

**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 MORFOAGRONÔMICA E CITOGENÉTICA DE  
BANANEIRAS AUTOTETRAPLOIDES OBTIDAS MEDIANTE  
DUPLICAÇÃO DE CROMOSSOMOS**

**CÍCERA MARIA DO AMARAL**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
ABRIL - 2013**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E CITOGENÉTICA DE  
BANANEIRAS AUTOTETRAPLOIDES OBTIDAS MEDIANTE  
DUPLICAÇÃO DE CROMOSSOMOS**

**CÍCERA MARIA DO AMARAL**

Bióloga

Universidade Regional do Cariri, 2003

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.

**Orientadora: Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo**

**Coorientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

A485 Amaral, Cícera Maria do

Caracterização morfoagronômica e citogenética de bananeiras autotetraploides obtidas mediante duplicação de cromossomos. / Cícera Maria do Amaral - Cruz das Almas, BA, 2013.  
80f.; il.

Orientador: Dra.: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2013.

1. Bananeira-Poliploidia. 2. *Musa acuminata*. 3. 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  
CÍCERA MARIA DO AMARAL**

---

Profa. Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo  
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Jose Geraldo de Aquino Assis  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

---

Dr . Alberto Duarte Vilarinhos  
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em ..... Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em .....

*Aprendendo a fazer ciência, levo a certeza que não somente o conhecimento em si tem grande importância, mas deve caminhar junto à humildade, a justiça, ao caráter, a dedicação extrema, ao estudo concentrado, a verdade, a tolerância e acima de tudo, a ética.*

*Cícera Amaral*

As mulheres da minha vida: minha mãe e meu grande amor Teresinha Pereira do Amaral (*in memoriam*), minhas irmãs Helena, Lenita e Andréa, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos, sempre. Minhas sobrinhas Andrezza e Tainah. A Janay, minha amiga e orientadora. E ao meu pai, André Alves do Amaral.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, pela presença constante e por fazer tudo possível, e nos muitos momentos difíceis e turbulentos, dá-me a sua paz, a sua coragem, o seu amor, e a serenidade para enfrentar os obstáculos e superar todos os desafios. Com o Senhor estou aqui.

À minha família: minha mãe Teresinha (*in memoriam*), pelo legado da dedicação, do amor, do gosto à leitura e a escrita, do respeito, da luta, do apoio fiel e da espiritualidade. A meu pai André Amaral, por sua ternura e incentivo; as minhas irmãs Helena, Lenita e Andréa, por se fazerem presentes nas alegrias, tristezas, em cada luta, cada vitória, por me fortalecerem e estarem comigo, sempre. Vocês são meu porto seguro e nosso amor é incondicional.

Aos meus filhos-sobrinhos que ficam na torcida por tudo aquilo que faço: Malba Efraim, André, Tainah, Andrezza e Kauã. E meu cunhado Lobo, a quem tenho todo o carinho e respeito, até como um segundo pai.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, pelo excelente curso oferecido.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade de negociação para realização do meu curso de Pós-Graduação, nível mestrado. É muito gratificante fazer parte desta Empresa.

A todos com quem convivi do Laboratório de Cultura de Tecidos, onde trabalhei e realizei todos estes experimentos.

À toda a equipe do Laboratório de Práticas Culturais (Sinésio, Rafael, Jorge, Magalhães, Teles e Bizunga) onde realizei os trabalhos de caracterização e no qual me deram suporte em todos os cruzamentos realizados, tudo isso regado ao afeto e ao gosto ao trabalho. Ao supervisor do Laboratório, Dr. Edson Perito, por me permitir fazer estas avaliações e uso de equipamento/acessórios necessários.

Ao meu coorientador Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, por acreditar em mim e ajudar de todas as formas possíveis para que eu chegasse até aqui. Contei com seu apoio, em todos os sentidos, para a realização de um sonho, que será o ponto de partida para muitos outros. Para mim, você é um exemplo de sabedoria e de simplicidade.

À minha orientadora, Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo, por toda atenção, amizade, apoio, incentivo, ensinamentos e pela valiosa contribuição na minha vida profissional e até pessoal. Foram vários os conhecimentos transmitidos e atenção dispensada, sempre com muita dedicação e paciência. Levo, além da bagagem técnica científica, o respeito da amizade consolidada, tanto sua, quanto do Sebastião.

Ao Dr. Antônio da Silva Souza, por me incentivar em momentos de fraqueza, me instruir e sempre me atender quando solicitado, esclarecendo tudo com muita tranquilidade. Uma pessoa especial.

Às bibliotecárias do CNPMF Sônia e Lucidalva, bem como aos seus estagiários Luciene e Danilo, pelo estímulo e suporte nas pesquisas bibliográficas. Um atendimento realizado com muita dedicação e competência.

A todos os meus professores do mestrado, pela minha preciosa formação acadêmico-científica.

Ao Tarciano (Pastel), que me ajudou em várias atividades no campo experimental, sempre prestativo e com muito humor.

Aos amigos Eliane Carollo e Carlos Vildoso, que me ajudaram na época difícil das disciplinas, me amparando, estudando comigo, madrugando junto para as minhas apresentações. Obrigada, vocês são também meus professores.

Ao Dr. Rômulo Carvalho, Dr. Zilton Cordeiro e Dr. Aristóteles Matos, que me tiravam dúvidas quando eu os procurava.

Ao Dr. José Souza, a quem muitas vezes eu solicito, e que está sempre disponível para ajudar.

Ao Dr. Carlos Ledo, meu professor de estatística, pela realização das minhas análises.

Aos meus colegas do curso de mestrado, sem exceção, pelo companheirismo, solidariedade, passeios, fraternidade, labuta e união. São momentos únicos nas nossas vidas.

A Mariana, Maria de Fátima, Thalita e Thaina, pelo acolhimento e gentileza.

A Cira, Dinélia, Estela, Anne, Bia, Pastor Robelito, Margarida, Ana Rita, Joana Angélica, Rafinha, Janáira e Juraci, pelas palavras de incentivo, pelas preces e pela eterna amizade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui. **OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO .....1

Capítulo 1

CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE BANANEIRAS  
AUTOTETRAPLOIDES OBTIDAS MEDIANTE DUPLICAÇÃO DE  
CROMOSSOMOS.....23

Capítulo 2

COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE BANANEIRAS  
AUTOTETRAPLOIDES 'LIDI' OBTIDAS MEDIANTE DUPLICAÇÃO DE  
CROMOSSOMOS.....48

CONSIDERAÇÕES FINAIS .....79

# **CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E CITOGENÉTICA DE BANANEIRAS AUTOTETRAPLOIDES OBTIDAS MEDIANTE DUPLICAÇÃO DE CROMOSSOMOS**

Autora: Cícera Maria do Amaral

Orientadora: Profa. Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

Coorientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

Resumo: A duplicação *in vitro* do número de cromossomos constitui uma importante ferramenta para complementar as atividades convencionais de melhoramento genético da bananeira mediante a produção de autotetraploides, os quais serão utilizados em cruzamento com diploides melhorados para a geração de triploides secundários. O presente estudo teve por objetivos caracterizar morfoagronomicamente plantas de bananeira 'Ouro' e 'Lidi' oriundas de tratamentos para indução da duplicação dos cromossomos e investigar o comportamento meiótico e a fertilidade do pólen dos autotetraploides de 'Lidi'. Os autotetraploides de 'Lidi' foram afetados pelo efeito da dosagem alélica, com aumento significativo em caracteres de interesse ao melhoramento quando comparado aos seus diploides originais, incluindo a resistência a Sigatoka amarela. Na caracterização citogenética as anormalidades variaram de 23,9% a 35,0% nos meiócitos dos diploides originais de Lidi e de 31,0% a 47,2% em seus autotetraploides, com maior concentração de anormalidades na metáfase I. As anormalidades mais comuns em todos os genótipos analisados com diferentes ploidias foram àquelas relacionados à ascensão precoce e segregação irregular de cromossomos que leva à formação de gametas desequilibrados. Embora tenham apresentado anormalidades meióticas, os autotetraploides de Lidi demonstraram boa fertilidade de pólen e, portanto, podem ser utilizados como parentais masculinos. Fertilidade feminina também foi detectada, pois as plantas produziram sementes, que variou de uma a três por planta, indicando que podem também, ser empregados como parentais femininos.

Palavras-chave: *Musa* spp., melhoramento genético, duplicação de cromossomos.

# MORPHOAGRONOMIC AND CYTOGENETICS CHARACTERIZATION OF AUTOTETRAPLOIDS BANANA OBTAINED BY CHROMOSOME DUPLICATION

Author: Cícera Maria do Amaral

Adviser: Profa. Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-Adviserr: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

**Abstract:** *In vitro* duplication of the chromosome number is an important tool to complement conventional activities in banana genetic breeding by autotetraploid production which to be used in crosses with improved diploids for developing secondary triploids. The present work aim to characterize morphologically 'Ouro' and 'Lidi' plants bananas from chromosome doubling and investigate the meiotic behavior and fertility of pollen grains of autotetraploids of 'Lidi'. The autotetraploids from 'Lidi' were affected by allelic dosage, with significant increase in interesting traits for breeding when compared to their original diploids, including resistance to yellow Sigatoka. For the cytogenetic characterization the abnormalities varied from 23,9% to 35,0% in the meiocytes of the original Lidi diploids and of 31,0% to 47,2% in their autotetraploids with greater concentration of abnormalities in metaphase I. The most common abnormalities in all genotypes analyzed with different ploidy levels were those related to early rise and irregular segregation of chromosomes leading to the formation of unbalanced gametes. Although the Lidi autotetraploids presented meiotic abnormalities, they showed good pollen fertility and therefore may be used as male parents. Female fertility was also detected since plants produced seeds which varied from one to three per plant, indicating that may be used as female parents.

Keywords: *Musa* spp., genetic breeding, chromosome doubling

## INTRODUÇÃO

A cultura da bananeira tem grande importância econômica e social no mundo, bem como no agronegócio brasileiro, pois se constitui parte importante da renda dos pequenos produtores e da alimentação das mais diversas camadas da população. Consumida quase que totalmente na forma *in natura*, a banana se destaca não só pelo seu valor nutritivo, mas também pelo baixo custo e sabor agradável. A fruta pode ser consumida *in natura* ou ser utilizada na preparação de pratos culinários, banana chips e outros produtos industriais, além do uso medicinal. A bananeira pode ser ornamental e sua fibra usada na confecção de artigos de decoração.

A produção mundial de banana é estimada em 106,5 milhões de toneladas, sendo o Brasil o quinto maior produtor, tendo produzido 7,3 milhões de toneladas em 2011, em uma área aproximada de 503 mil hectares. A produtividade brasileira (14,56 t/ha) é muito baixa quando comparada com a do mundo (20,66 t/ha) e com a da Índia (36,32 t/ha), maior produtor mundial (FAO, 2013).

Entre os problemas que impedem a obtenção de altos rendimentos na bananicultura estão as sigatokas amarela e negra, e o mal-do-Panamá, principais doenças 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 (SILVA et al., 2002). As sigatoka amarela e negra, ou ainda o mal-do-Panamá, podem causar perdas na produção de até 100%, a depender da cultivar e ou condições de cultivo. Uma das estratégias para a solução dos problemas mencionados é a criação de novas variedades por meio do melhoramento genético.

### **Esterilidade em cultivares de bananeira**

As bananeiras (*Musa* spp. L.) são herbáceas perenes, pertencentes à classe Monocotyledonae, ordem Scitaminales, família Musaceae. O gênero *Musa* está dividido em quatro subgêneros ou seções: (*Eu*)*musa* e *Rhodochlamys* ( $2n = 22$ ), *Callimusa* e *Australimusa* ( $2n = 20$ ), sendo o subgênero (*Eu*)*musa* o mais importante, pois é formado pelo maior número de espécies do gênero, apresenta ampla distribuição geográfica e abrange as espécies de bananas comestíveis (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955; SIMMONDS, 1973).

A maioria do germoplasma de banana originou-se no Continente Asiático. Outros centros secundários ocorrem na África Oriental, em algumas ilhas do Pacífico, além de um importante centro de diversidade genética na África Ocidental (CHAMPION, 1967). As cultivares encontradas nestas regiões evoluíram de espécies selvagens e apresentam três níveis cromossômicos distintos, diploides ( $2x$ ), triploides ( $3x$ ) e tetraploides ( $4x$ ), respectivamente com 22, 33 e 44 cromossomos, todos múltiplos do número básico ( $n=11$ ), sendo possível se constatar por meio de cruzamentos experimentais que as bananeiras triploides se originaram a partir de diploides, bem como os tetraploides a partir dos triploides (DODDS, 1943; SHEPHERD, 1984).

Hibridações intra e interespecíficas entre *M. acuminata* Colla (genoma A,  $2n=2x=22$ ) e *M. balbisiana* Colla (genoma B,  $2n=2x=22$ ), deram origem à maior parte dos genótipos cultivados e de interesse comercial, de forma que as plantas geradas destes cruzamentos apresentam características das duas espécies (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). Estudos realizados por estes autores propuseram um sistema de classificação das cultivares de banana aceita no mundo todo, o qual permitiu agrupar as cultivares a seus respectivos grupos genômicos: diploides AA, AB e BB; triploides AAA, AAB, ABB e BBB; e tetraploides AAAA, AAAB, AABB e ABBB. Além da definição dos grupos genômicos, foi estabelecido o uso do termo 'subgrupo', para denominar um conjunto de cultivares proveniente de mutações de uma única cultivar original (SIMMONDS, 1973), a exemplo, o grupo AAA, subgrupo Cavendish e grupo AAB, subgrupos Prata e Terra, no Brasil.

Dois importantes alterações determinaram a domesticação da bananeira. A ocorrência de partenocarpia por mutação em *M. acuminata* seguida da acumulação de esterilidade. Estas duas características foram

selecionadas pelo homem, dando origem a cultivares estéreis e a produção de frutos comestíveis. No que diz respeito à espécie *M. balbisiana* quanto à partenocarpia, sua participação é questionável, pois não são conhecidas cultivares partenocárpicas com genoma BB ou BBB (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955; CARREL et al., 1994).

Um dos fatores que poderia explicar o surgimento da esterilidade, provavelmente está relacionado à origem dos diploides cultivados que em sua maioria são híbridos entre subespécies distintas de *M. acuminata* com diferenças estruturais de seu genoma (PERRIER et al., 2009). A heterozigose estrutural surge a partir de rearranjos cromossômicos estruturais (duplicações, deleções, translocações e inversões) em um dos cromossomos homólogos. Os rearranjos cromossômicos estruturais podem afetar tanto o gameta masculino como o feminino (SHEPHERD, 1999).

Análises de células em meiose demonstraram que híbridos dentro de uma mesma subespécie não mostravam heterozigose estrutural, isto é, os cromossomos homólogos apresentavam pareamento regular (11 bivalentes). No entanto, híbridos entre subespécies apresentavam heterozigose estrutural, com pareamento incorreto (SHEPHERD, 1999). Essa heterozigose estrutural pode causar irregularidades meióticas, levando a quebras e perdas de fragmentos cromossômicos, sendo, portanto, um fator importante para causar esterilidade total ou parcial, tanto masculina como feminina (PERRIER et al., 2009).

Outras possíveis causas de esterilidade em *Musa* são ditas como sendo provenientes da ocorrência de translocação cromossômica e anomalias na meiose, como assínapse e aborto de sacos embrionários (SHEPHERD et al., 1987; SILVA et al., 2001; FORTESCUE; TURNER, 2005).

O complexo *Musa acuminata* foi dividido em sete grupos de translocação. O grupo de translocações mais amplamente distribuído em *M. acuminata* e outras espécies de *Musa* foi designado Northern Malayan (NM). Os demais grupos foram definidos com base no pareamento cromossômico durante a meiose. Dentro de cada grupo, os acessos selvagens apresentam a mesma estrutura cromossômica e são homocigotos para a estrutura, em contraste com a maioria dos acessos cultivados (SHEPHERD, 1999).

Os clones partenocárpicos diploides, triploides e tetraploides apresentam alta heterozigosidade estrutural para uma ou mais translocações ou inversões, enquanto que espécies selvagens e subespécies que produzem sementes não apresentam nenhuma heterozigosidade estrutural e tem pareamento cromossômico regular com a formação de 11 bivalentes (DODDS, 1943; DODDS; SIMMONDS, 1948; FAURE et al., 1993; SHEPHERD, 1999; WILSON, 1946a). Irregularidades meióticas, como a presença de univalentes, pontes na anáfase e de micrócitos no final da telófase, entre outras, influenciam a fertilidade de pólen em *Musa*, mediante a formação de gametas desbalanceados.

Estudos do comportamento meiótico em espécies selvagens (AA e BB) e cultivares diploides e triploides (AA, AAA, AAB , ABB e BBB) revelaram que maioria das bananeiras selvagens mostrou sinapses normais com alta frequência de células com 11 bivalentes. Por outro lado, as bananas cultivadas exibiram muitas variações nas associações cromossômicas na metáfase I. Cultivares com genoma AA apresentaram mais univalentes do que as espécies selvagens, com o mesmo genoma AA (THONNALAK et al., 2010).

Em alguns casos foi constatado que a esterilidade não era de origem genética direta, mas uma consequência de condições particulares, talvez de natureza hormonal, como deficiência do crescimento do tubo polínico nos estigmas e estiletos, ou mesmo defeito na fusão dos núcleos (DODDS, 1943), além do necrosamento prematuro na região do nectário da flor feminina, que impede a passagem do tubo polínico (SHEPHERD et al., 1986; SHEPHERD et al., 1987; SILVA et. al., 2001; FORTESCUE; TURNER, 2005; SOARES 2011). A escolha adequada dos genitores e ou o uso de tecnologias não convencionais de melhoramento são alternativas para contornar este problema.

### **Melhoramento genético da bananeira**

O melhoramento da bananeira por meio de cruzamentos é dificultado pela esterilidade constatada em alguns diploides e triploides e a falta de conhecimento do tipo de herança da resistência a estresses bióticos.

Os primeiros trabalhos de pesquisa na área de melhoramento genético da bananeira ocorreram em 1922 em Trinidad e em 1924 na Jamaica, quando a murcha do *Fusarium* dizimou as plantações de 'Gros Michel' na América

Central e Jamaica. O objetivo desses dois programas era produzir um híbrido de 'Gros Michel' resistente a esse patógeno. No início da década de 30, foi obtido o primeiro híbrido tetraploide resistente ao *Fusarium* e à Sigatoka, a partir do cruzamento da cultivar triploide Gros Michel e a espécie selvagem diploide *M. acuminata malaccensis* (SHEPHERD, 1992).

Desde então, iniciaram-se programas de melhoramento em vários países, objetivando a produção de plantas com resistência a pragas e doenças e melhoraria na qualidade de frutos. Atualmente, há cinco grandes programas empenhados na geração de novas tecnologias, aperfeiçoamento e síntese de novos genótipos.

