/2011	30,10	57,30
05/10/2011	27,28	66,54
06/10/2011	28,77	61,50
07/10/2011	28,74	58,11

Turgescência foliar por leitura direta

A pressão de turgescência foi medida na casa de vegetação usando o aparelho Wiltmeter[®] (Figura 1A) por meio do método de leitura direta, seguindo a metodologia de CALBO et al. (2008). Foi utilizada a segunda folha de quatro plantas de cada genótipo (Figura 1B e C) e as leituras foram realizadas em três horários (6:30 h, 12:00 h e 16:30 h), durante cinco dias consecutivos.

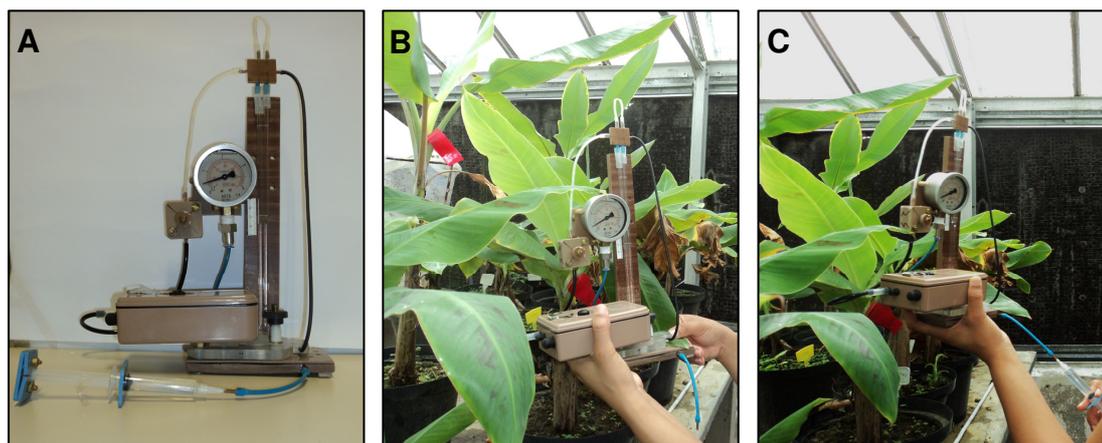


Figura 1. Aparelho Wiltmeter[®] (A) medindo a turgescência celular das folhas diretamente nas plantas de bananeira (B e C).

Para evitar variação nas leituras da turgescência das plantas em decorrência de irrigação irregular, dez dias antes das avaliações iniciou-se uma irrigação manual colocando 200 mL de água em cada planta, sempre no final da tarde. Esse procedimento continuou a ser realizado durante todo o período do estudo.

A calibração do aparelho foi realizada de acordo com a metodologia descrita por CALBO et al. (2010) antes e durante os dias de leitura nos três horários diferentes com a finalidade de corrigir possíveis desvios do fator Wiltmeter (w). Sua realização é necessária para obtenção do fator de correção o valor “ w ” que corrige a pressão lida no aparelho para a pressão de turgescência (P_{tu}), sendo $P_{tu} = P_a \times w$, onde P_a é a pressão lida no aparelho.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 (genótipos) x 3 (horários) com cinco repetições e quatro plantas por unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos genótipos e dos horários comparadas pelos testes de Scott-Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade usando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

Turgescência foliar e conteúdo relativo de água usando discos foliares

Nesse estudo foram utilizadas cinco plantas dos genótipos avaliados que foram mantidas em casa de vegetação, onde a irrigação foi feita de forma manual colocando 200 mL de água por planta, sempre no final da tarde.

A segunda folha de cada planta dos acessos foi coletada, armazenada em caixas de isopor com gelo, e levada ao laboratório para a retirada dos discos foliares, que foram utilizados para as análises de turgescência foliar e conteúdo relativo de água.

As medidas da pressão de turgescência dos discos foliares foram obtidas utilizando o aparelho Wiltmeter[®]. Já o conteúdo relativo de água foi calculado através da relação entre a diferença do peso fresco e seco e a diferença do peso túrgido e seco dos discos foliares multiplicado por 100. O peso túrgido dos discos foliares foi obtido por hidratação rápida, com remoção do excesso de água da superfície dos tecidos e o peso seco dos discos obtido em estufa de ar forçado, a 60 °C por um período de 24 horas.