O IITA (*International Institute of Tropical Agriculture*), na Nigéria, desde sua criação em 1980, tem desenvolvido híbridos de plátanos e banana como os da série TMPx (plátanos), TMBx (banana) e triploides secundários (TM3x). A FHIA (*Fundación Hondurena de Investigación Agrícola*), fundada em 1984, gerou uma série de híbridos poliploides tolerantes ou resistentes a Sigatoka negra e ao Mal-do-Panamá, a exemplo, as cultivares FHIA-01, FHIA-02 e FHIA 18 para consumo *in natura* e FHIA-21 e FHIA-22 para serem consumidas cozidas ou fritas. Além desses, existem os programas da Índia (*Tamil Nadu Agricultural University*) e do CIRAD (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*), que atua na França, Guadalupe, Camarões e Martinica (TEZENAS DU MONTCEL et al., 1994, BAKRY et al., 2009).

No Brasil, o programa de melhoramento genético da bananeira foi iniciado em 1982, na Embrapa Mandioca e Fruticultura, atuando principalmente no melhoramento de diploides (AA), e posterior cruzamento destes com triploides AAB, do tipo Prata e Maçã, gerando tetraploides AAAB. Essa estratégia é utilizada até os dias atuais, com relativo sucesso, para a geração de variedades produtivas, resistentes a doenças, pragas e nematoides, com redução do porte da planta e ciclo da cultura, e manutenção do sabor dos frutos semelhante ao das cultivares Prata e ou Maçã (SHEPHERD, 1987; SILVA et al., 2001; AMORIM et al., 2012; AMORIM et al., 2013; ). Os tetraploides produzidos, embora resistentes a doenças, apresentam alguns problemas como polpa flácida, despencamento, menor tempo de prateleira e firmeza do fruto reduzida (SILVA et al., 2002). Para minimizar estes problemas,

mais recentemente foi adotada a estratégia de realizar cruzamentos entre tetraploides do grupo genômico AAAB com diploides AA, gerando triploides AAA ou AAB (; SILVA et al., 2011; AMORIM et al., 2013).

O sucesso de um programa de melhoramento depende da compatibilidade entre os parentais e da produção de um bom número de sementes. De maneira geral, embora as sementes de bananeira sejam completas em termos de embrião, endosperma e tegumento, não germinam devido a várias razões (CHIN, 1996). Como o número de sementes obtidas mediante cruzamentos é geralmente baixo, e dificilmente germinam no substrato, o cultivo *in vitro* do embrião é vital. A cultura de embrião aumenta a taxa de germinação em até dez vezes e ainda, possibilita o resgate de uma quantidade maior de híbridos (VUYLSTEKE et al., 1990; SILVA et al., 1999; ASIF et al., 2001; BAKRY, 2008; UMA et al., 2011).

Além do resgate de embriões, outras técnicas de cultura de tecidos tem sido empregadas como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de cultivares, disponibilizando alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

A micropropagação ou propagação clonal *in vitro* a partir do cultivo de meristemas, inflorescências masculinas imaturas e outros explantes tem aplicações importantes nos diferentes programas de melhoramento de bananeira por permitir a multiplicação dos genótipos selecionados e facilitar o acesso às novas cultivares geradas (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

Uma vez que as cultivares de banana são propagadas vegetativamente e heterozigotas, e o sucesso em cruzamentos é limitado pelo elevado grau de esterilidade, a indução de mutação é uma abordagem ideal para o melhoramento genético da cultura. Diversos estudos têm sido realizados, utilizando agentes mutagênicos físicos ou químicos (BHAGWAT; DUNCAN, 1998; JAIN, 2010; PESTANA et al., 2010; SANTOS-SEREJO et al., 2004a), especialmente visando obtenção de plantas com porte baixo ou resistência a doenças.

Com o desenvolvimento de suspensões celulares embriogênicas (CÔTE et al., 1996) e alto rendimento de métodos de transformação utilizando *Agrobacterium* (PÉREZ HERNÁNDEZ et al., 1999), a transformação genética tornou-se uma ferramenta promissora para o melhoramento de bananeira,

visando principalmente conferir resistência a doenças sem alterar as qualidades essenciais da cultivar (ACERETO-ESCOFFIÉ et al., 2005; SUNIL KUMAR et al., 2005; VISHNEVETSKY et al., 2011; KOVÁCS et al., 2013 ).

A abordagem atual de transformação genética, que é capaz de transferir genes específicos de todas as fontes em espécies cultivadas, fornece uma ferramenta poderosa para enriquecer o pool genético de cultivares comerciais. No entanto, muitos caracteres de interesses são multigênicos ou ainda não muito bem definidos. Com a recente divulgação do sequenciamento do genoma de *Musa* (D'HONT et al., 2012), a identificação de genes de interesse ampliará a possibilidade de obtenção de bananeiras geneticamente modificadas com genes oriundos do próprio gênero.

Partindo deste ponto de vista, hibridação somática por fusão de protoplastos constitui uma estratégia alternativa promissora para o melhoramento da bananeira. Transferência de genes por meio de hibridação somática tem uma série de vantagens sobre engenharia genética: (1) nenhum pré-requisito para a identificação dos genes; (2) capacidade de introduzir caracteres quantitativos através da transferência de um grande número de genes; (3) transferência do genoma nuclear (YAN et al. 2004). Esta técnica permite a introdução de resistência/tolerância a pragas e de outras características de interesse encontradas em bananas diploides (AA), nas cultivares triploides, mediante processo assexuado (MATSUMOTO et al., 2002; MORAIS et al., 2004, WANG et al., 2009).

Outra tecnologia bastante promissora para o melhoramento da bananeira é a indução de poliploidia. A duplicação de cromossomos de cultivares diploides (AA) permite a obtenção de triploides secundários (AAA) com frutos de qualidade e resistentes à doenças mediante o cruzamento do tetraploide com diploides (BAKRY et al., 2007).

A poliploidização sexual explica a formação da maioria das espécies poliploides e fornece meios para o melhoramento genético. A produção natural de gametas  $2n$  em bananeiras diploides é rara (ORTIZ, 1997), sendo necessário gerar indivíduos tetraploides que sejam doadores de gametas  $2n$ .

## **Indução de poliploidia e suas aplicações no melhoramento de bananeira**

No melhoramento vegetal, a poliploidia é uma característica desejada pela sua associação com aumento do vigor, alterações na morfologia, aumento da esterilidade triploide, maior tolerância a estresses bióticos e restauração da fertilidade do híbrido.

A poliploidia tem consequências importantes para o tamanho da célula e do núcleo. Plantas poliploides têm tamanhos nuclear e celular maiores em comparação a plantas diploides (SUGIYAMA, 2005; JOVTCHEV et al., 2006). As possíveis consequências morfológicas da poliploidia incluem flores maiores e com textura mais densa, atraso e ou prolongamento do florescimento e aumento da relação de comprimento/largura e da espessura de folhas. Estas características são influenciadas pela heterozigosidade, interações de genes, efeitos de dose de genes e fenômenos epigenéticos (LEITCH; BENNETT, 1997; SUGIYAMA, 2005).

Em vista destes possíveis benefícios, a indução de poliploidização mediante o uso de agentes químicos tem sido uma técnica utilizada no melhoramento de muitas espécies de plantas, especialmente das ornamentais (YEMETS; BLUME, 2008; TIWARI; MISHRA, 2012).

O programa de melhoramento da Embrapa tem utilizado a estratégia de indução da duplicação de cromossomos para geração de autotetraploides, ou duplo-diploides, que podem ser utilizados como doadores de gametas  $2n$  para sintetizar novos híbridos triploides mediante cruzamentos com diploides partenocárpicos (MOREIRA; SANTOS-SEREJO, 2004; SANTOS-SEREJO et al., 2004b; COSTA et al., 2009a, 2009b).

A técnica de duplicação de cromossomos *in vitro* é baseada na exposição de explantes (ápices caulinares e ou suspensões de células embriogênicas) a substâncias antimitóticas, seguida de sucessivos subcultivos para regeneração das plantas, determinação de ploidia e seleção dos autopoliploides 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 antimetabólitos, 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) e Trifluralina (herbicida dinitroanilina) também têm sido utilizados como alternativa à colchicina para poliploidização (KHOSRAVI et al., 2008).

Apesar de seu amplo uso, a colchicina possui alta toxicidade ao ser humano, elevada fitotoxicidade *in vitro* e, quando utilizada em altas concentrações, pode aumentar a frequência de mixoploidia nas plantas regeneradas (VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIAN, 2002; YEMETS; BLUME, 2008).

Os agentes antimitóticos agem em células de tecidos meristemáticos em divisão, inibindo durante a metáfase a formação do fuso acromático. Desse modo, os cromossomos após terem sido duplicados, não se movimentam para os polos das células, por que não há segregação na anáfase, devido à ausência de fuso mitótico, e nem ocorre a citocinese (divisão citoplasmática). Com a formação da membrana nuclear, a célula fica com o dobro do número de cromossomos que possuía no início do ciclo. Como resultado, a partir de diploides, tem-se a produção de células com quatro pares de cromossomos idênticos e homólogos em todos os loci, e após sua proliferação, podem formar tecido tetraploide que pode ser identificado citologicamente (ALLARD, 1971). Em seguida, quando essa célula com cromossomos duplicados passar por um novo ciclo de replicação do DNA na ausência de antimitótico, as cromátides irmãs terão possivelmente segregação polar normal, e após a divisão celular e citoplasmática, duas células filhas idênticas tetraploides serão produzidas e, assim sucessivamente.

Na poliploidização nem todas as células são igualmente afetadas pelo antimitótico. Além das plantas tetraploides, geralmente há uma quantidade expressiva de plantas que permanecem diploides ou de plantas que apresentam partes com diferentes níveis de ploidia, são as chamadas “quimeras”. Plantas quimeras de banana foram obtidas por vários autores (HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIAN, 2002; BAKRY et al., 2007; KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012;).

A determinação do nível de ploidia em plantas submetidas à duplicação cromossômica pode ser realizada através de contagem de cromossomos e ou

pela citometria de fluxo (VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007; KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012;). A contagem de cromossomos é trabalhosa e dificultada pelo tamanho reduzido dos cromossomos de *Musa*, exige muita experiência do pesquisador, e ocupa bastante tempo principalmente, quando há muitas plantas para serem analisadas (ORTIZ, 2000; SARI et al., 1999). Os cromossomos metafásicos de *M. acuminata* e *M. balbisiana* variam de tamanho de 1,4 a 3,6  $\mu\text{m}$  em comprimento, sendo 10 metacêntricos, seis submetacêntricos, quatro acrocêntricos e dois telocêntricos. Os dois cromossomos submetacêntricos maiores possuem constrições secundárias (OSUJI, 2006; ORTIZ, 2011).

O método mais simples de identificar poliploides é aquele que se baseia na morfologia das plantas, principalmente porque essas apresentam células e órgãos maiores, ou seja, “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, frutos maiores, maior pigmentação nas folhas, pseudocaule mais espesso, plantas robustas e mais compactas e crescimento lento (BAKRY, 2009; KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012).

Embora a obtenção de bananeira autotetraploide tenha sido relatada por diferentes grupos de pesquisa (HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; SANTOS-SEREJO et al., 2004b; BAKRY et al., 2007; COSTA et al., 2011; KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012;), não existem relatos específicos sobre a fertilidade desses genótipos. No entanto, por meio de estudos do comportamento meiótico, podem-se detectar irregularidades que levam à infertilidade parcial ou completa de um indivíduo, comprometendo etapas posteriores importantes do programa de melhoramento.

Irregularidades meióticas são responsáveis pela menor porcentagem de grãos de pólen viáveis (DAVIDE, 1998). Adeleke et al. (2004), estudando fertilidade em genótipos diploides e triploides de bananeira verificaram que a baixa fertilidade de pólen em *Musa* era uma consequência da presença de cromossomos retardatários e formação de univalentes durante a meiose.

Considerando que a viabilidade de pólen está relacionada com anormalidades meióticas, esta informação pode ser útil na seleção de materiais

genéticos e permitir a seleção dos melhores cruzamentos, tornando-se, portanto, uma ferramenta útil na condução de experimentos nas áreas agrícola e biotecnológica (TECHIO, 2002). Estudos sobre viabilidade de grãos de pólen são imprescindíveis para os trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético, porque permitem maior direcionamento e segurança nos cruzamentos a serem realizados (KRISHNAKUMAR et al., 1992).

A viabilidade do grão de pólen, que mede a fertilidade masculina, pode ser determinada por meio de diferentes técnicas, que podem ser agrupadas em métodos diretos, como a indução da germinação *in vitro* (DUTRA et al., 2000; GOMES et al., 2003; PIO et al., 2007; SOARES et al., 2008), *in vivo*, pela observação do crescimento do tubo polínico sobre o estigma e o pistilo, e formação de sementes posterior a polinização (OLIVEIRA et al., 2001; FERREIRA et al., 2006) ou métodos indiretos baseados em parâmetros citológicos, como a coloração (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; KEARNS; INOUE, 1993).

Pesquisas sobre viabilidade de pólen e estudos citológicos de *Musa* são realizadas em várias Instituições (WILSON, 1946a, 1946b; ADELEKE et al., 2002; ADELEKE et al., 2004; SOARES et al., 2008; REIS et al., 2011; SILAYOI et al., 2010), porém, nenhum trabalho se refere a plantas autotetraploides.

O comportamento meiótico em bananeira tem sido pouco estudado, apesar do grande número e da importância dos genótipos de diferentes ploidias. Dessa forma, é imprescindível a análise citogenética, por meio do estudo de meiose, para verificar se as plantas que tiveram os cromossomos duplicados apresentam ou não fertilidade e se é possível o seu uso em programas de melhoramento.

Apesar dos vários problemas que devem ser contornados, a duplicação cromossômica de diploides promissores permite a produção de plantas autotetraploides possivelmente férteis, que poderão ser utilizadas em cruzamentos com diploides melhorados para geração de triploides secundários AAA com resistência a doenças e frutos com boas características agronômicas (STOVER; BUDDENHAGEN, 1986; SILVA et al., 2001; BAKRY et al., 2007). Essa tecnologia já vem sendo empregada na Embrapa Mandioca e Fruticultura, para produção de autotetraploides a partir de diferentes diploides AA

partenocárpicos (MOREIRA; SANTOS-SEREJO, 2004; COSTA et al., 2009a, 2009b, 2011).

O presente estudo teve por objetivos caracterizar morfoagronomicamente plantas de bananeira ‘Ouro’ e ‘Lidi’ oriundas de tratamentos para indução da duplicação dos cromossomos e investigar o comportamento meiótico e a viabilidade do pólen de bananeiras autotetraploides de ‘Lidi’.

Espera-se com esses resultados fornecer informações sobre a fertilidade de bananeiras autotetraploides, e identificar genótipos promissores que poderão ser utilizados para geração de triploides secundários, auxiliando assim o programa de melhoramento genético da cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERETO-ESCOFFIÉ, P. O. M.; CHI-MANZARENO, B. H.; ECHEVERRÍA - ECHEVERRÍA, S.; GRIJALVA, R.; JAMES KAY, A.; GONZÁLEZ-ESTRADA, T.; CASTAÑO, E.; RODRÍGUEZ-ZAPATA, L. C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. “Grand Nain” scalps by vacuum infiltration. **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 359–371, 2005.

ADELEKE, M. T. V.; PILLAY, M.; OKOLI, B. E. An Improved Method for Examining Meiotic Chromosomes In *Musa* L. **HortScience**, v. 37, p. 959-961, 2002.

ADELEKE, M. T. V.; PILLAY, M.; OKOLI, B. E. Relationships between Meiotic Irregularities and Fertility in Diploid and Triploid *Musa* L. **Cytologia**, v. 69, p. 387-393, 2004.

ALLARD, R. W. Poliploidia induzida no melhoramento de plantas. In: ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento de plantas**. J. Wiley, 1971. p.302- 340.

AMORIM, E. P., SANTOS-SEREJO, J. A., AMORIM, V., FERREIRA, C. F., SILVA, S.O. Banana breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**, v. 986, p. 171-176, 2013.

AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SILVA, S. O.; DONATO, S. L. R.; RODRIGUES, M. G. V. BRS Platina: variedade de bananeira do tipo prata resistente ao Mal-do-Panamá. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: SBF, 2012. 1 CD-ROM.

ASIF, M. J.; MACK, C.; OTHMAN, R, Y. In vitro zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 267-270, 2001.

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 colchicine treatment induce non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, v. 62, p. 3-12, 2007.

BAKRY, F. Zygotic embryo rescue in bananas. **Fruits**, v.63, p.111–115, 2008.

BHAGWAT, B.; DUNCAN, E.J. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* using chemical mutagens. **Scientia Horticulturae**, v.73, p.11–22, 1998.

CARREEL, F.; FAURE, S.; GONZALES DE LEON, D.; LAGODA, P. J. L.; PERRIER, X.; BAKRY, F.; TEZENAS DU MONTEL, H.; LANAUD, C.; HORRY, J. P, Evaluation de la diversite genetique chez les bananiers diploides (*Musa* spp.). **Genetics Selection Evolution**, v, 26, p. 125-136, 1994.

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

CHIN, H. F. Germination and storage of banana seeds. In: Frison, E.A.; Horry, J.P.; De Waele, D. (eds). **Proceedings of the Workshop on New Frontiers in Resistance Breeding for Nematodes, Fusarium and Sigatoka**. p.218–227. 1996.

COSTA, F. H. S ; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O.; AMORIM, E. P.; SILVA NETO, H. P.; TOSTA, R. L. ; SANTOS-SEREJO, J. A. Regeneração in vitro de diploides de bananeira tratados com colchicina. In: 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2009, Guarapari (ES). **Anais...** Lavras (MG): Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas (SBMP), 2009a.

COSTA, F. H. S ; SILVA, S. de O.; SILVA NETO, H. P.; PASQUAL, M.; AMORIM, E. P.; TOSTA, R. L.; SANTOS-SEREJO, J. A. Uso de orizalina na indução de autotetraploides de bananeira e seus efeitos in vitro. In: 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2009, Guarapari (ES). **Anais...** Lavras (MG): SBMP, 2009b.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O.; NETO. H. P. S.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 805-813, 2011.

CÔTE, F. X.; DOMERGUE, R.; MONMARSON, S.; SCHWENDIMAN. J.; TEISSON, C.; ESCALANT, J. V. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. **Physiology Plantarum**, v.97, p.285–290, 1996.

DAVIDE, L. C. Citogenética aplicada ao melhoramento de plantas na UFLA. In: CONGRESSO MINEIRO DE GENETICISTAS, 5., 1998, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Genética Regional de Minas Gerais, 1998. v. 1,p. 9.

D'HONT, A; DENOEUDE, F.; AURY, J-M.; et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v.488, p.213-219, 2012.

DODDS, K. S. Genetic and cytological of *Musa*. V. Certain edible diploids. **Journal of Genetics**, v. 45, p. 113-138, 1943.

DODDS, K.S.; SIMMONDS, N. W. Sterility and parthenocarpy in diploid hybrids of *Musa*. **Heredity**, v.2, p.101-117, 1948.

DUTRA, G. A. P.; SOUSA, M. M; RODRIGUES, R.; SUDE, C.P.; PEREIRA, T. N. S. Viabilidade em grãos de pólen fresco e armazenado em acessos de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.729-730, 2000. Suplemento.

FAURE, S.; BAKRY, F.; GONZÁLEZ DE LEÓN, D. Cytogenetic Studies of Diploid Bananas. In: Ganry, J. (ed.). **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**. Montpellier, France: CIRAD/INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain, p.77-92, 1993.

FERREIRA, C. A.; VON PINHO, E. V. R.; ALVIM, P. O.; SILVA, T. T. A. Conservação e determinação da viabilidade do grão de pólen de milho. In: XXVI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO – INOVAÇÃO PARA SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO, 26, 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: ABMS/EMBRAPA-CNPMS, 2006.

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** FAOSTAT. 2011. Última atualização em 16 jan. 2013. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> > Acessado em: 18 Jan. 2013.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D. W. The anatomy of ovule ontogeny of banana, plantain and enset (Musaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 479-492, 2005.

GANGA, M.; CHEZHIYAN, 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.

GOMES, P. R.; RASEIRA, M. C. B; BAUDET, L. L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n.1, p.14-17, 2003.

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

JAIN, S.M. In vitro mutagenesis in banana (*Musa* spp.) improvement. **Acta Horticulturae**, v. 879, p. 605-614, 2010.

JOVTCHEV, G., SCHUBERT, V., MEISTER, A., BAROW, M. AND SCHUBERT, I. Nuclear DNA content and nuclear and cell volume are positively correlated in angiosperms. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 114, p.77-82. 2006.

KANCHANAPOOM, K.; KOARAPATCHAIKUL, K. In vitro induction of tetraploid plants from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) 'Kluai Leb Mu Nang' and 'Kluai Sa'. **Euphytica**, v.183, p.111-117, 2012.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado, 1993. 579p.

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.

KOVÁCS, G.; SÁGI, L.; JACON, G.; ARINAITWE, G.; BUSOGORO, J-P.; THIRY, E.; STROSSE, H.; SWENNEN, R.; REMY, S. Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. **Transgenic Research**, v.22, p. 117–130, 2013.

KRISHNAKUMAR, M. P.; VALSALAKUMARI, P. K.; ARAVINDAKSHAN, M. Pollen production, fertility and viability in different nodes of the banana cultivars. **Agricultural Research**, v. 30, p. 53-57, 1992.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, v.2, p.470-476, 1997.

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**, v. 20, n. 4, p. 480-484, 1996.

MATSUMOTO, K.; VILARINHOS, A. D.; OKA, S. Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts. **Euphytica**, v. 125, n. 3, p. 317-324, 2002.

MORAIS, L. S.; SILVA, S. de O.; SANTOS-SEREJO, J. A. Induction of callus in banana *Musa* spp and establishment of embryogenic cell suspension. In: XVI Reunión Internacional ACORBAT, Oaxaca, México. **Anais... ACORBAT**, 2004. p.186-186.

MOREIRA, C. V.; SANTOS-SEREJO, J. A. Duplicação dos cromossomos em cultivares diploides de bananeira In: VII Seminário PIBIC/CNPq e I Seminário Fapesb, 2004, Cruz das Almas. **Anais...**, p.17, 2004.

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasilica**, v.15, n.1, p.63-67, 2001.

ORTIZ, R. Occurrence and inheritance of 2n pollen in *Musa*. **Annals of Botany**, v.79, p.449-453, 1997.

ORTIZ, R. Understanding the *Musa* genome: an update. **Acta Horticulture**, v. 540, p.157-168, 2000.

ORTIZ, R. *Musa*. In: KOLE, C. (Ed.). **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Tropical and subtropical fruits**. Springer Verlag, p.97-128. 2011.

OSUJI, J. O.; OKOLI, B. E.; EDEOGA, H. O. Karyotypes of the A and B genomes of *Musa* L. **Cytologia**, v.71, p.21-23, 2006.

PÉREZ HERNÁNDEZ, J. B.; REMY, S.; GALÁN SAÚCO, V.; SWENNEN, R.; SÁGI, L. Chemotactic movement and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to banana cells and tissues. **Journal of Plant Physiology**, v.155, p.245–250, 1999.

PERRIER, X.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HORRY, J. P.; LEBOTE, V.; HIPPOLYTE, I. Combining biological approaches to shed light on evolution

of edible bananas. **Ethnobotany Research and Application**, v. 7, n. 1, p. 199-216, 2009.

PESTANA, R. K. N.; AMORIM, E. P.; SILVA, S. O.; NETO, A. T. Irradiação gama para mutagênese *in vitro* em bananeira 'Terra Maranhão'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 10, p.1328-1330, 2010.

PIO, L. A. S.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. S.; RUFINI, J. C. M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.1, p.147-153, 2007.

REIS, V.; MORAIS, L.S.; SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; LEDO, C.A.S.; VIANA, A.P. Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de bananeira sob diferentes concentrações de ácido bórico e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 547 - 553, 2011.

SANTOS-SEREJO, J.A.; SOUZA, A.S.; MORAIS, L.S.; SOARES, T.L.S.; DUARTE, F.V.; KOBAYASHI, A.K.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S. O. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: XVII Reunião Internacional ACORBAT, 2006, Joinville. **Anais da XVII Reunião Internacional ACORBAT - Bananicultura: um negócio sustentável**, v. 1. p. 10-23, 2006.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O. ; DIAS, D. L. *Musa* mutants induced by gamma radiation. In: XVI Reunión Internacional ACORBAT, 16, 2004a, Oaxaca, México. **Resumos...** ACORBAT, p.263, 2004a.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O. ; MOREIRA, C. V. ; TELES, S. Effect of colchicine *in vitro* banana regeneration. In: XVI Reunión Internacional ACORBAT, 2004b, Oaxaca, México. **Resumos...** ACORBAT, p. 262, 2004b.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; MORAIS-LINO, L. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, E. H. Micropropagação de bananeira. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**: Cruz das Almas, p. 237- 255, 2009.

SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Scientia Horticulturae**, 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. **Cytogenetics of the genus *Musa***. INIBAP: Montpellier, 1999. 154p.

SHEPHERD, K. History and methods of banana breeding In: **Report of the First External Program and Management Review of the International Network for the Improvement of Banana and Plantain**, Washington, CGIAR SECRETARIAT, The World Bank, 1992, p.108-110.

SHEPHERD, K. **Evolução e classificação das bananeiras**. Cruz das Almas, BA: Embrapa-CNPMPF, 1984, 4p.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Banana breeding in Brazil. In: PERSLEY, G. J.; DE LANGHE, E. A. (ed.). **Banana and plantain breeding strategies**. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research, p.78-83, 1987.

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

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology**. A laboratory manual. 1992, 119p.

SILAYOI, B.; THONNALAK, T.; PONGTONGKAM, P.; PAISOOKSANTIVATANA, Y. Meiotic behavior in microsporocytes os some banana in Thailand. **Kasetsart Journal (Nature Science)**, v. 44, p. 536-543, 2010.

SILVA, S. de O; SILVA, K. M.; BORGES M. F.; OLIVEIRA, R. P. Pollination and culture of banana embryos. **Infomusa**, v.8, p.24–26, 1999.

SILVA, S. 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. O; SOUZA-JUNIOR, M. T.; ALVES, E. J.; SILVEIRA, J. R. S.; LIMA, M. B. Banana Breeding Program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 399–436. 2001.

SILVA, S. O.; SILVA, S. A.; MORAIS-LINO, L.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, C.F.; VIVAS, M. Melhoramento de plantas de produção vegetativa: Bananeira. In: Cardoso, D.L.; Luz, L.N.; Pereira, T.N.S. (Org.). **Estratégias em Melhoramento de Plantas**. 1ed. Viçosa: Arka Editora, v. 1, p. 23-38, 2011.

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

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

SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SEREJO, J. A. S.; SOUZA, A. S.; MORAIS-LINO, L. S.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 111-118, 2008.

SOARES, T. L. **Eficiência do sistema reprodutivo de bananeira**. 2011. 81p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2011.

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

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

SUGIYAMA, S-I. Polyploidy and cellular mechanisms changing leaf size: comparison of diploid and autotetraploid populations in two species of *Lolium*. **Annals of Botany**, v.96, p.931-938. 2005.

SUNIL KUMAR, G. B.; GANAPATHI, T. R.; REVATHI, C. J.; SRIVIVAS, L.; BAPAT, V. A. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. **Planta**, v. 222, p.484-493, 2005.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum spp.*** 2002. 104p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TEZENAS DU MONTCEL, H.; BAKRY, F.; HORRY, J. P. Breeding for the improvement of banana and plantain. **Proceedings of the first meeting of the *Musa* breeders Network**, p. 27-30, 1994.

TIWARI, A. K.; MISHRA, S. K. Effect of colchicine on mitotic polyploidization and morphological characteristics of *Phlox drummondii*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 9336-9342, 2012

THONNALAK, T.; SILAYOI, B.; PAISOOKSANTIVATANA, Y.; PONGTONGKAM, P. Meiotic behavior in microsporocytes of some bananas in Thailand. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, v.44, p.536 – 543, 2010.

UMA, S.; LAKSHMI, S.; SARASWATHI, M. S.; AKBAR. A.; MUSTAFFA, M. M. Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa spp.*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.105, p.105–111, 2011.

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.

VISHNEVETSKY, J.; WHITE, T.L.JR.; PALMATEER, A.J.; FLAISHMAN, M.; COHEN, Y.; ELAD, Y.; VELCHEVA, M.; HANANIA, U.; SAHAR, N.; DGANI, O.; PERL, A. Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa spp.* AAA group) cv. Grand Nain. **Transgenic Research**, v.20, p.61–72, 2011.

VUYLSTEKE, D.; SWENNER, R.; DE LANGE, E. Tissue culture technology for the improvement of African plantains. In: FULLERTON, R. A.; SOTVER, R. H. (ed). **Sigatoka leaf spot diseases of bananas**. INIBAP, p. 316-337, 1990.

WANG, X.; XIA, H.; YUERONG, W. Progress in protoplast culture and somatic hybridization in banana (*Musa* spp.). **Journal of Fruit Science**, v. 26, p. 369-374, 2009.

WILSON, G. B. Cytological studies in the *Musae*. I. Meiosis in some triploid clones. **Genetics**, v. 31, p. 241-258, 1946a.

WILSON, G. B. Cytological studies in the *Musae*. II. Meiosis in some diploids clones. **Genetics**, v. 31, p. 475-482, 1946b.

YAN, C. Q.; QIAN, K. X.; YAN, Q. S.; ZHANG, X. Q.; XUE, G. P.; HUANG, W. G.; WU, Y. F.; ZHAO, Y. Z.; XUE, Z.Y.; HUANG, J.; XU, G. Z.; WU, P. Use of asymmetric somatic hybridization for transfer of the bacterial blight resistance trait from *Oryza meyeriana* L. to *O. sativa* L. ssp. japonica. **Plant Cell Report**, v.22, p.569–575, 2004.

YEMETS, A. I.; BLUME, Y. B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. **The Open Horticulture Journal**, v.1, p.15-20 15, 2008.

# **CAPÍTULO 1**

## **CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE BANANEIRAS AUTOTETRAPLOIDES OBTIDAS MEDIANTE DUPLICAÇÃO DE CROMOSSOMOS**

## **CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE BANANEIRAS AUTOTETRAPLOIDES OBTIDAS MEDIANTE DUPLICAÇÃO DE CROMOSSOMOS**

Autora: Cícera Maria do Amaral

Orientador: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Coorientador: Sebastião de Oliveira e Silva

**RESUMO:** O objetivo do trabalho foi caracterizar morfoagronomicamente plantas oriundas de experimentos de indução de duplicação de cromossomos de dois acessos do banco de germoplasma de banana, 'Ouro' e 'Lidi', que são partenocárpicas e têm frutos de sabor agradável, a fim de selecionar genótipos que serão utilizados em cruzamentos com diploides melhorados para a geração de triploides secundários. Trinta e seis plantas foram avaliadas para altura da planta, diâmetro do pseudocaule, número de folhas vivas, número de filhos, comprimento e diâmetro do engaço, número de pencas e de frutos; peso do cacho e de penca; comprimento e diâmetro de frutos; comprimento e diâmetro do pedicelo, presença/ausência de sementes e grau de severidade da Sigatoka amarela. Em comparação com os diploides originais os autotetraploides da Lidi apresentaram incremento significativo na altura de planta, no número de folhas vivas na floração e colheita, no diâmetro do pseudocaule, no comprimento, no diâmetro e no número de frutos, bem como maior peso do fruto e do cacho em comparação ao diploide original. Além disso, estes autotetraploides apresentaram maior resistência à Sigatoka-amarela. Por outro lado, as plantas tetraploidizadas da cv. Ouro só diferiram das diploides na altura da planta e no segundo ciclo. Nas demais características todas as plantas foram semelhantes independente da ploidia. Portanto, entre os autotetraploides caracterizados neste estudo apenas os da Lidi apresentam caracteres morfoagronômicos úteis para serem utilizados na geração de triploides secundários.

Palavras chave: *Musa spp.*, melhoramento genético, colchicina.

## **MORPHOAGRONOMIC CHARACTERIZATION OF AUTOTETRAPLOID BANANA GENERATED BY CHROMOSOME DOUBLING**

Author: Cícera Maria do Amaral

Advisor: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

**ABSTRACT:** The objective of the present work was to morphoagronomically characterize plants from experiments of chromosome doubling of two accessions of the germplasm bank, Ouro and Lidi; fruits with pleasant taste and parthenocarpy, in order to develop tetraploids to be used in crosses with improved diploids to develop secondary triploids. Thirty six plants were evaluated for plant height, pseudostem diameter, number of live leaves, number of suckers, length and diameter of stem, number of hands and fruits; bunch and hand weight; fruit length and diameter; length and diameter of pedicel and degree of yellow Sigatoka severity. The autotetraploids of Lidi presented significant increment for plant height, number of live leaves at flowering and harvest, pseudostem diameter, length, diameter and number of fruits as well as higher weight of fruit and bunch in comparison to the original diploid. For the other hand, the autotetraploids from the Ouro cultivar only differed from the non-treated diploids as to plant height and in the second cycle. For the remaining characteristics, all plants were similar regardless of the ploidy level. In this work, especially as to increase in yellow Sigatoka resistance in Lidi autotetraploids. Therefore, among the autotetraploids evaluated only the Lidi autotetraploids presented useful morphoagronomic characteristics to be used in the development of secondary triploids.

**Key words:** *Musa spp.*, genetic breeding, colchicine.

## INTRODUÇÃO

A bananeira é uma importante cultura alimentar para milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e desempenha um relevante papel econômico e social. A produção mundial da banana é calculada em 106 milhões de toneladas por ano (FAO, 2013).

Entre os problemas que impedem a obtenção de altos rendimentos na cadeia produtiva da banana estão as Sigatocas amarela e negra, e o mal-do-Panamá, doenças que causam perdas significativas na produção (SILVA et al., 2002a). Uma das estratégias para a solução do problema mencionado é a criação de novas variedades por meio do melhoramento genético. Esta tarefa, no entanto, é dificultada pela esterilidade constatada em alguns diploides e triploides e a falta de conhecimento do tipo de herança das resistências.

A maioria das bananeiras cultivadas é triploide e, portanto, quase completamente estéril. Propaga-se assexuadamente, desenvolvendo frutos por partenocarpia, tendo sido selecionada durante o longo processo de domesticação (SIMMONDS, 1995). Esses triploides possuem base genética estreita e a diversidade depende do surgimento das poucas mutações somáticas que são selecionadas originando novas cultivares (DANIELL et al., 2001).

As cultivares tipo exportação são triploides AAA estéreis, principalmente do Subgrupo Cavendish (SHEPHERD, 1987), o que dificulta a geração de cultivares resistentes a doenças. Assim, a duplicação *in vitro* do número de cromossomos constitui uma importante ferramenta para complementar as atividades convencionais de melhoramento genético da bananeira de cultivares estéreis.

As atuais variedades triploides resultam de cruzamentos entre duas variedades diploides em que um dos pais contribui com um gameta diploide (RABOIN et al., 2005). A duplicação cromossômica de diploides promissores permite a produção de plantas autotetraploides possivelmente férteis, que poderão ser utilizadas em cruzamentos com diploides melhorados para geração de triploides secundários AAA com resistência a doenças e frutos com boas características agrônômicas (SILVA et al., 2001; BAKRY et al., 2007).

A poliploidia é uma importante ferramenta para o melhoramento genético. Sendo assim, não é surpresa que os estudiosos descobrissem

formas de induzir poliploidia em uma grande variedade de plantas (DERMEN, 1940; KRITHE; WELLENSIEKE, 1952; SWENNE et al., 1981; SANFORD, 1983), incluindo as bananeiras (VAKILI, 1967; STOVER; BUDDENHAGEN, 1986; HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007; COSTA et al., 2011; KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012), numa tentativa para produzir genótipos mais desejáveis.

Plantas poliploides têm sido utilizadas para produzir novas cultivares com características agronômicas favoráveis tais como, resistência a doenças, maior tamanho da fruta, robustez, e ausência de semente (PREDIERI, 2001). Aumento no tamanho das folhas e frutos de poliploides de bananeira foi observado em estudo onde se comparou as características de autotetraploides com as dos diploides originais (KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012).

Porém, nem todas as tentativas de duplicação tiveram sucesso. Plantas de banana tetraploides são geralmente inferiores aos clones triploides do mesmo grupo (STOVER; SIMMONDS, 1987; HAMILL et al., 1992;). Indução de autoploidia, embora desapontando no desempenho agronômico, pode exercer um papel importante na melhoria de cruzamentos e para facilitar o fluxo de genes (SINGH et al., 1990). Assim, a possibilidade de indução de autotetraploides na cultura da banana pode ter um impacto significativo sobre os programas de melhoramento visando a transferência valiosa de caracteres presentes em acessos diploides e que não é facilmente acessível devido à natureza do genoma de cultivares de bananas cultivadas (VAN DUREN et al., 1996).

Assim sendo, as informações geradas na caracterização desses autotetraploides auxiliam na identificação de genótipos promissores que poderão ser utilizados em trabalhos de melhoramento através da identificação de plantas com características agronômicas desejáveis tais como: porte baixo, qualidade dos frutos, resistência a doenças.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar morfoagronomicamente plantas diploides e autotetraploides das cultivares Lidi e Ouro obtidas mediante a indução da duplicação de cromossomos *in vitro* com colchicina.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Foram utilizadas plantas das cultivares Lidi (=Pisang Lilin, *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*) e Ouro (*Musa acuminata*), ambas do grupo genômico AA, provenientes de tratamentos com colchicina, cujos cromossomos foram duplicados (autotetraploides) ou não (diploides tratados) e tiveram a ploidia confirmada por citometria de fluxo (PIO et al., 2013). Como controles foram utilizados acessos diploides dos referidos genótipos, mantidos no Banco de Germoplasma de Banana da Embrapa.

### **Caracterização morfoagronômica**

O experimento foi estabelecido no Campo Experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, onde o clima é tropical quente e úmido, conforme classificação proposta por Köppen. A precipitação média anual é de 1224 mm, a temperatura média anual é de 24,5°C, a altitude é de 200m, com latitude de 12°40'0" e longitude de 39°06'0" e o solo é um latossolo amarelo distrófico. O espaçamento utilizado foi de 2,0 m X 2,5 m. Três plantas diploides originais, 17 plantas autotetraploides e duas diploides que foram tratadas com colchicina e não tiveram os cromossomos duplicados da cultivar Lidi foram avaliadas em dois ciclos de produção, juntamente a quatro plantas autotetraploides e dez diploides tratadas mas que não tiveram os cromossomos duplicados da cv. Ouro. Os diploides originais da 'Ouro' não foram avaliados porque não emitiram floração até o final do experimento. Cada planta foi considerada como uma repetição.