A hidratação dos tecidos foliares foi realizada de acordo a metodologia de CALBO & FERREIRA (2011) com algumas adaptações, no qual os discos foliares com aproximadamente 4 cm², sem nervuras, foram colocados em câmara de pressão contendo água destilada (Figura 2), submersas através de um peso e submetidas a uma pressão de uma atmosfera por meio de um compressor de ar (bomba a vácuo) por 3 minutos, e em seguida esperou-se por 15 minutos para ocupação dos espaços intracelulares.

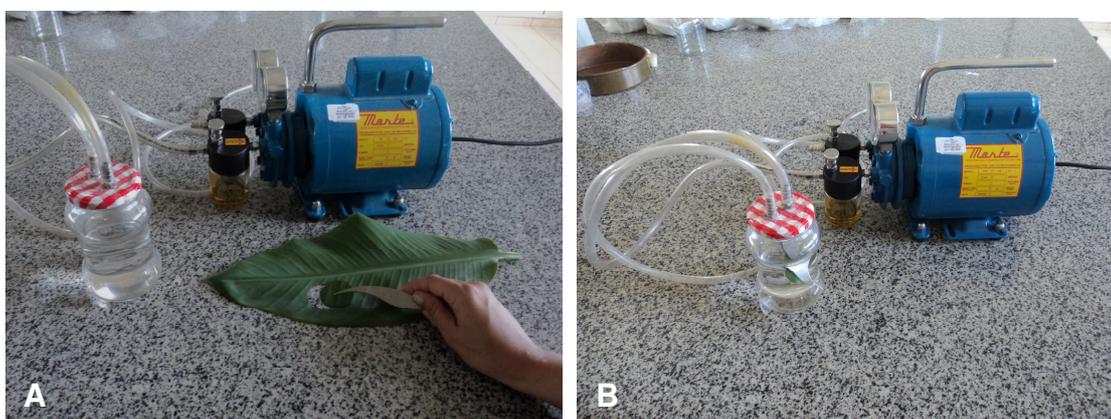


Figura 2. Hidratação dos tecidos foliares: coleta dos discos foliares (A) e hidratação dos discos foliares em câmara de pressão acoplada à bomba a vácuo (B).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos (genótipos) e cinco repetições de quatro discos foliares. Os dados foram avaliados estatisticamente mediante a análise de variância, comparando-se

a média da variável pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade usando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Turgescência foliar por leitura direta

Na avaliação do potencial de turgescência das células das folhas dos genótipos em três horários, a interação (genótipos x horário) não foi significativa. Contudo, houve significância nos fatores isolados.

Entre os genótipos as maiores médias da pressão de turgescência foram obtidas no triploide Williams (153,06 kPa), que pertence ao mesmo grupamento do tetraploide Bucanero (137,91 kPa). Os acessos AAA Grande Naine e AAAA Calypso, do segundo grupo apresentaram valores de quilo Pascal (kPa) intermediário (118,97 e 109,54), respectivamente. No último grupo, com menores valores de kPa foram classificados os diploides Lidi (75,87) e Calcutta (83,99) (Figura 3). O Wiltmeter[®] foi usado para determinar a turgescência foliar no trabalho com a variedade de mamoeiro Sunrise conduzido por DUTRA et al. (2011), que encontraram valores de turgescência entre 80 e 160 kPa, semelhantes ao desse estudo. No entanto, os objetivos desses trabalhos foram completamente diferentes. Em DUTRA et al. (2011) buscou-se estimar o conteúdo relativo de água por meio de medições de potencial turgor obtidos com Wiltmeter[®] em folhas de mamoeiro, já o presente estudo, teve como objetivo relacionar a turgescência foliar com a ploidia dos genótipos de bananeira. Vale ressaltar que esse é o primeiro estudo dessa natureza usando o Wiltmeter[®].