As plantas foram caracterizadas de acordo com os seguintes descritores morfoagronômicos: altura da planta, diâmetro do pseudocaule, número de folhas vivas no florescimento e colheita, número de filhos, dias do florescimento até a colheita, comprimento e diâmetro do engaço, número de pencas, número de frutos, peso da penca, peso do cacho, peso médio do fruto, comprimento e diâmetro do fruto, comprimento e diâmetro do pedicelo, número de flores/bráctea, número de anteras por flor bem como tamanho das anteras e

filetes. Também foram realizadas avaliações para resistência à Sigatoka-amarela.

A severidade da Sigatoka-amarela foi avaliada aos seis meses na floração e na colheita, aplicando-se a escala descritiva, proposta por Stover (1972) e modificada por Gauhl, como segue:

0: Sem sintomas;

1: Menos de 1% da lâmina foliar com sintomas (presença de estrias e ou superior a 10 manchas);

2: De 1 a 5% da lâmina foliar com sintomas;

3: De 6 a 15% da lâmina foliar com sintomas;

4: De 16 a 33% da lâmina foliar com sintomas;

5: De 34 a 50% da lâmina foliar com sintomas;

6: De 51 a 100% da lâmina foliar com sintomas;

-: Indica ausência de folha, folha morta ou caída junto ao pseudocaule.

### **Análise estatística**

Foi adotado o esquema fatorial 3 x 2, três ploidias e dois ciclos para a variedade Lidi e 2 x 2, duas ploidias e dois ciclos para a variedade Ouro. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2010).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização morfoagronômica da cultivar Lidi**

As plantas com cromossomos duplicados da cv. Lidi apresentaram características morfológicas distintas em comparação com os diploides que lhes deram origem e com aqueles que foram tratados e não duplicaram (Figura 1). As folhas dos autotetraploides eram arqueadas, longas, largas, densas e com coloração verde mais intensa, possivelmente, como consequência do efeito da dosagem gênica dobrada.

Em outros estudos com indução de poliploidia com colchicina as plantas apresentavam folhas caídas (BAKRY et al., 2007), frágeis (VAKILI, 1967) e pecíolos fracos (HAMILL et al., 1992), que se quebravam com facilidade pela ação do vento provocando uma alta incidência de danos nas plantas (STOVER; SIMMONDS, 1987). Folhas longas, largas e densas foram também encontradas em plantas tetraploides oriundas de culturas de calo tratadas com orizalina (KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012).

A altura das plantas variou de 1,30 m a 3,08 m nos autotetraploides e de 1,57 m a 2,30 m nos diploides (Tabela 1). As plantas tetraploides obtiveram maior média de altura e diâmetro do pseudocaule (2,6 m e 15,8 cm), quando comparadas aos diploides (1,8 m e 10,5 cm), respectivamente, no segundo ciclo de produção, não havendo diferenças entre as plodias no primeiro ciclo (Tabela 2). Vale ressaltar que o primeiro ciclo da cultura não é apropriado para avaliar o porte de plantas, pois a estabilidade só é atingida geralmente nos ciclos posteriores (SOTO BALLESTERO, 1992).

A média da altura das plantas dos acessos diploides (1,90 m) (Tabela 1) foi menor que a maioria observada em outros trabalhos com outros acessos e híbridos da mesma ploidia (MATTOS et al., 2010; SILVA et al., 2013), e da mesma forma que seus diploides originais, os tetraploides ficaram com porte menor (média de 2,30 m, considerando os dois ciclos) comparado a dados de outros genótipos tetraploides avaliados (VAKILI, 1967; LIMA et al., 2005; DONATO et al., 2006; MATTOS et al., 2010).

A 'Lidi' é considerada uma cultivar de porte baixo, e mesmo com o incremento nessa característica após a duplicação, a maioria das plantas ficaram com média de altura considerado boa (2,30 m). A altura da planta é essencial para o melhoramento da cultura, pois influi na densidade do plantio, manejo e conseqüentemente, na produtividade (BELALCÁZAR CARVAJAL, 1991; SILVA et al., 2002b; LESSA et al., 2010), de forma semelhante, genótipos com um maior diâmetro do pseudocaule são preferíveis por ser menos suscetíveis ao tombamento (SILVA et al., 2003).



Figura 1. Aspecto da planta e do cacho de bananeira autotetraploide 'Lidi' resultante da duplicação de cromossomos (A, C), comparativamente, ao aspecto da planta e do cacho do seu diploide original (B e D).

Tabela 1. Amplitude, média e desvio padrão (DP) de características de crescimento e desenvolvimento de plantas diploides e autotetraploides de 'Lidi' provenientes de duplicação de cromossomos considerando dois ciclos de produção.

Var.	Ploidia											
	Diploide tratado			Autotetraploide			Diploide original					
	Amplitude	Média	DP	Amplitude	Média	DP	Amplitude	Média	DP			
APL	1,90	2,47	2,25	0,27	1,30	3,08	2,30	0,4	1,57	2,30	1,90	0,28
DPS	13,0	15,0	13,88	0,85	10,0	18,50	13,94	2,68	8,90	15,00	11,10	2,80
FVF	6,0	14,0	10,3	4,3	4,0	8,0	6,1	1,0	0,0	6,0	4,2	2,3
FVC	3,0	3,0	3,0	0,0	1,0	3,0	2,8	0,8	0,0	6,0	0,3	1,5
PFR	5,45	88,73	40,7	41,26	8,80	173,92	59,5	27,9	9,40	30,96	22,1	10,17
CFR	4,0	15,0	10,4	4,64	7,0	17,00	13,2	3,90	6,0	10,34	8,2	1,91
DFR	19,0	28,0	23,3	4,43	22,0	32,0	26,4	2,74	16,0	23,0	20,0	2,74
NPE	4,0	6,0	5,0	0,8	2,0	7,0	4,5	1,2	4,0	6,0	4,5	0,8
NFR	39,0	76,0	61,25	16,2	14,0	83,0	50,4	21,4	30,0	82,0	52,0	20,4
PCA	0,67	6,06	2,60	2,5	0,68	10,17	3,70	2,41	0,40	2,80	1,55	1,01
SGF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,1	0,3	0,0	3,0	1,5	1,04
SGC	0,0	1,0	0,25	0,50	0,0	2,0	0,15	0,4	0,0	2,0	1,2	1,0

APL: altura da planta (m); DPS: diâmetro do pseudocaulo (cm); FVF: número de folhas vivas na floração; FVC: número de folhas vivas na colheita; PFR: peso do fruto (g); CFR: comprimento do fruto (cm); DFR: diâmetro do fruto (mm); NPE: número de pencas; NFR: número de frutos; PCA: peso do cacho (kg); SGF: Sigatoka-amarela na floração; SGC: sigatoka-amarela na colheita; DP: desvio padrão; Var: variável

O diâmetro do pseudocaule está relacionado ao vigor, e reflete a capacidade de sustentação do cacho, sendo fundamental no melhoramento genético (SILVA et al., 2002b). Entretanto, foi notado que algumas plantas tetraploides apresentaram tombamento, diferentemente dos seus diploides correspondentes. Possivelmente em função de sistema radicular mais frágil, uma vez que esta é uma característica fenotípica de poliploides, constatada em outros trabalhos com tetraploides induzidos de banana (VAKILI, 1967) e outras espécies de plantas (KARCHI et al., 1981; VICHATO et al., 2007; SOUZA et al., 2013).

Tabela 2. Características de crescimento e desenvolvimento em plantas de bananeira de 'Lidi' oriundas de duplicação de cromossomo em função de dois ciclos de produção.

Ciclo	Diploide tratado	Autotetraploide	Diploide original
APL			
1	2,2 aA	2,0 bA	2,0 aA
2	2,3 aAB	2,6 aA	1,8 aB
DPS			
1	13,3 aA	12,1 bA	11,7 aA
2	14,5 aA	15,8 aA	10,5 aB
SGC			
1	0,5 aAB	0,2 aB	1,0 aA
2	0,0 aA	0,1 aB	1,2 aA
NPE			
1	5,5 aA	3,8 bA	5,0 aA
2	4,5 aA	5,2 aA	4,0 aA
NFR			
1	65,0 aA	41,0 bB	69,0 aA
2	57,5 aA	59,8 aA	35,0 bB
PCA			
1	3,4 aA	2,6 bA	2,4 aA
2	1,8 aAB	4,8 aA	0,7 aB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de significância. ALT: altura da planta (m); DPS: diâmetro do pseudocaule (cm); SGC: Sigatoka-amarela na colheita; NPE: número de pencas; NFR: número de frutos; PCA: peso do cacho (kg)

Os diploides da cultivar Lidi tratados apresentaram o maior número de folhas vivas na floração (Tabela 3). Por outro lado, os autotetraploides foram

melhores que os controles diploides para essa característica, com média de 6,1 folhas o que influenciará diretamente no desenvolvimento do cacho e evidencia o efeito da poliploidia, pois houve um aumento de 45% em relação aos diploides correspondentes.

Quanto ao número de perfilhos por planta, a média constatada foi de 2,5 para os controles diploides, diploides tratados e tetraploides, portanto, sem nenhum efeito da poliploidização na característica.

Deve-se considerar, entretanto, que nem todas as tentativas de duplicação de cromossomos são bem sucedidas agronomicamente, algumas variantes tetraploides são consideravelmente menos atraentes do que as originais. Muitos poliploides induzidos exibem uma compensação ao efeito gigas, como menor número de folhas e raízes (VAKILI, 1967, VICHATO et al., 2007), menor número de brotos e redução no vigor das plantas (TESFAYE, 2005; BAKRY et al., 2007), além de desenvolvimento mais lento e despencamento dos frutos, como detectado no presente estudo em poucas plantas.

Mas essas características indesejáveis presentes em um neopoliploide podem ser removidas por seleção em grandes populações (ELLIOTT, 1967). Mesmo em um número menor, plantas poliploidizadas artificialmente são consideradas cada uma como um organismo individual, diferentemente de clones. Assim, plantas mais promissoras poderão ser selecionadas se provarem ter características agrônômicas desejáveis. Porém, a importância será maior para o programa de melhoramento, se os melhores genótipos puderem ser cruzados com diploides melhorados para produzir progênie triploide com características de interesse.

Neste estudo, os efeitos da poliploida foram mais expressivos fenotipicamente nos seguintes caracteres: comprimento e diâmetro dos frutos, peso dos frutos e do cacho, número de frutos por penca e número de folhas (Tabelas 2 e 3). As flores, anteras e pistilos também aumentaram.

Esse maior aumento decorrente da duplicação ocorrido nos autotetraploides para número de folhas vivas na colheita, peso médio, comprimento e diâmetro do fruto foi considerando os dois ciclos (Tabela 3). O peso dos frutos variou de 8,8 g a 173,9 g. A amplitude do comprimento foi de 7 cm a 17 cm e quanto ao diâmetro, variou de 22 mm a 32 mm (Tabela 1). O

aumento do nível de ploidia aumentou consideravelmente o peso médio dos frutos, um incremento de 169,2% nos tetraploides em relação aos diploides controles.

Tabela 3. Características de crescimento e desenvolvimento em plantas de bananeira de 'Lidi' oriundas de duplicação de cromossomo considerando dois ciclos de produção.

Ploidia	SGF	FVF	FVC	PFR	CFR	DFR
Diploide tratado	0,0 b	10,3 a	3,0 a	40,7 ab	10,4 a	23,3 ab
Autotetraploide	0,1 b	6,1 b	2,8 a	59,5 a	13,2 a	26,4 a
Diploide original	1,5 a	4,2 c	0,3 b	22,1 b	8,2 a	20,0 b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. SGF: Sigatoka-amarela na floração; FVF: número de folhas vivas na floração; FVC: número de folhas vivas na colheita; PFR: peso do fruto (g); CFR: comprimento do fruto (cm); DFR: diâmetro do fruto (mm)

O peso do fruto é essencial para trabalhos de melhoramento, no entanto, essa característica deve estar associada ao comprimento, diâmetro e sabor (SILVA et al., 2002b), como verificado neste trabalho. E um maior número de folhas na colheita pode indicar resistência dos genótipos a doenças foliares, como as sigatokas negra e amarela (OLIVEIRA et al., 2007).

No presente estudo, de uma maneira geral, os autotetraploides apresentaram fruto maior do que os diploides que lhes deram origem. Resultados semelhantes foram observados por Kanchanapoom e Koarapatchaikul (2012). A poliploidia afeta a dosagem alélica. Quando o núcleo poliploide é formado, cada gene no genoma torna-se instantaneamente duplicado, levando para a nova dosagem efeitos que podem ser importantes para o fenótipo (GUO et al., 1996). Vale ressaltar que as dimensões dos frutos poderiam até ser maior, uma vez que podem ser influenciados por fatores ambientais e/ou pelo manejo cultural, que no caso deste estudo, passou por condições adversas de cultivo (período com falta de água).

O peso do cacho, bem como o número de frutos por cacho foram superiores nos autotetraploides quando comparados com seus originais diploides, no segundo ciclo (Tabela 2). No entanto, para número de frutos no primeiro ciclo, os tetraploides apresentaram menor valor em relação a diploides tratados e não tratados. O primeiro ciclo não deve ser considerado conclusivo

para analisar o desempenho dos genótipos quanto ao número de frutos (SILVA et al., 2002b).

No segundo ciclo, o incremento no número de frutos por cacho tanto quanto o peso do cacho nos tetraploides foi altamente significativo em relação aos originais diploides, um aumento de 70,8% e 585,7%, respectivamente. O efeito mais amplo e consistente de triploidia e tetraploidia em plantas é um aumento no tamanho individual das células (BUTORINA et al., 1983; KUSPIRA et al., 1986). Este aumento no tamanho celular deve levar a um aumento do tamanho das plantas, flores e frutos, conforme verificado aqui. O número de frutos é imprescindível na determinação do tamanho e peso do cacho, que tem implicações relevantes nos programas de melhoramento genético.

Poliploides em diferentes espécies de plantas têm demonstrado maiores níveis de atividade enzimática ou proteínas do que seus diploides correspondentes (NAKAI, 1977). É por meio das proteínas, portanto, que os genes controlam praticamente todas as características fenotípicas dos seres vivos, o que pode explicar esse aumento no fenótipo das plantas poliploidizadas.

Nas plantas tetraploides foi observada uma grande quantidade de pólen e flores maiores em relação aos controles diploides (Figura 2). Os aumentos constatados são, provavelmente, devido ao fato de que as células com um maior complemento de cromossomos ficam maiores para manter uma relação constante de volume nuclear para volume citoplasmático, e assim, com a presença de mais genes, expressam mais proteínas. Consequentemente, há um aumento no tamanho celular que deve levar a um aumento do tamanho das flores e plantas.

Nos duplicados, o comprimento médio das anteras foi de 2,8 cm e do filete 2,3 cm, enquanto nos diploides correspondentes, os valores foram de 2,0 cm para antera e 1,9 cm para o filete. As tetraploides obtiveram uma média de 15,5 flores por bráctea, variando de 10 a 22. O número de anteras por flor também foi diversificado, com amplitude de 3 (7,5%) a 6 anteras (10,0%) de uma amostragem de 470 flores avaliadas.



Figura 2. Flores masculinas de bananeira diploide (menor) e tetraploide (maior) da 'Lidi'.

No entanto, a maioria das flores dos autotetraploides (70%) apresentou cinco anteras, como na maior parte dos diploides correspondentes, que apresentaram 89% das flores com cinco anteras por flor e média de 12,6 flores/bráctea. Porém, mesmo nos controles diploides, houve variação para número de flores por bráctea, com amplitude de 10 a 16. Possivelmente, essa variabilidade constatada nas flores tetraploides em comparação aos diploides, esteja relacionada à expressão gênica decorrente da indução da duplicação de cromossomos. Esse aumento nas flores tetraploides provavelmente repercutiu na maior produção de pólen.

A poliploidia causa em muitas plantas a expressão dos seus genes de forma diferente e, em alguns casos, estas diferenças são altamente benéficas, resultando numa série de propriedades interessantes e valiosas. A principal delas observada neste trabalho foi a resistência de praticamente todas as plantas autotetraploides à Sigatoka-amarela (Tabela 2).

Apesar de classificados como resistentes à Sigatoka-amarela, os acessos diploides exibem algum sintoma da doença no final do ciclo, próximo a colheita. Ao contrário destes, os tetraploides se mostraram altamente resistentes, pois apenas três plantas tiveram um leve sintoma, em intensidade bem baixa. Esse é um efeito positivo da dosagem gênica favorável aos diploides duplicados.

Mas esse resultado surpreendente vem acompanhado de outro, que é a detecção da restauração da fertilidade feminina nesses materiais, uma vez que

algumas plantas tetraploides produziram sementes, cujo número variou de duas a três por planta. Nos acessos diploides aqui pesquisados (2x) as plantas foram geralmente estéreis, mas em plantas que foram duplicadas (autotetraploides) (4x), as plantas tornaram-se férteis, com produção de sementes viáveis. Observou-se também a presença de semente nos diploides tratados, variando de 1 a 865 por planta. Considerando que tais genótipos continuaram diploides, é possível que tenha havido alguma mutação, já que os diploides originais são estéreis.

Todavia, em discordância ao que aqui está sendo relatado, dados da literatura revelam que um dos principais obstáculos à utilização de autoploiploides induzidos é a diminuição na fertilidade, atribuída principalmente, mas não exclusivamente, ao comportamento meiótico dos poliploides recém obtidos (WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003)

Estudos sobre a gametogênese feminina da 'Lidi' diploide revelaram que esse caso particular de esterilidade feminina completa, não era de origem genética direta, mas uma consequência de condições particulares, talvez de natureza hormonal, como deficiência do crescimento do tubo polínico nos estigmas e estiletos, ou mesmo um defeito na fusão do núcleo (DODDS, 1943; SHEPHERD et al., 1987).

As primeiras sementes nos tetraploides surgiram de polinização livre, e após ser constatado a presença de sementes, seguiu-se a polinização controlada com diploides melhorados, iniciando assim a produção de híbridos triploides secundários. Foram também realizados cruzamentos recíprocos com sucesso, uma vez que os resultados citogenéticos e de fertilidade confirmaram que os genótipos autotetraploides podem ser utilizados como doador de pólen no programa de melhoramento genético da bananeira. Esse é um resultado promissor, pois os tetraploides induzidos mostraram fertilidade nos dois sexos.

Trabalhos realizados para a seleção de 20 híbridos tetraploides teve como base, principalmente, o alto nível de resistência a Sigatoka-negra do diploide selvagem 'Calcuta 4' e da cv. diploide 'Pisang Lilin' ou 'Lidi', e concluíram que a característica foi prontamente herdada e assim, as proles comportaram-se como resistentes à doença (VUYLSTEKE et al., 1993). Os autores observaram ainda que tais plantas tetraploides tinham estatura baixa e frutos mais cheios quando comparados aos dos diploides originais.

Usando diploides superiores estabelecidos em programas de melhoramento há uma grande chance de produzir autotetraploides com genes necessários para conferir resistência e/ou melhor rendimento. Autotetraploides induzidos por colchicina a partir do clone diploide de banana SH3362 tinham pecíolos fracos, produziram poucos brotos e pareciam estar mais suscetíveis ao frio do que nos clones diploides originais. Mas esses autotetraploides mantiveram seu nível de resistência a raça 4 da murcha do *Fusarium* (HAMILL et al., 1992).

Os tetraploides estabelecidos em campo analisados neste trabalho não mostraram reversão para o nível diploide até o momento estudado (dois ciclos). As plantas mixoploides não foram avaliadas porque não desenvolveram bem e nem produziram flores.

Em geral, foi observado que os autotetraploides, comparado com os diploides originais, se mostraram mais vigorosos como um todo. Esses resultados diferem de outros observados por alguns autores, que relataram ser os tetraploides menos vigorosos que os diploides que lhes deram origem (KERNS e COLLINS, 1947; TESFAYE, 2005; BAKRI et al., 2007).

O aumento no tamanho celular deve ter sido favoravelmente afetado pela tetraploidia. Porque este processo comprometeu positivamente os diploides tratados, que não diferiram dos tetraploides em muitas das características analisadas (altura da planta, diâmetro do pseudocaule, número de folhas vivas, número de frutos e tamanhos destes, peso do cacho etc) é uma questão que pode ser explicada, possivelmente, pela ocorrência de mutação nestes materiais.

### **Caracterização morfoagronômica da cultivar Ouro**

De forma semelhante ao observado na 'Lidi', as plantas dos diploides duplicados da cv. Ouro também exibiram folhas arqueadas e grossas. Entre todas as características avaliadas, a única diferença significativa dos tetraploides em relação aos diploides tratados foi quanto a altura da planta, no segundo ciclo (Tabela 4). A característica variou 2,51 m a 3,10 m, portanto, considerada uma planta de porte médio a alto (SILVA et al., 1999).

Tabela 4. Características de crescimento e desenvolvimento em plantas da 'Ouro' provenientes de duplicação de cromossomo

Variáveis	Ploidia		Ciclo	
	Diploide tratado	Tetraploide	1	2
APL	2,9 a	2,8 a	2,7 b	3,1 a
DPS	17,4 a	16,5 a	17,1 a	17,4 a
SGF	2,3 a	2,6 a	2,2 a	2,6 a
FVF	6,5 a	6,4 a	5,9 a	7,5 a
NFI	3,7 a	5,8 a	4,7 a	3,1 a
FVC	3,8 a	3,0 a	3,3 a	4,1 a
CEN	43,9 a	36,5 a	42,0 a	42,3 a
DEN	44,1 a	50,0 a	47,5 a	42,8 a
SGC	3,8 a	3,2 a	3,2 a	4,3 a
NPE	6,8 a	7,4 a	7,2 a	6,5 a
NFR	119,9 a	117,2 a	121,0 a	116,5 a
PCA	5,1 a	5,1 a	5,0 a	5,3 a
PPE	4,3 a	4,3 a	4,2 a	4,6 a
PFR	36,3 a	37,5 a	34,0 a	40,7 a
CFR	10,6 a	8,9 a	9,6 a	11,3 a
DFR	28,2 a	26,4 a	27,7 a	27,9 a
CPE	13,8 a	11,7 a	12,3 a	14,8 a
DPE	7,9 a	8,3 a	8,0 a	7,9 a
DFC	77,6 a	80,2 a	75,2 a	83,0 a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, dentro de cada ploidia e ciclo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.

APL: altura de planta; DPS: diâmetro do pseudocaule; SGF: sigatoka-amarela na floração; FVF: número de folhas vivas na floração; NFI: número de filhos; FVC: número de folhas vivas na colheita; CEN: comprimento do engaço; DEN: diâmetro do engaço; SGA: Sigatoka-amarela na colheita; NPE: número de pencas; NFR: número de frutos; PCA: peso do cacho; PPE: peso da penca; PFR: peso do fruto; CFR: comprimento do fruto; DFR: diâmetro do fruto; CPE: comprimento de pedicelo; DFC: nº de dias do florescimento a colheita

Equivalente aos diploides originais, todas as plantas, tetraploides e diploides tratados se mostraram suscetíveis a Sigatoka-amarela. Vale ressaltar que a cv. Ouro é altamente resistente a Sigatoka-negra e resistente ao mal-do-Panamá. Nos demais caracteres analisados (Tabela 4), notou-se que o peso médio do fruto, número de pencas e o peso do cacho foram menores do que os descritos na literatura (SILVA et al., 1999). Provavelmente devido às condições adversas do cultivo, que tiveram período de estiagem. As dimensões dos frutos

embora sejam características varietais, podem ser influenciadas por fatores ambientais e/ou pelo manejo cultural, conforme ocorrido nesse estudo.

Foi observado que todas as plantas tetraploides da 'Ouro' estudadas mostraram crescimento mais lento e florescimento tardio, além de produzirem pouco pólen. Resultados de outros estudos também mostraram que autotetraploides geralmente apresentam uma taxa de crescimento mais lenta do que os diploides correspondentes (NAKAI, 1977). Essa mesma característica foi observada em tetraploides induzidos por Vakili (1967).

Com relação à fertilidade feminina somente três plantas produziram sementes, duas no primeiro ciclo e uma nos dois ciclos avaliados, sempre na mesma quantidade, ou seja, duas sementes por planta. Destas plantas que demonstraram fertilidade feminina, uma era tetraploide e duas diploides tratadas.

As plantas tetraploidizadas da 'Ouro' se comportaram fora do padrão esperado, todavia, este comportamento muito provavelmente pode ter sido influenciado por fatores ambientais, o que pode levar as plantas a não expressarem o seu potencial. Mas, estudos explicam que o nível de expressão do gene pode ser aumentado ou diminuído de acordo com a variação da ploidia (GUO et al. 1996).

Foi verificado que a indução da duplicação de cromossomos na 'Ouro' não foi bem sucedida, pois produziu apenas quatro tetraploides, fazendo-se necessários novos testes para indução e mais estudos nessa cultivar, uma vez que ela tem características de interesse para o programa de melhoramento da banana. Mixoploides foram obtidos, mas não desenvolveram bem no campo e não foram incluídas nessas avaliações.

## **CONCLUSÕES**

Os autotetraploides da 'Lidi' apresentam características morfoagronômicas úteis, principalmente com relação ao aumento da resistência à Sigatoka-amarela e da fertilidade feminina. Portanto, os autotetraploides podem ser cruzados com diploides melhorados com grande chance de gerar híbridos triploides secundários superiores.

Mais estudos necessitam ser feitos nos tetraploides na cv. Ouro para que plantas com potencial para uso no programa de melhoramento possam ser identificados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v. 62, p. 3-12, 2007.

BELALCÁZAR CARVAJAL, S.L. **El cultivo del plátano en el trópico**. Cali, Colômbia: Imprensa Feriva, 1991. 376 p.

BUTORINA, A. K.; IEVLEV, V. V.; MURAYA, M. N. Cytogenetics of a spontaneous triploid in Oak (*Quercus robur* L.). **Soviet Genetics**, v. 19, n.4, p. 496-505, 1983.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. O.; NETO, H. P. S.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 805-813, 2011.

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

DERMEN, H. Colchicine polyploidy and technique. **The Botanical Review**, v. 6, p. 599-635, 1940.

DODDS, K. S. Genetical and cytological studies of *Musa*. V. Certain edible diploids. **Journal of Genetics**, v. 45, p. 113-138, 1943.

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

ELLIOTT, F. **Mejoramiento de plantas** - citogenética. Mexico: Compañía Editorial Continental, 1967, 474 p.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2013. Production (2011). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 06 fev. 2013.

GANGA, M.; CHEZHIYAN, 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.

GUO, M.; DAVIS, D.; BIRCHLER, J.A. Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. **Genetics**, v. 142, p.1349–1355, 1996.

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

KANCHANAPOOM, K.; KOARAPATCHAIKUL, K. In vitro induction of tetraploid plants from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) 'Kluai Leb Mu Nang' and 'Kluai Sa'. **Euphytica**, v.183, p.111-117, 2012.

KARCHI, Z.; GOVERS, A.; NERSON, H. 'Alena' watermelon. **HortScience**, v. 16, n. 4, p. 573, 1981.

KUSPIRA, J.; BHAMBHANI, R. N.; SADASIVAIAH, R. S.; HAYDEN, D. Genetic and cytogenetic analyses of the A genome of *Triticum monococcum*. III.

Cytology, breeding behavior, fertility, and morphology of autotriploids. **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, v. 28, p. 868-887, 1986.

KERNS, K. R.; COLLINS, J. L. **Chimeras in the pineapple: colchicine induced** tetraploids and diploid-tetraploids in the Cayenne variety. **Journal of Heredity**, v. 38, p. 323-330, 1947.

KRYTHE, J. M.; WELLENSIEKE, S. J. Five years of colchicine research. **Bibliographia Genetica**, v. 14, p. 1-132, 1952.

LESSA, L. S.; LEDO, C. A. S.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; OLIVEIRA, T. K. Características agrônômicas de híbridos diploides de bananeiras em três ciclos de produção em Cruz das Almas, Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 213-221, 2010.

LIMA, M. B.; SILVA, S. O.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, V. S. J.; GARRIDO, M. S.; AZEVEDO, R. L. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira no recôncavo baiano. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 515-520, 2005.

MATTOS, L. A.; AMORIM, E. P.; COHEN, K. O.; AMORIM, T. B.; SILVA, S. O. Agronomical, physical and chemical characterization of banana fruits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p. 225-231, 2010.

NAKAI, Y. Variations of sterase isozymes and some soluble proteins in diploids and theirs induced autotetraploids in plants. **Genetics**, v. 52 p.171-181, 1977.

OLIVEIRA, C. A. P.; PEIXOTO, C. P.; SILVA, S. O.; LEDO, C. A. S.; SALOMÃO, L. C. C. Genótipos de bananeira em três ciclos na Zona da Mata Mineira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 173-181, 2007.

PIO, L. A. S.; MORAIS-LINO, L. S.; OLIVEIRA, A. C. L.; SILVA, S. O.; PASQUAL, M.; ASMAR, S. A. **Técnica de pré-seleção em diploides de bananeira submetidas a duplicação de cromossomos**. Disponível em:

<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36004/1/ID27114pdf710.pdf>  
> Acesso em: 29. jan. 2013.

PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 185-210, 2001.

RABOIN, L. M.; CARREEL, F.; NOYER, J. L.; BAURENS, F. C.; HORRY, J. P.; BAKRY, F.; TÈZENAS DU MONTCEL, H.; GANRY, J.; LANAUD, C.; LAGODA, P. J. L. Diploid ancestors of triploid export banana cultivars: molecular identification of 2n restitution gamete donors and n gamete donors, **Molecular Breeding**, v. 16, p. 333–341, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide statistics: 9.2. Cary: SAS Institute, 2010.

SANFORD, J. C. Ploidy manipulations. In: MOORE, J. N; JANICK, J. **Methods in Fruit Breeding**, Purdue University Press, p. 100-123, 1983. 464p.

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

SILVA, S. de O; SOUZA-JUNIOR, M. T.; ALVES, E. J.; SILVEIRA, J. R. S.; LIMA, M. B. Banana Breeding Program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 399–436. 2001.

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

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

SILVA, S. O.; PASSOS, A. R.; DONATO, S. L. R.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, L.V.; RODRIGUES, M. G.V.; LIMA NETO, F. P.; LIMA, M. B. Avaliação de genótipos de bananeira em diferentes ambientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 737-748, 2003.

SILVA, S. O.; ALVES, H. J.; CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; JESUS, S. C. Variabilidade genética e melhoramento da bananeira. **Recursos Genéticos e Melhoramento para o Nordeste Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br/catalogo/livrorg/banana.pdf>> Acesso em 26. Fev. 2013.

SIMMONDS, N. W. Bananas. In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N. W. (Ed.). **Evolution of Crops Plants**, Logman Scientific & Technical / John Wiley & sons, p. 370-374, 1995.

SINGH, A. K.; MOSS, J. P.; SMART, J. 1990. Ploidy manipulations for inter specific gene transfer. In : BRADY, H .C.(Ed.), **Advances in Agronomy**, Academic Press, vol. 43, p. 199-240, 1990.

SOUZA, F. F.; QUEIROZ, M. A.; DIAS, R. C. S. **Melancia sem sementes**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento – encarte especial. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/melancia.pdf>> Acesso em: 3 abr. 2013.

SOTO BALLESTERO, M. **Bananos**: cultivo y comercialización. 2. Ed. San José: Litografía e Imprensa, 1992. 674 p.

STOVER, R.H. Banana, plantain and abaca diseases. **CMI**. 1972. 316 p.

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

STOVER, R.H.; SIMMONDS, N. W. **Banana**. 3 ed. Longmans. 1987. 468. p

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

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Banana breeding in Brazil. In: PERSLEY, G. J.; DE LANGHE, E. A. (ed.). **Banana and plantain breeding strategies**. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research, p.78-83, 1987.

SWENNE, A.; LOUANT, B. P.; DUJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotetraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **L'Agronomie Tropicale**, v. 36, p. 134-141, 1981.

TESFAYE, M. Agronomic and yield performance of induced-autotetraploid ensete (*Ensete ventricosum*) clones. **Plant Genetics Resource**, v.143, p. 56-58, 2005.

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.

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

VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; PASQUAL, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, F. L. Indução e identificação de tetraploide em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 4, p. 385-390, 2007.

VUYLSTEKE, D. R.; SWENNEN, R. L.; ORTIZ, R. Development and performance of black sigatoka-resistant tetraploids hybrids of plantain (*Musa* spp., AAB group). **Euphytica**, v. 65, p. 33-42, 1993.

WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 9, n. 1-2, p. 155-164, 2003.

## **CAPÍTULO 2**

### **COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE BANANEIRAS AUTOTETRAPLOIDES 'LIDI' OBTIDAS OBTIDA MEDIANTE DUPLICAÇÃO DE CROMOSSOMOS**

## COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE BANANEIRAS AUTOTETRAPLOIDES 'LIDI' OBTIDAS MEDIANTE DUPLICAÇÃO DE CROMOSSOMOS

Autora: Cícera Maria do Amaral

Orientadora: Profa. Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

Coorientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

RESUMO: A duplicação *in vitro* do número de cromossomos constitui uma importante ferramenta para complementar as atividades convencionais de melhoramento genético da bananeira de cultivares estéreis, mediante a produção de autotetraploides que serão utilizados em cruzamento com diploides melhorados para a geração de triploides secundários. A microsporogênese de plantas diploides de Lidi ( $2n = 2x = 22$ ) e seus autotetraploides ( $2n = 4x = 44$ ) originados de duplicação de cromossomos por colchicina foi avaliada. A caracterização meiótica foi feita em microsporócitos de anteras oriundas de flores masculinas com aproximadamente 1,5 cm de comprimento corados com carmim propiônico a 2%, e a viabilidade do pólen foi analisada mediante coloração com 2,3,5, trifeniltetrazólio (TTC) a 1% e germinação *in vitro*. A análise citológica de acessos diploides revelou anormalidades relacionadas à segregação irregular dos cromossomos, além de pontes cromossômicas, micronúcleos, micrócitos, assincronismo, díades, tríades, tétrades irregulares e políades, com uma frequência total, menor que 36%. Os autotetraploides exibiram as mesmas anormalidades meióticas dos diploides correspondentes, em frequência um pouco maior (31% a 47,2%). Embora tenham exibido anormalidades meióticas, os autotetraploides apresentaram viabilidade de pólen média de 72%. Portanto, os autotetraploides analisados podem ser utilizados como doadores de gametas masculinos  $2n$  no melhoramento genético da bananeira visando a geração de triploides secundários.

Palavras-Chave: citogenética, *Musa acuminata*, fertilidade

## MEIOTIC BEHAVIOR AND POLLEN VARIABILITY OF AUTOTETRAPLOID 'LIDI' BANANAS BY CHROMOSOME DOUBLING

Author: Cícera Maria do Amaral

Advisor: Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-advisor: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

**ABSTRACT:** *In vitro* duplication of the number of chromosomes is an important tool to complement conventional banana genetic breeding activities of sterile cultivars by the production of autotetraploids which will be used in crosses with improved diploids to develop secondary triploids. The microsporogenesis of Lidi ( $2n = 2x = 22$ ) diploid plants and its autotetraploids ( $2n = 4x = 44$ ) originated from chromosome doubling induced by colchicine treatment was evaluated. Meiotic characterization was made in anthers from male flowers with about 1.5 cm long stained with propionic Carmine 2%, and the viability of the pollen was analyzed by staining with 2,3,5,-triphenyl-tetrazolium chloride solution (TTC) 1% and *in vitro* germination. The cytological analysis of diploid accessions showed abnormalities related to irregular segregation of chromosomes and chromosome bridges, micronuclei, microcytes, asynchronism, diades, triades, irregular tetrads and polyades, with a total frequency less than 36%. The autotetraploids exhibited the same meiotic abnormalities as their corresponding diploids in a slighter greater frequency (31% to 47.2%). Although the autotetraploids exhibited meiotic abnormalities, they presented average pollen viability of 72%. Therefore, the autotetraploids analyzed may be used as  $2n$  male gamete donors in banana genetic breeding aiming to develop of secondary triploids.

Key-words: cytogenetics, *Musa acuminata*, fertility.

## INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Musa* são originárias da Ásia e encontram-se amplamente distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais. As bananeiras cultivadas são derivadas de hibridização natural intra e interespecífica entre diploides selvagens de *Musa acuminata* Colla (genoma A,  $2n = 2x = 22$ ) e *Musa balbisiana* Colla (genoma B,  $2n = 2x = 22$ ). Um sistema de classificação baseado em caracterização morfológica e número de cromossomos permitiu agrupar as cultivares dentro dos grupos genômicos AA, AB, BB, AAA, AAB, ABB e BBB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (CHEESMAN, 1947; SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). Estudos recentes de marcadores moleculares confirmaram e aperfeiçoaram esta classificação (CRESTE et al., 2004; PERRIER et al., 2009).

Entre os problemas que afetam a cadeia produtiva da banana estão as doenças causadas por fungos (sigatoka amarela, sigatoka negra e mal-do-Panamá) que podem causar perdas na produção de até 100%, a depender da cultivar e ou condições de cultivo (SILVA et al., 2002). Na ausência de variedades resistentes e adaptadas localmente, as plantas de bananeira necessitam de uso extensivo de agroquímicos que ameaçam a sustentabilidade da cultura e do meio ambiente.

A criação de novas variedades por meio de hibridações é dificultada pela esterilidade constatada nas cultivares diploides e triploides de bananeira. As cultivares do grupo genômico AAB (tipo Prata) apresentam esterilidade parcial, sendo possível a obtenção de um número limitado de sementes em cruzamentos com diploides do grupo AA. Entretanto, as cultivares do subgrupo Cavendish (Grande Naine, Williams, Nanicação, entre outras), grupo genômico AAA, apresentam elevado grau de esterilidade e não produzem sementes (SILVA et al., 2011).