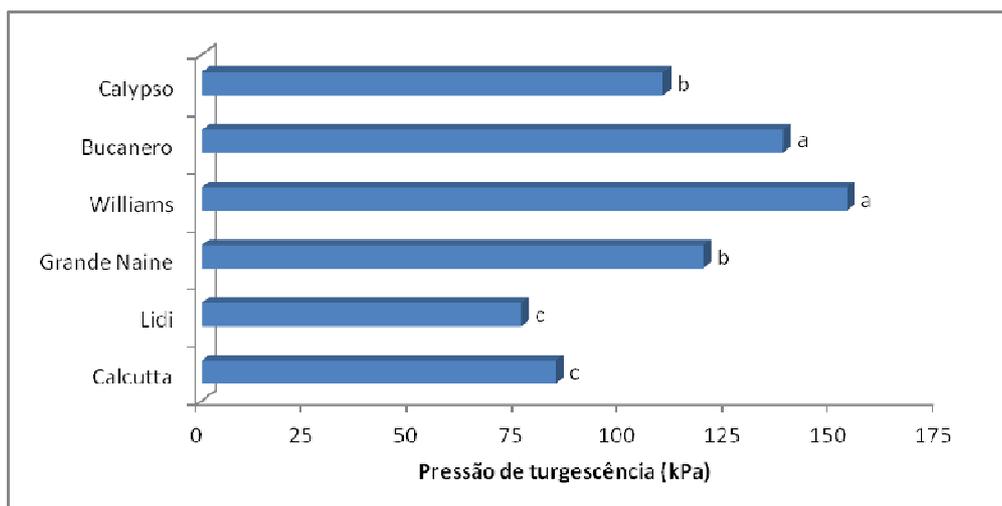


Figura 3. Média do potencial de turgor (kPa) obtida diretamente nas plantas dos genótipos de bananeira com diferentes ploidias utilizando o aparelho Wiltmeter[®]. *Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%) = 31,99.

As leituras de turgescência foliar foram realizadas às 6:30 h, 12:00 h e 16:30 h e a escolha dos horários foi baseado nos fatores fisiológicos (temperatura, luminosidade e irradiância solar) que afetam a abertura e o fechamento estomático. Para o fator horário, a média da pressão de turgescência nas folhas obtida às 6:30 h da manhã (127,38 kPa) foi estatisticamente superior às obtidas nos outros horários para todos genótipos avaliados (Figura 4). Pela manhã, os tecidos estão mais túrgidos, particularmente no parênquima clorofiliano, clorênquima e nas células epidérmicas que são as mensuradas com o Wiltmeter[®]. Sob a luz do sol as células-guardas de folhas túrgidas se abrem e facilitam a transpiração. Ao longo do dia com os estômatos abertos ocorre transpiração e o potencial ou pressão de turgescência das folhas diminui (PIMENTA, 2004) (Figura 4). Conseqüentemente o Wiltmeter[®] é um aparelho interessante para acompanhar a variação da pressão de turgescência das folhas (Figura 3), que na bananeira é particularmente útil tendo-se em vista que a pressão de turgescência no início da manhã foi significativamente menor nos genótipos diploides do que nos genótipos poliploides.

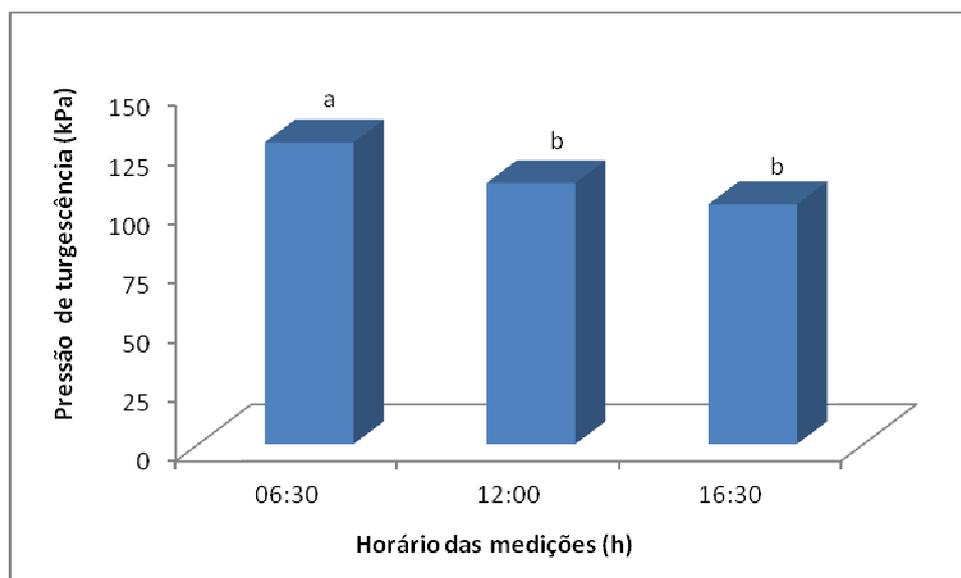


Figura 4. Média do potencial de turgor (kPa) obtida diretamente nas plantas dos genótipos de bananeira medidas pelo aparelho Wiltmeter[®] em diferentes horários. *Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV (%) = 31,99.