A maioria das cultivares de banana são resultantes da fecundação entre um gameta  $2n$  com um gameta haploide  $n$  (ORTIZ, 1997). Os gametas  $2n$  são formados a partir de um processo meiótico anormal, em que a redução do número cromossômico não ocorre, formando gametas femininos com mesmo número de cromossomos das células somáticas. Melhoristas de muitas espécies propagadas vegetativamente tem aproveitado a vantagem da ocorrência de gametas  $2n$  para introgressão de genes de espécies selvagens

para as cultivares, através da manipulação da ploidia (PELOQUIN; ORTIZ, 1992).

A produção natural de gametas  $2n$  em bananeiras diploides é rara (ORTIZ, 1997). Assim, a indução da duplicação de cromossomos de diploides constitui uma estratégia alternativa para obtenção de gametas  $2n$  em bananeira, visando complementar as atividades convencionais de melhoramento genético, mediante a produção de autotetraploides, os quais serão utilizados em cruzamento com diploides melhorados para a geração de triploides secundários (SILVA et al., 2001; BAKRY et al., 2007; AMORIM et al., 2013).

Embora a obtenção de bananeira autotetraploide tenha sido relatada por diferentes grupos de pesquisa (VAKILI, 1967; STOVER; BUDDENHAGEN, 1986; HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007; COSTA et al., 2011; KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012), não existem relatos sobre a fertilidade desses autotetraploides gerados. Estudos sobre comportamento meiótico são importantes, pois a ocorrência de irregularidades meióticas pode levar à infertilidade parcial ou completa, comprometendo etapas importantes do programa de melhoramento.

Muitos estudos de citogenética têm sido realizados em *Musa*, em particular para investigar o pareamento cromossômico durante a meiose e associar estas configurações à ocorrência de alterações cromossômicas estruturais como translocações, inversões e duplicações (WILSON, 1946a, 1946b, 1946c; AGARWAL, 1983; SIMMONDS, 1962; FAURE et al., 1993; SHEPHERD, 1999; ADELEKE et al., 2004; HIPPOLYTE et al., 2010; THONNALAK et al., 2010; JERIDI et al., 2011). A heterozigosidade estrutural surge a partir de rearranjos cromossômicos estruturais em um dos cromossomos homólogos e podem afetar tanto o gameta masculino como o feminino.

O complexo *Musa acuminata* foi dividido em sete grupos de translocação (SHEPHERD, 1999). Dentro de cada grupo, os acessos selvagens apresentam a mesma estrutura cromossômica e são homozigotos para a estrutura cromossômica, em contraste com a maioria dos acessos cultivados diploides, triploides e tetraploides que apresentam alta heterozigosidade estrutural para

uma ou mais translocações ou inversões (DODDS, 1943a; WILSON, 1946b; DODDS; SIMMONDS, 1948; FAURE et al., 1993, SHEPHERD, 1999). Assim, os diploides partenocárpicos produzem gametas desbalanceados, e as espécies selvagens, por outro lado, apresentam gametogênese regular, havendo a produção de grande quantidade de gametas viáveis.

O conhecimento da natureza das alterações estruturais e o do nível de heterozigosidade estrutural dos diploides parentais, portanto, é essencial para o programa de melhoramento, pois permite uma melhor compreensão das causas de esterilidade.

Além disso, estas informações são importantes pois as alterações na estrutura dos cromossomos podem influenciar as recombinações e afetar a interpretação dos resultados em estudos de mapeamento (DOLEZEL, 2004).

O presente trabalho objetivou analisar a microsporogênese e a viabilidade de grãos de pólen de bananeiras autotetraploides, visando fornecer informações sobre a fertilidade masculina que servirão de base para a inclusão destes genótipos como doadores de gametas  $2n$  para a geração de triploides secundários.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Foram analisados nove genótipos autotetraploides gerados mediante a indução de duplicação de cromossomos com o uso de colchicina, dois diploides que passaram pelo tratamento com colchicina e não tiveram os cromossomos duplicados e três diploides que não foram tratados do acesso BGB025 – Lidi (=Pisang Lilin), *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*, AA. Todos os materiais são mantidos no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas – Bahia, altitude de 200m; latitude de 12°40'0"; longitude de 39°06'0"; clima tropical quente e úmido; precipitação média anual de 1224 mm; temperatura média anual de 24,5°C; solo latossolo amarelo distrófico. As plantas com cromossomos duplicados foram pré-selecionadas anteriormente com base na espessura foliar e tiveram a ploidia confirmada por citometria de fluxo (PIO et al., 2010).

## **Análises citológicas**

Para análise meiótica, flores masculinas imaturas com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético - v/v) por 24 horas em temperatura ambiente e depois, acondicionadas sob refrigeração, até o momento da sua utilização.

As anteras foram colocadas em ácido acético 45% por cinco minutos antes do preparo das lâminas, cortadas transversalmente e levemente esmagadas para liberação dos meiócitos em uma gota de carmim propiônico a 2%, cobertas com a lamínula e levemente aquecidas. O número de meiócitos analisados variou de 693 a 1.684 por genótipo. Foram consideradas as anormalidades meióticas observadas em metáfase, anáfase e telófase I e II, e nas tétrades. As mais representativas foram microfotografadas em um microscópio Olympus modelo BX51. As configurações meióticas foram interpretadas com base em Shepherd (1999) e Faure et al. (1993).

## **Viabilidade polínica**

Os grãos de pólen utilizados foram provenientes de flores de uma mesma bráctea, protegidas com saco de polietileno, coletadas na antese no horário de 7:30 às 9:00 da manhã, e a viabilidade foi analisada mediante duas metodologias:

### **a) Germinação *in vitro* de grãos de pólen**

Os grãos de pólen foram inoculados em placas de Petri contendo 35 mL do meio de cultura proposto por Soares et al. (2008). Com auxílio de um pincel, o pólen foi distribuído sobre o meio de cultura de modo a promover uma distribuição mais homogênea. Utilizou-se para cada placa uma amostra com grãos de pólen oriundos de anteras de quatro flores de cada genótipo.

Após a inoculação, as placas foram mantidas no escuro a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 24 horas antes de se realizar a contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento do tubo polínico, mediante observação em um estereomicroscópio binocular com objetiva 10x.

Para percentagem de germinação, foram contabilizados todos os grãos da placa, e para o comprimento do tubo polínico foram mensurados aleatoriamente cinco tubos em cada repetição, totalizando 40 tubos polínicos de cada genótipo estudado. O comprimento foi medido em micrômetros, utilizando-se estereomicroscópio e lâmina micrométrica e os dados foram transformados em milímetros. Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição representada por um quadrante na placa de Petri. Os dados de percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen foram transformados para  $\arcsen(\sqrt{x/100})$  e processado para análise de variância.

#### b) Teste colorimétrico

A viabilidade polínica, foi realizada através da coloração com o 2,3,5, trifeniltetrazólio (TTC) a 1%, diluído em uma solução de tampão tris HCl 0,15M, pH 7.8. Uma amostra contendo uma mistura de grãos de pólen retirados de anteras de quatro flores foi distribuída sobre uma lâmina de vidro com uma gota do corante e coberto com uma lamínula. A contagem foi feita ao acaso, através do método de varredura, sendo contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina/genótipo, com três repetições cada, perfazendo um total de 300 grãos de pólen, em um microscópio óptico modelo Leica DM1000, usando uma objetiva de 10x.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições cada. Os dados de percentagem foram transformados para  $\arcsen(\sqrt{x/100})$  antes da análise estatística. Para avaliar a relação germinação *in vitro* e a coloração com TTC, foi realizada a análise de variância e a comparação das médias foi feita pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2010).

Foram considerados inviáveis os grãos de pólen não corados, que tivessem tamanhos menores do que a maioria, diminuição da porção citoplasmática ou com a parede enrugada.

## RESULTADOS

### Comportamento meiótico dos diploides

O estudo relata o comportamento meiótico de plantas autotetraploides obtidas a partir da duplicação de cromossomos da cultivar Lidi (AA). Esta cultivar apresenta heterozigidade cromossômica estrutural, sendo classificada no grupo de translocação NM (Northern Malayan) (SHEPHERD, 1999).

O desenvolvimento dos microsporócitos não foi sincronizado, sendo encontradas fases diferentes da meiose dentro da mesma antera e entre anteras dentro da mesma flor.

A análise de metáfases I e anáfases I evidenciou que as três plantas da 'Lidi' do banco de germoplasma de banana (T25-1, T25-3 e T25-4), usadas como testemunhas, são diploides ( $2n = 2x = 22$ ), e que as plantas 2404-1 e 2406-1, passaram pelo tratamento com colchicina mas não duplicaram o número de cromossomos, sendo também diploides. Estes dois últimos foram designados DT2404-1 e DT2406-1 (DT = diploide tratado).

Para a maioria das células apenas parte da configuração do pareamento pode ser visualizada, os outros cromossomos não estavam suficientemente espalhados. Assim, poucas células em metáfase I foram utilizadas para análise de pareamento. As associações cromossômicas foram variáveis entre diferentes metáfases do mesmo clone. Observações dos tipos de pareamento na metáfase I do acesso diploide original (T25-2, T25-3 e T25-4) evidenciaram a presença de células com configurações normais, 11 bivalentes (11II) ou com 10 bivalentes e dois univalente (10II+2I) na maioria das células, e algumas células com univalentes, trivalentes e ou tetravalentes na configuração aberta e até um caso de associação entre cinco cromossomos (V), indicando a presença de polimorfismo estrutural, como translocação ou duplicação (Figura 1). Entretanto, como não foram observados tetravalentes fechados, não foi possível estabelecer a presença de translocação recíproca. Na anáfase I foram observadas pontes com fragmento, sugerindo a presença de inversão. Estas observações são consistentes com os estudos prévios neste mesmo clone (DODDS, 1943a; WILSON, 1946b; SHEPHERD, 1999; HIPPOLYTE et al., 2010).

As configurações mais frequentes dos diploides originais na metáfase I foram  $9II + 1III + 1I$  e  $6II + 2IV + 2I$ , e estão relacionadas à presença de uma ou duas translocações (Tabela 1), de acordo com Faure et al. (1993) e Shepherd (1999). As figuras 1d e 1f são representações típicas de segregação alternada dos cromossomos, em um indivíduo heterozigoto para translocação, após a ocorrência de recombinação (formação de quiasmas) envolvendo três e cinco cromossomos, respectivamente.

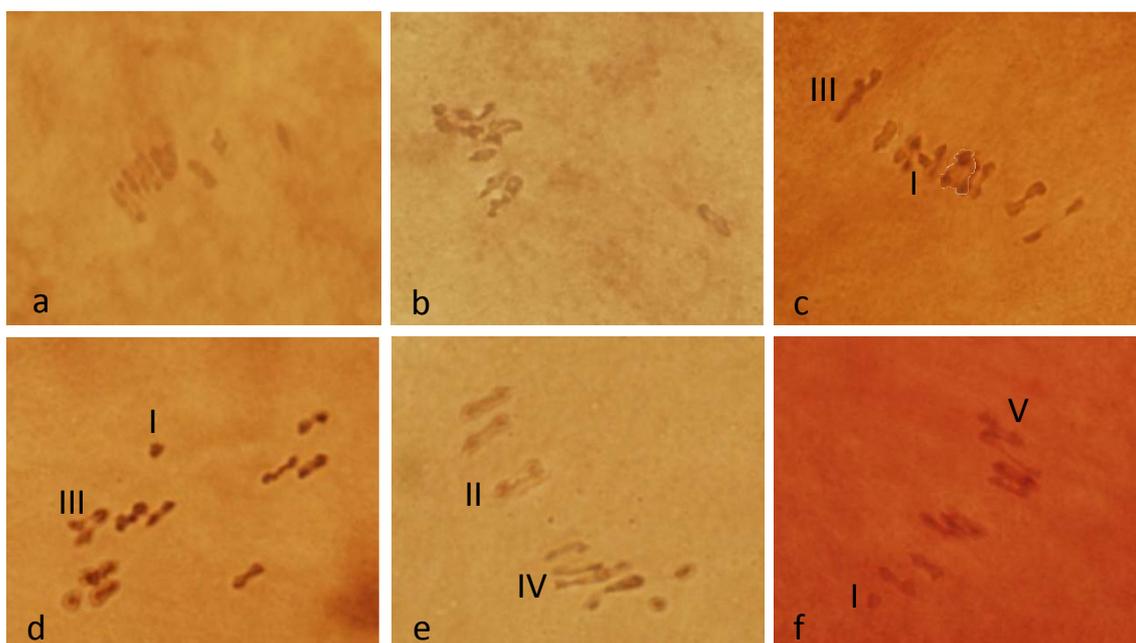


Figura 1. Configurações na metáfase I no acesso original diploide da cultivar Lidi (T25-1, T24-3 e T25-4). a) pareamento normal de 11 bivalentes e b) 10 bivalentes e 2 univalentes; c) 9 bivalentes, 1 trivalente e 1 univalente; d) 8 bivalentes, 1 trivalente e 3 univalentes; e) 6 bivalentes, 2 tetravalentes e 2 univalentes; f) 8 bivalentes, 1 pentavalente e 1 univalente.

Tabela 1. Tipos de configurações meióticas na metáfase I na cultivar Lidi (AA) original e provável alteração estrutural.

<b>Configuração na metáfase I</b>	<b>Número de células com o tipo de configuração*</b>	<b>Provável alteração estrutural**</b>
11II	25	Sem alteração
10II + 2I	8	Sem alteração
9II + 1III + 1I	8	Pelo menos 1 translocação
9II + 1IV	1	Pelo menos 1 translocação
8II + 1III + 3I	1	Pelo menos 1 translocação
8II + 1V + 1I	1	Pelo menos 2 translocações
7II + 2III + 2I	1	Pelo menos 2 translocações
6II + 2IV + 2I	4	Pelo menos 2 translocações

\*Foram consideradas apenas células onde foi possível determinar o pareamento de todos os cromossomos.

\*\*Interpretação baseada em Shepherd (1999) e Faure et al. (1993).

As irregularidades meióticas mais comumente observadas foram a ascensão precoce de cromossomos na metáfase I (Figura 2b) e II (Figura 2g), cromossomos retardatários na anáfase I (Figura 2d). Estes cromossomos atrasados (Figura 2e) ou adiantados tenderam a se distanciar do grupo e formar micronúcleos (Figura 2h) que deram origem a micrócitos no final da telófase I (Figura 2f) e II, tétrades com micrósporos de tamanho irregular (Figura 2j) e políades (Figuras 2k e 2l). As frequências destas anormalidades são apresentadas nas Tabelas 2 e 3. A ocorrência de pontes em anáfase I foi menos frequente nos diploides. As plantas que foram submetidas ao tratamento com colchicina e não tiveram os cromossomos duplicados (DT2404-1 e DT2406-1) apresentaram comportamento meiótico semelhante ao dos controles (T25-1, T25-3 e T25-4).

No final da meiose, tipos diferentes de tétrades foram verificados, sendo estes padrões comuns e normais independente de ploidia. Eles surgiram pela divisão celular seguindo as orientações (perpendiculares) dos cromossomos na metáfase II (Figura 3).

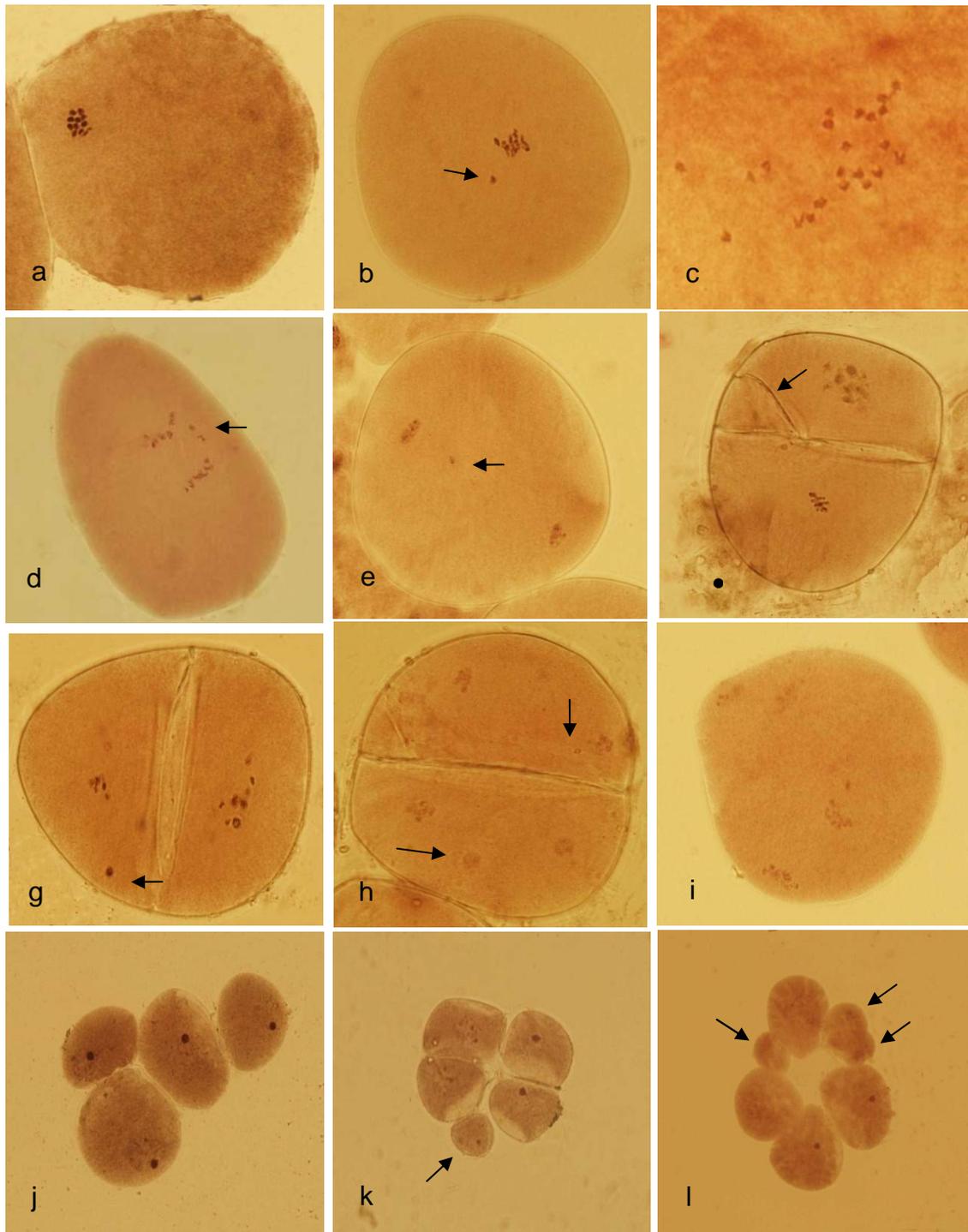


Figura 2. Comportamento meiótico de diploides originais de Lidi utilizados como testemunhas bem como de diploides tratados por colchicina mas que não duplicaram: a) Metáfase I com 11 bivalentes; b) Metáfase I com cromossomos em ascensão precoce; c) Início da anáfase I com segregação normal dos cromossomos 11/11; d) Anáfase I com retardatários; e) Telófase I com cromossomo atrasado; f) Assincronismo celular (metáfase II e intérfase) e presença de micrócito (seta); g) Metáfase II com ascensão precoce de cromossomo; h) Telófase II com micronúcleos (seta); i) Telófase II sem citocinese; j) Tétrade com micrósporos em tamanho irregular; k) Políades com um micrócito (seta); l) Políades com três micrócitos (setas).

Tabela 2. Frequência de anormalidades (%) meióticas em diploides originais e tratados com colchicina mas com cromossomos não duplicados e nos autotetraploides obtidos a partir da duplicação de cromossomos da cultivar 'Lidi' (*Musa acuminata*).

Genótipo	Ploidia	N°CMPs total	M I		A I			T I		M II			A II				T II	TA		
			AP	CR	SD	PT	CA	Total	CA	AP	ASS	PM	Total	CR	SD	PT	CA		Total	CA
T25-1	Diploide	231	17,32	-	0,43	-	0,87	1,30	-	0,87	-	-	0,87	-	-	-	-	-	2,60	22,09
T25-3	Diploide	428	7,94	1,64	0,47	0,93	0,70	3,74	0,47	-	1,17	0,23	1,40	-	-	-	-	-	0,23	13,78
T25-4	Diploide	465	27,96	0,22	0,22	-	0,65	1,08	1,08	5,16	3,44	1,08	9,68	-	-	-	-	-	1,08	40,88
DT2404-1	Diploide	227	5,29	0,88	1,76	-	0,88	3,52	4,41	6,17	-	-	6,17	0,44	-	-	0,44	0,88	-	20,27
DT2406-1	Diploide	666	28,53	1,65	0,30	0,45	0,60	3,00	0,45	-	0,90	0,15	1,05	0,15	-	0,15	-	0,30	1,20	34,53
2317-1	Tetra	488	11,27	1,64	1,64	2,25	2,25	7,79	7,38	1,84	1,84	-	3,69	0,61	-	-	-	0,61	-	30,74
2319-2	Tetra	167	4,79	-	-	-	-	-	-	19,76	7,19	5,99	32,93	2,99	-	-	0,60	3,59	-	41,31
2322-2	Tetra	931	18,05	1,18	0,21	0,43	0,75	2,58	2,58	2,47	2,69	1,07	6,23	0,54	0,11	0,43	0,21	1,29	0,64	31,37
2402-3	Tetra	400	-	-	-	-	-	-	-	22,25	17,00	1,50	40,75	1,00	-	-	0,25	1,25	-	42,00
2403-2	Tetra	709	6,06	1,83	0,99	0,28	-	3,10	1,41	12,41	7,76	3,10	23,27	4,51	-	1,13	0,42	6,06	2,12	42,02
2408-1	Tetra	681	20,56	1,62	0,15	0,73	0,44	2,94	0,88	6,61	2,94	1,91	11,45	0,88	-	0,15	0,15	1,17	0,15	37,15
2410-2	Tetra	185	32,97	-	-	-	-	-	-	3,78	2,16	-	5,95	1,08	-	-	-	1,08	-	40,00
2417-1	Tetra	460	2,83	0,87	-	0,43	0,22	1,52	0,65	9,57	5,87	0,87	16,30	3,04	0,22	0,43	0,22	3,91	3,26	28,47
2418-1	Tetra	413	19,37	2,66	0,48	-	1,94	5,08	2,42	7,26	2,42	0,97	10,65	0,97	0,48	0,73	-	2,18	0,24	39,94

MI = metáfase I; AI = anáfase I, TI = telófase I; MII = Metáfase II; AII = anáfase II, TII = telófase II; AP = ascensão precoce; CR = cromossomo retardatário; SD = segregação desigual; PT = ponte; CA = cromossomo atrasado; ASS = assincronismo; PM = presença de micróctos; TA = total de anormalidades.

Tabela 3. Frequência de anormalidades observadas nas tétrades de genótipos diploides e autotetraploides da cultivar Lidi.

Genótipo	Ploidia	Nº total de produtos da meiose analisados	Díades (%)	Triádes (%)	Tétrades com micrósporos com tamanhos desiguais (%)	Tipos de poliádes (%)				Total de anormalidades (%)
						Péntade	Héxade	Héptade	Óctade	
T25-1	Diploide	501	0,20	1,00	17,17	10,18	-	0,20	-	28,74
T25-3	Diploide	748	2,01	2,81	9,76	10,96	3,48	0,27	0,40	29,68
T25-4	Diploide	574	1,74	2,79	14,46	9,93	1,05	0,17	0,17	30,31
DT2404-1	Diploide	620	1,94	3,23	30,81	0,81	-	0,16	-	36,94
DT2406-1	Diploide	528	2,08	4,17	23,67	15,53	6,63	1,89	0,38	54,36
2317-1	Tetraploide	234	1,28	1,28	17,52	9,83	0,85	0,85	-	31,62
2319-2	Tetraploide	526	2,09	2,28	32,32	8,17	2,66	1,33	0,19	49,05
2322-2	Tetraploide	753	1,33	1,86	39,84	6,51	2,92	0,40	0,13	52,99
2402-3	Tetraploide	1029	1,17	1,55	18,27	10,59	2,43	1,36	0,49	35,86
2403-2	Tetraploide	415	0,96	2,89	33,25	8,67	1,93	0,48	-	48,19
2408-1	Tetraploide	510	0,59	0,78	38,63	-	1,96	0,39	-	42,35
2410-2	Tetraploide	914	0,77	0,44	40,37	-	1,09	-	-	42,67
2417-1	Tetraploide	778	1,29	1,16	39,72	5,78	-	-	0,26	48,20
2418-1	Tetraploide	398	1,76	0,75	18,34	6,78	0,50	0,25	-	28,39

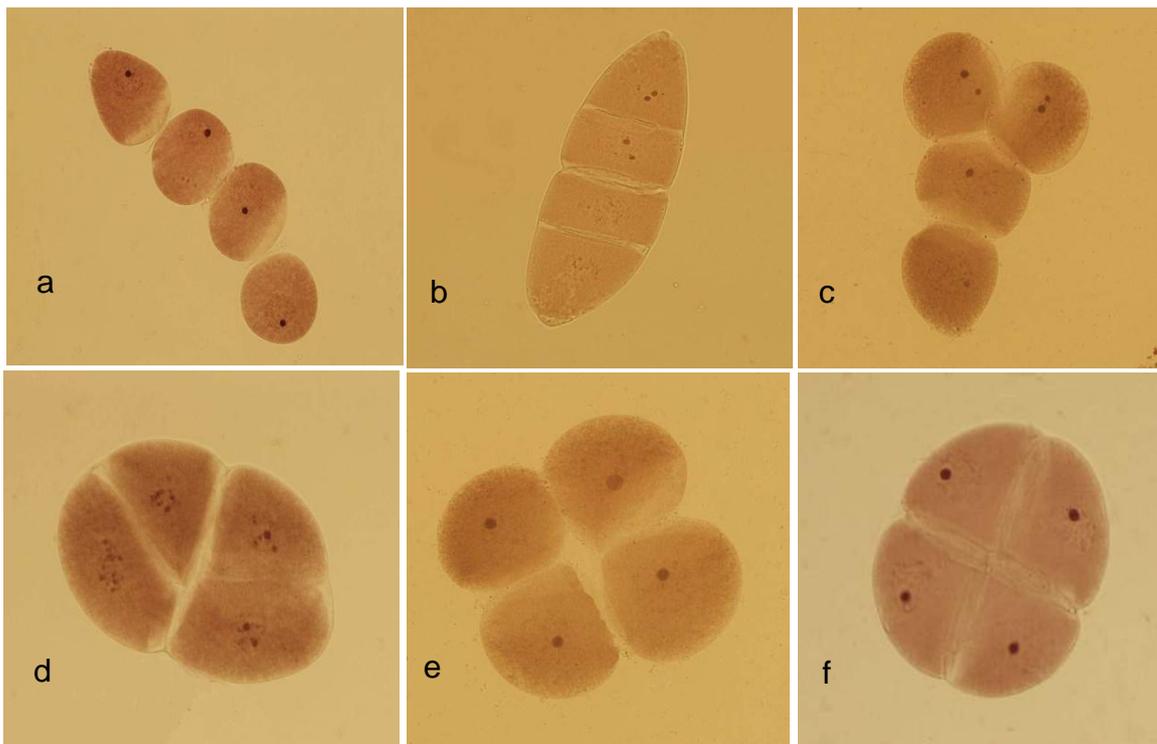


Figura 3. Tipos de tétrades normais e comuns em plantas de Lidi independente de ploidia: a-b) Tétrades em disposição linear; c) Tétrade em disposição perpendicular; d-e) Tétrades em disposição paralela; f) Tétrade com forma bilateral

### Comportamento meiótico dos autotetraploides

A confirmação do número de cromossomos dos autotetraploides foi feita mediante a observação da segregação dos cromossomos na anáfase I e em prófases II. A observação das configurações cromossômicas na metáfase I dos autotetraploides foi dificultada pela sobreposição dos cromossomos. Ainda assim, foi possível identificar trivalentes e tetravalentes em algumas células (Figura 4).

Para as plantas autotetraploides, as anormalidades mais encontradas na primeira divisão foram cromossomos em ascensão precoce em metáfase I (Figura 5b) e na metáfase II (Figura 5c). Outras irregularidades foram observadas com menor frequência (Tabela 2) como pontes e cromossomos retardatários nas anáfases I e II envolvendo de 2 a 4 cromossomos (Figura 5d-f), assim como presença de micronúcleos na telófase I (Figura 5g).

Semelhante ao observado nos diploides, os cromossomos que se atrasaram ou tiveram ascensão precoce na metáfase I deram origem a micronúcleos que no final da telófase I formaram um ou mais micrócitos (Figura

5c, 5h e 5i). Também ocorreu assincronismo no ciclo celular entre os micrócitos na meiose II, onde enquanto uma célula estava em metáfase II a outra já estava na anáfase ou telófase (Figuras 5i). Quanto ao desenvolvimento dos microsporócitos nestes materiais, também foi assincrônico.

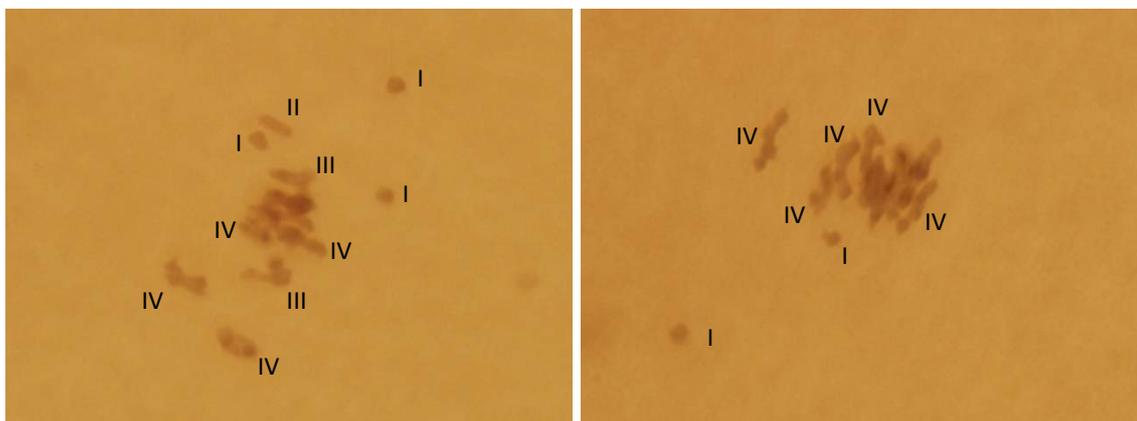


Figura 4. Configuração do cromossomos na metáfase I de autotetraploides de 'Lidi'. A sobreposição impede a visualização de todas as associações dos cromossomos.

No final da microsporogênese dos autotetraploides, foram observadas com maior frequência as tétrades com micrósporos de tamanhos irregulares (Figura 5j). Também foram visualizadas políades, entre estas as pântades foram registrados em maior frequência (Figura 5k), seguidas de hexas (Figura 5l), héptades e óctades (Tabela 3). Díades e tríades foram encontradas no final da meiose em menor quantidade em relação a outros produtos meióticos, tanto em diploides como em tetraploides, neste último, em maior frequência.

A frequência total de anormalidade por genótipo nos diploides originais de Lidi variou de 23,9 a 35% e nos autotetraploides, de 31 a 47,2%, incluindo aqui anormalidades desde a metáfase I até as tétrades. Dentro de cada ploidia os genótipos que apresentaram menor frequência total de anormalidades foi o diploide original T25-3 e o autotetraploide 2317-1, com 23,9% e 31%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Ploidia, número total de células mãe do grão de pólen (CMPs) analisadas e frequência total de anormalidades meióticas de diploides e autotetraploides de 'Lidi.'

Genótipo	Ploidia	Número e % de células com anormalidades meióticas	
		Nº total de células analisadas	Nº total de células anormais (%)
T25-1	Diplo	732	195 (26.7)
T25-3	Diplo	1176	281 (23.9)
T25-4	Diplo	1039	364 (35.0)
DT2404-1	Diplo	849	275 (32.4)
DT2406-1	Diplo	1194	517 (43.3)
2317-1	Tetra	722	224 (31.0)
2319-2	Tetra	693	327 (47.2)
2322-2	Tetra	1684	691 (41.0)
2402-3	Tetra	1429	537 (35.8)
2403-2	Tetra	1124	498 (44.3)
2408-1	Tetra	1196	469 (39.2)
2410-2	Tetra	1099	464 (42.2)
2417-1	Tetra	1238	506 (40.9)
2418-1	Tetra	811	278 (34.3)

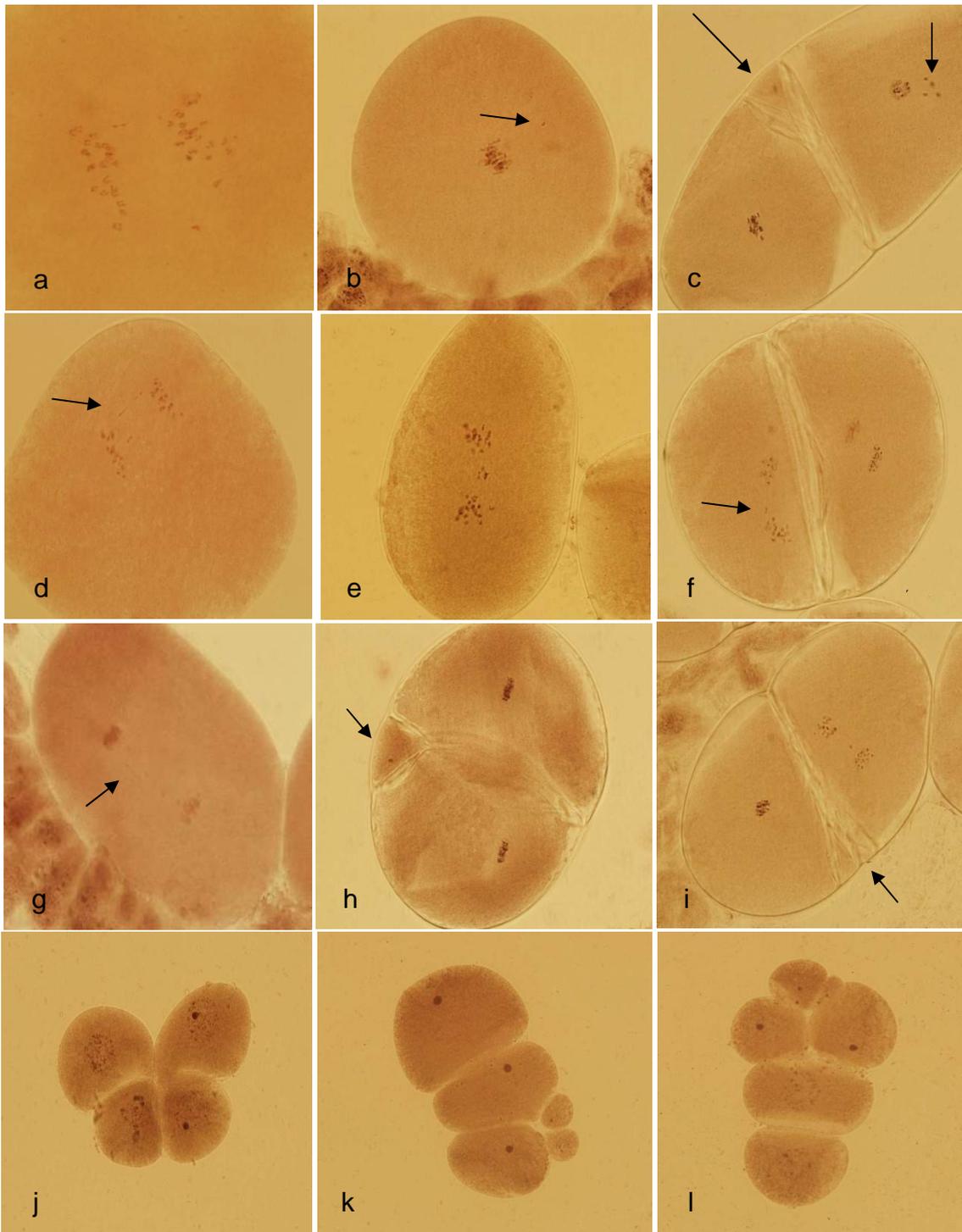


Figura 5. Comportamento meiótico em genótipos autoetraploides de Lidi: a) Anáfase I com 22 bivalentes em direção aos pólos; b) Ascensão precoce em metáfase I; c) Metáfase II com cromossomos precoces (seta menor) migrando para o pólo e presença de micrócito (seta maior); d) Anáfase I com cromossomos formando ponte (seta); e) Anáfase I com cromossomos retardatários; f) Anáfase II com retardatários (seta); g) Telófase I com cromossomos atrasado na placa (seta); h) Presença de micrócito (seta) em metáfase II; i) Assincronismo celular com anáfase e metáfase em cada célula e micrócito (seta); j) Tétrade irregular quanto ao formato; k) Pêntade com a presença de dois micrócitos; l) Héxade com dois micrócitos.

## Viabilidade de pólen

Todas as plantas foram analisadas para fertilidade masculina. De uma maneira geral foi verificado que os autotetraploides apresentaram uma quantidade maior de pólen do que as plantas diploides.

Pelo teste colorimétrico com TTC foi possível detectar que a maioria dos genótipos apresentou elevada percentagem de pólen viável, independente do grau de ploidia, com exceção do diploide DT2406-1 (Tabela 5). Os grãos de pólen viáveis coraram intensamente com o TTC (Figuras 6c, 6d e 6e) enquanto que os inviáveis ficaram transparentes (Figuras 6d e 6e). Foram observadas variações no tamanho dos grãos de pólen viáveis (Figuras 6d e 6e), e mesmo corados, estes grãos de pólen não foram considerados, porque essa variação do tamanho é consequência direta da formação de micrócitos e de gametas desbalanceados.