Assim, verifica-se que o uso da pressão de turgescência possa ser usado para distinguir diploides de poliploides em trabalho de melhoramento por duplicação de cromossomos, onde se necessita avaliar rapidamente a ploidia de um grande número de indivíduos.

Turgescência foliar e conteúdo relativo de água em discos foliares

As médias das variáveis, pressão de turgescência e conteúdo relativo de água obtidas em discos foliares dos diferentes genótipos, não apresentaram diferença significativa, embora variaram respectivamente, entre 84,54 kPa (Williams) e 107,12 kPa (Grande Naine) e entre 76,09% (Calcutta) e 81,19% (Grande Naine) (Tabela 2). A falta de diferenças significativas relativas às folhas de bananeira destacadas e levadas a laboratório, quanto a pressão de turgescência e quanto ao teor relativo de água, pode ter sido causada pelo fato das folhas de bananeira terem sido levadas para laboratório em caixas de isopor com gelo. Já que a bananeira é uma espécie sabidamente sensível ao frio e essa injúria causa perda de semi-permeabilidade das membranas, vazamento de solutos e perda de turgescência celular (LYONS, 1973). Este efeito possivelmente

causou rápida perda de turgescência e diminuiu a capacidade de hidratação das células que é necessário nas medições de teor relativo de água.

Tabela 2. Potencial de turgor (kPa) e do conteúdo relativo de água (%) para as medições dos discos foliares dos genótipos de bananeira com diferentes ploidias.

Génotipos	Potencial de Turgor (KPa)	Conteúdo Relativo de Água (%)
Calcutta	88,99 a*	76,09 a
Lidi	94,41 a	78,25 a
Williams	84,55 a	78,45 a
Grande Naine	107,12 a	81,19 a
Bucanero	102,98 a	79,09 a
Calypso	101,59 a	80,19 a
CV%	13,65	20,06

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Diante dos resultados desses experimentos, verifica-se que somente as medições do potencial turgescência realizadas diretamente na planta com o aparelho Wiltmeter[®] pode ser usada para estimar a ploidia das plantas duplicadas pelos agentes antimitóticos. Assim, o Wiltmeter[®], um aparelho portátil e de fácil uso na medição da pressão de turgescência das folhas, poderá ser usado de maneira indicativa na pré-seleção de poliploides durante a fase de aclimatização das plantas, em trabalhos de melhoramento para duplicação de cromossomos.

CONCLUSÃO

A pressão de turgescência pode ser usada para estimar os diploides dos poliploides de bananeira, por meio de medidas realizadas diretamente na planta pelo aparelho Wiltmeter[®] nas primeiras horas da manhã.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HORRY, J. Genetic improvement of banana. In: JAIN, S. M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Eds.). Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species. Springer, p. 3-46. 2009.

BAKRY, F.; REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. 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, p. 3-12, 2007.

CALBO, A. G.; FERREIRA, M. D. Evaluation of hydration indexes in kale leaves. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2011.

CALBO. A. G.; FERREIRA. M. D.; PESSOA. J. D. C. Medida da firmeza de folhas com Wiltmeter[®] - fundamento e método. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 26. n. 2. p. S4154-S4159. 2008.

CALBO. A. G.; FERREIRA. M. D.; PESSOA. J. D. C. A leaf lamina compression method for estimating turgor pressure. **HortScience**, v. 45, n. 3, p. 418-423, 2010.

CALBO. A. G.; NERY. A. A. Medida de firmeza em hortaliça pela técnica de aplanção. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 14-18, 1995.

DUTRA, A. D.; SAMPAIO, A. H.; GUIMARÃES, M. J. M.; SILVA, R. O; CALBO, A. G.; COELHO FILHO, M. A. Relação entre conteúdo relativo de água e potencial de turgor obtido com Wiltmeter[®] em folhas de mamoeiro. In: SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO: Inovação e Sustentabilidade, 5, Porto Seguro, BA. **Anais...** Porto Seguro: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 1 CD-ROM.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** – Versão 4.3. DEX/ UFLA. Lavras: 2003.

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

JHONES, H. G.; **Plants and Microclimate**. A quantitative Approach to Environmental plant physiology, Ed. 2. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

LYONS, J.M. Chilling Injury in Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, p.445-466, 1973.

PIMENTA, J. A. Relações Hídricas .In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2004. p. 1-39.

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

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

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

SMART, R. E.; BINGHAM, G. E. Rapid estimates of relative water content plant. **Plant Physiology**, v. 53, p. 258-260, 1974.

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

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de melhoramento mais utilizado em bananeira é o convencional mediante o cruzamento de diploides pré-melhorados AA (genitor masculino) com triploides comerciais e conseqüente geração de híbridos tetraploides. Na Embrapa, onde se emprega os triploides AAB, do tipo Prata e Maçã, a técnica é usada desde 1982 com relativo sucesso. A hibridação, no entanto, nem sempre pode ser utilizada, uma vez que muitos triploides, como as cultivares Cavendish não produzem sementes. Neste caso, podem ser empregadas técnicas de biotecnologia, como a duplicação de cromossomos, para contornar os problemas de esterilidade.

Nos trabalhos de indução de poliploides, a partir de diploides de bananeira, são gerados muitos indivíduos com diferentes níveis de ploidia (diploides, tetraplóides e mixoploides), que precisam ser identificados para permitir a seleção dos tetraploides, que serão usados nas próximas etapas do melhoramento para geração dos triploides secundários. A ploidia de um acesso pode ser estabelecida com segurança mediante a contagem do número de cromossomos, processo trabalhoso e muito demorado.

A estimativa do número de cromossomos pode ser feita por métodos diretos como o uso de citometria de fluxo e indiretos como aqueles que se baseiam nas características anatômicas das folhas. Considerando que em bananeira, os poliploides normalmente apresentam folhas mais túrgidas e arcadas e com limbo mais espesso, do que os diploides espera-se que tais características possam ser usadas para estimar a ploidia.

No presente estudo, foram sugeridos dois métodos práticos (indiretos) de estimar ploidia em bananeira. O primeiro, onde se usou a massa específica (espessura foliar) de discos foliares e o segundo baseado na turgescência da folha.

Conforme os resultados apresentados, ambos os métodos podem ser empregados para estimar a ploidia em bananeira e, salvo as restrições mencionadas, são adequados para distinguir diploides de tetraploides, atividade muito demandada no melhoramento genético da bananeira por duplicação.

ANEXOS

Anexo 1. Resumo da análise de variância com o teste F, coeficiente de variação e média geral para massa fresca e seca dos discos foliares de bananeira. Cruz das Almas, 2011.

FV	GL	QM	
		Massa Fresca (mg)	Massa Seca (mg)
Genótipo (G)	5	0.066618**	0.000559**
N.º de Folha (NF)	2	0.003100**	0.000274**
Posição do Furo na Folha (PFF)	2	0.055215**	0.000073 ^{ns}
Posição da Lâmina na Folha (PLF)	1	0.011010**	0.000356**
G * NF	10	0.000186 ^{ns}	0.000079**
G * PFF	10	0.000839**	0.000010 ^{ns}
G * PLF	5	0.00033 ^{ns}	0.000006 ^{ns}
NF * PLF	2	0.000037 ^{ns}	0.000025 ^{ns}
NF * PFF	4	0.000060 ^{ns}	0.000003 ^{ns}
PFF * PLF	2	0.000083 ^{ns}	0.000019 ^{ns}
G * NF * PFF	20	0.000068 ^{ns}	0.000019 ^{ns}
G * NF * PLF	10	0.000093 ^{ns}	0.00001 ^{ns}
G * PFF* PLF	10	0.000054 ^{ns}	0.000010 ^{ns}
NF * PFF* PLF	4	0.000029 ^{ns}	0.000004 ^{ns}
G * NF * PFF* PLF	20	0.000035 ^{ns}	0.000012 ^{ns}
Erro	342	0.000166 ^{ns}	0.000031 ^{ns}
CV (%)		5.72	14,35
Média Geral		0.225334	0.0387004

^{ns} não significativo e ** significativo a 1%, pelo teste de F.