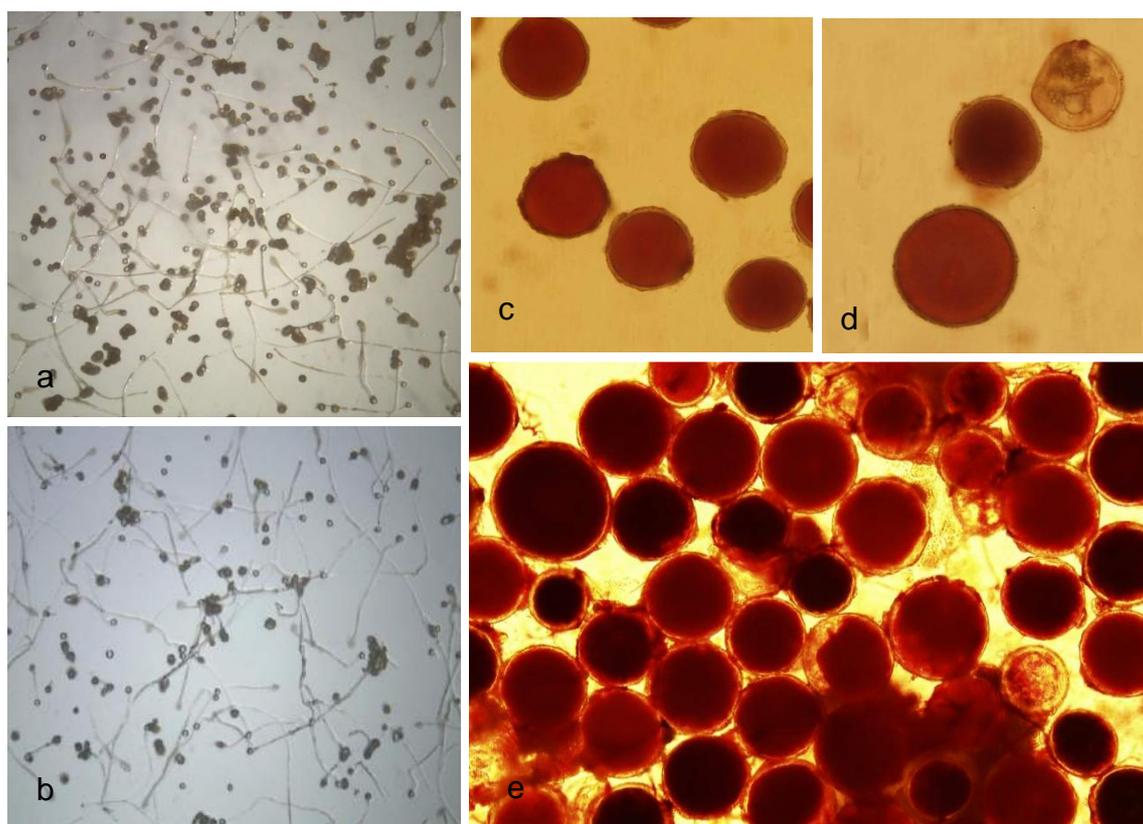


Figura 6: Viabilidade de pólen de bananeira Lidi diploide e autotetraploide. a) Germinação *in vitro* de grãos de pólen de diploides; b) Germinação *in vitro* de grãos de pólen de autotetraploides; c-e) Grãos de pólen viáveis (corados) e inviáveis (não corados) de bananeira Lidi autotetraploide. Note que embora viáveis os grãos de pólen apresentaram variação no tamanho.

Tabela 5. Viabilidade, germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico dos grãos de pólen de genótipos diploides e autotetraploides de 'Lidi'.

Genótipo	Ploidia	Viabilidade TTC (%)	Germinação <i>in vitro</i> (%)	Comprimento do tubo polínico (mm)
T25-1	Diplo	83,5	42,9	1,2
T25-3	Diplo	44,6	56,1	1,1
T25-4	Diplo	93,4	41,5	2,0
<b>Média</b>		<b>73,8 a</b>	<b>46,8 a</b>	<b>1,4 b</b>
DT2404-1	Diplo	98,3	70,4	1,7
DT2406-1	Diplo	26,5	37,0	1,5
<b>Média</b>		<b>62,4 a</b>	<b>53,7 a</b>	<b>1,6 b</b>
2317-1	Tetra	70,0	61,6	2,7
2319-2	Tetra	72,5	37,5	2,5
2322-2	Tetra	85,0	61,9	2,4
2402-3	Tetra	61,4	57,4	1,9
2403-2	Tetra	82,7	55,6	2,9
2408-1	Tetra	63,4	28,7	2,1
2410-2	Tetra	61,4	68,1	1,8
2417-1	Tetra	74,8	53,2	1,8
2418-1	Tetra	73,3	57,2	2,9
<b>Média</b>		<b>71,6 a</b>	<b>53,5 a</b>	<b>2,3 a</b>
<b>Média geral</b>		<b>70,7</b>	<b>52,1</b>	<b>2,0</b>

Médias de cada ploidia seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A germinação *in vitro* dos grãos de pólen de bananeira (Figura 6a e 6b), nas condições testadas neste estudo, evidenciou uma taxa de viabilidade inferior quando comparado com o teste colorimétrico com TTC, com raras exceções. Quanto ao comprimento do tubo polínico, os autotetraploides superaram os diploides analisados (Tabela 5).

O genótipo 2317-1, que apresentou a menor frequência de irregularidade nos meiócitos entre os autotetraploides, também registrou uma média de 70,0% e 61,6% de grãos de pólen viáveis e germinados, respectivamente. Apesar da frequência de anormalidade ter sido superior na maioria dos tetraploides, isso não afetou muito a percentagem de viabilidade e de germinação *in vitro* dos grãos de pólen. Mesmo nos genótipos que apresentaram as maiores frequências de anormalidades na meiose (2319-2, 2403-2 e 2410-2) estas não foram suficientes para comprometer a fertilidade do pólen, pois estes mostraram mais de 60% de viabilidade.

## DISCUSSÃO

A indução da duplicação de cromossomos é uma técnica que vem sendo aplicada em bananeira visando a geração de triploides secundários (HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007; KANCHANAPOOM; KOARAPATCHAIKUL, 2012). Os requisitos para a escolha dos genótipos de bananeira para geração dos autotetraploides incluem partenocarpia, características agrônômicas de interesse, tipo de banana a ser desenvolvida (Prata, Terra, Cavendish) e seu comportamento com respeito a doenças e fertilidade masculina e/ou feminina (BAKRY, 2009). As características citogenéticas também devem ser consideradas uma vez que os autotetraploides serão utilizados como parentais doadores de gametas  $2n$  no programa de melhoramento.

A frequência de anormalidades nas células analisadas dos autotetraploides foi considerada baixa e isso não compromete tanto a viabilidade de pólen destes materiais, já que a maioria apresentou boa frequência de pólen viável e grande quantidade de pólen.

A observação das configurações cromossômicas observadas em diploides de 'Lidi' evidenciou a presença de diferentes combinações de univalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes e pentavalentes, conforme já relatado por outros autores para este clone (WILSON, 1946a; SHEPHERD, 1999).

Um amplo estudo meiótico em *Musa* demonstrou não somente pareamento regular com 11 bivalentes em espécies selvagens, mas também aberrações no pareamento de cromossomos com univalentes, trivalentes e multivalentes,

incluindo heterozigiosidade para uma ou mais translocações ou inversões, em clones partenocárpicos (SHEPHERD, 1999).

Pesquisas sobre alterações estruturais nos cromossomos de cultivares diploides de *Musa* mostram que a esterilidade nesses materiais não é necessariamente resultado da heterozigiosidade estrutural, mas pode ser também induzida por genes (FAURE et al., 1993). As mutações que alteram a frequência e a distribuição de trocas meióticas em organismos resultam em erros de segregação cromossômica na meiose I (BAKER et al., 1976).

Estudos citológicos na cultivar Lidi mostraram a formação de univalentes e elevado grau de formação de trivalentes (WILSON, 1946b), que é explicado pela suposição de que essa variedade é um híbrido de translocação recíproca (DODDS, 1943b). A segregação dos cromossomos não é seriamente afetada por esta translocação, mas uma grande parte, cerca de dois terços, de gametas aparentemente euploides seria desequilibrado pela segregação aleatória de trivalentes e univalentes e, portanto, provavelmente inviável. A presença de translocações, entretanto, não impede a formação de 11 bivalentes e gametas balanceados em alguns genótipos (FAURE et al., 1993). A esterilidade feminina completa desta variedade, no entanto, deve ser parcialmente atribuída a outras causas genéticas (WILSON, 1946b).

As configurações cromossômicas nos autotetraploides induzidos foram dificultadas devido ao pequeno tamanho dos cromossomos, bem como ao aspecto difuso e sobreposto destes. Todavia, no que foi possível verificar, constatou-se a presença de associações bi e tetravalentes, este último, típico de poliploidia. Alguns bivalentes formavam um tipo de anel, com possível formação de quiasmas nos dois braços cromossômicos e ou devido à homozigiosidade para a alteração cromossômica estrutural.

As configurações observadas nas metáfases I não são, necessariamente, as que melhor caracterizam a constituição cromossômica, pois podem resultar de quebras em configurações maiores de pareamento como consequência da limitada formação de quiasmas (considerando os possíveis efeitos das translocações). A configuração observada em uma célula específica é apenas uma das diferentes alternativas de pareamento. Assim, a avaliação de diferentes fases da meiose e a observação de anormalidades controladas geneticamente (assinapses e dessinapses) podem fornecer informações mais seguras sobre as

propriedades dos cromossomos envolvidos, mostrando-se úteis no diagnóstico de irregularidades (SYBENGA, 1992).

A presença comum de univalentes em meiócitos nos genótipos de Lidi, diploides e autotetraploides também pode ser explicada pela terminalização precoce de quiasmas. Considerando o tamanho pequeno dos cromossomos de banana, embora não seja o menor entre as plantas com flores, raramente é possível em associações bivalentes discriminar quiasmas (SHEPHERD, 1999).

No presente estudo, as anomalias meióticas mais comuns encontradas nos diploides e autotetraploides da Lidi foram, ascensão precoce de cromossomo na meiose I e II e cromossomos retardatários na anáfase I, que como consequência podem causar segregação irregular cromossômica e formação de gametas desbalanceados, comprometendo a fertilidade do pólen.

Cromossomos univalentes em diacinese ou metáfase I podem resultar de baixa frequência ou terminalização precoce de quiasmas, pela presença de genes ou assinapses e dessinapse em prófase I (GOTTSCHALK; KAUL, 1980). Qualquer que seja a origem, o comportamento meiótico é sempre o mesmo, com univalentes e até bivalentes mostrando ascensão precoce nas metáfases ou permanecendo como retardatários nas anáfases. Em ambos os casos podem originar micronúcleos nas telófases, ou podem, até, apresentar segregação irregular, migrando ambos os homólogos para o mesmo pólo, originando núcleos aneuploides. Qualquer que seja o comportamento dos cromossomos univalentes, eles causarão desbalanço gênico, afetando a fertilidade do pólen. No entanto, esses univalentes aqui identificados são de baixa frequência. Irregularidades meióticas incluindo cromossomos retardatários e univalentes influenciaram a fertilidade do pólen e formação de micrósporos em *Musa* (ADELEKE et al., 2004).

Embora a frequência de ascensão precoce tenha sido elevada, aparentemente a maioria dos cromossomos que segregaram de forma irregular na metáfase I e na anáfase I foi incluída pelo menos em um dos núcleos principais. Aqueles que não se reintegraram ao núcleo principal formaram micronúcleos e sofreram citocinese ao final da meiose I, dando origem aos micrócitos visualizados na metáfase II. De modo semelhante, os cromossomos com segregação precoce e os retardatários na meiose II podem ser incluídos no núcleo principal ou ainda ser eliminados como micrócitos no final da microsporogênese. Esses micrócitos dão origem a grão de pólen pequenos,

desbalanceados geneticamente e estéreis (BAPTISTA-GIACOMELLI et al., 2000; FELISMINO et al., 2010). Se os gametas desbalanceados (com cromossomos a mais ou a menos) forem viáveis, a utilização destes em cruzamento poderia gerar indivíduos aneuploides.

No caso deste trabalho, os grãos de pólen que coraram no teste colorimétrico e tinham tamanho fora do padrão normal, não foram considerados para a contagem, demonstrando que as plantas tetraploides produziram uma quantidade significativa de pólen viável para fertilizar o núcleo secundário do saco embrionário e assim, formar sementes.

Pontes com fragmento na anáfase I indicam a ocorrência de inversão paracêntrica. Mediante a recombinação em cromossomos com inversão é formada uma ponte que se quebra e resulta em deficiência e perda do fragmento acêntrico. Em condição heterozigota, causam a redução da fertilidade em consequência da formação de cromátides deficientes e/ou duplicadas.

Shepherd (1999) relatou a presença de pontes com ou sem fragmentos em anáfase I em diversos genótipos diploides de *Musa*, incluindo híbridos onde a 'Lidi' foi utilizada como um dos parentais, sendo muitas vezes relacionadas a inversões paracêntricas ou translocações.

Na metáfase e anáfase II os cromossomos manifestaram assincronia no ciclo celular, pois enquanto um micrósporo estava na metáfase, o outro estava em anáfase ou mesmo telófase, ou anáfase e intérfase. Esse comportamento foi maior nos autotetraploides e sugere-se que os cromossomos não tenham o mesmo ritmo de divisão celular. O assincronismo também foi comum em anteras dentro da mesma flor e em flores dentro da mesma bráctea, com diferentes estágios. Esse tipo de comportamento foi relatado para tetraploide de *Paspalum subciliatum* (PAGLIARINI, 2000). A falta de sincronismo no desenvolvimento dos microsporócitos, encontrados em diploides e autotetraploides neste estudo, dificultou a determinação de uma relação entre comprimento da antera e fase da meiose.

Em relação aos meiócitos que tinham metáfase II perpendiculares, estes deram origem a tétrades normais mas com a figura no mesmo padrão, seguindo a orientação que apresentou na metáfase II. Ao contrário do relatado por Thonnalak et al. (2010), alguns padrões de orientações diferentes em metáfase II que produzem tipos diferentes na configuração das tétrades, não levam estas a serem

estéreis, porque em banana esses formatos são comuns, assim como foi verificado que muitos meiócitos durante a microsporogênese não tinham formatos arredondados.

Estudos realizados sobre fertilidade em genótipos diploides e triploides de bananeira mostraram que a formação de tétrades anormais, incluindo políades, superou as normais na maioria dos acessos em ambas as ploidias (WILSON, 1946c; RAMIREZ, 1990; ADELEKE et al., 2004) indicando que a produção de políades é comum em *Musa*. As configurações de tétrades anormais provavelmente estão relacionadas com várias orientações cromossômicas na metáfase II seguidas de movimentos irregulares no final da telófase II (RAMIREZ, 1990).

Estudos feitos com 18 variedades de quatro espécies diferentes de *Musa* mostrou que 90% das tétrades eram normais e cerca de 41% do pólen era viável (WILSON, 1946b).

Quanto as díades, observadas aqui em baixa frequência em ambas as ploídias, são formadas quando há falhas na primeira ou na segunda citocinese, e podem originar micrósporos binucleados ou com núcleo de restituição ( $2n$ ). As tríades, no entanto, são formadas quando a segunda citocinese ocorre apenas em uma das células da díade temporária.

Os genótipos diploides de Lidi analisados, considerando diploides tratados e testemunhas, apresentaram uma boa viabilidade (média de 69,3%) de pólen e germinação (49,6), sendo que a viabilidade foi um pouco menor que em outros genótipos diploides avaliados (SOARES et al., 2008), mas os resultados da germinação foram superiores e com o mesmo meio de cultura utilizado. Shepherd (1999) considerou a Lidi parcialmente macho-fertil, com uma fertilidade de pólen de 67%. Em outro estudo a fertilidade da Lidi foi de 49.4% (ADELEKE et al., 2004).

Embora tenham apresentado irregularidades nas duas meioses, os genótipos autotetraploides produzem uma excelente quantidade de grãos de pólen, apresentando boa viabilidade (média de 72%) e germinação *in vitro* (53,5%). Diferentes cultivares tem diferenças de viabilidade e de quantidade total de pólen. As cultivares que tem alta quantidade total de pólen pode conter pólen viável suficiente por antera, mesmo que a porcentagem de pólen viável seja baixa (FORTESCUE et al., 2004).

Portanto, os autotetraploides analisados no presente estudo podem ser testados como doadores de pólen  $2n$  em cruzamentos com diploides melhorados para geração de triploides secundários.

## CONCLUSÃO

Os autotetraploides de Lidi mostraram uma frequência de anormalidades meióticas um pouco maior que os seus diploides originais, entretanto estas não afetaram a percentagem de pólen viável. Portanto, os autotetraploides avaliados neste estudo podem ser utilizados como doadores de gametas  $2n$  no programa de melhoramento genético da bananeira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELEKE, M. T. V.; PILLAY, M.; OKOLI, B. E. Relationships between meiotic irregularities and fertility in diploid and triploid *Musa* L. **Cytologia**, v. 69, p. 387-393, 2004.
- AGARWAL, P. K. Cytogenetical investigations in Musaceae I Meiotic studies in South Indian bananas. **Cytologia**, v. 48, p. 847-852, 1983.
- AMORIM, E.P., SANTOS-SEREJO, J.A., AMORIM, V., FERREIRA, C.F., SILVA, S.O. Banana breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**, v. 986, p. 171-176, 2013.
- BAKER, B. S.; CARPENTER, A. T. C.; ESPOSITO, M. S.; ESPOSITO, R. E.; SANDLER, L. The genetic control of meiosis. **Annual Review of Genetics**, 10: 53-134, 1976.
- BAKRY, F.; REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicine treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, v. 62, p. 3-12, 2007.
- 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.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.). **Genetic and Molecular Biology**, v. 23, p. 681–684, 2000.

CHEESMAN, E. E. Classification of the bananas II. The genus *Musa* L. **Kew Bulletin**, v. 2, p. 106-117, 1947.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. O.; NETO, H. P. S.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 805-813, 2011.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; VENCOSKY, R.; SILVA, S. O.; FIGUEIRA, A. genetic diversity of *Musa* diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 5, p. 723–733, 2004.

DODDS, K. S. Genetic and cytological of *Musa*. V. Certain edible diploids. **Journal of Genetics**, v. 45, p. 113-138, 1943a.

DODDS, K. S. The genetic system of banana varieties in relation to banana breeding. *Empire J. Exp. Agric.* 2: 89-98, 1943b.

DODDS, K.S.; SIMMONDS, N.W. Sterility and parthenocarpy in diploid hybrids of *Musa*. **Heredity**, v.2, p.101-117, 1948.

DOLEZEL, J. Cytogenetic and cytometric analysis of nuclear genome in *Musa*. In JAIN, S. M; SWENNEN, R. (eds.). **Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations**. Science Publishers, Inc., p. 245-249, 2004.

FAURE, S.; BAKRY, F.; GONZÁLEZ, L. D. Cytogenetic studies of diploid bananas. In: GANRY, J. (ed.) **Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests**. Montpellier, France: CIRAD, p. 77–92. International symposium on genetic improvement of bananas for resistance to diseases and pests, 1993, Montpellier, France.

FELISMINO, M, F.; PAGLIARINI, M, S.; VALLE, C. B. Meiotic behavior of interspecific hybrids between artificially tetraploidized sexual *Brachiaria ruziziensis* and tetraploid apomitic *B. brizantha* (Pooaceae). **Scientia Agrícola**, v. 67, n. 2, p. 191-197, 2010.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D. W. Pollen fertility em Musa: viability in cultivars grown in Southern Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, p. 1085-1091, 2004.

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

GOTTSCHALK, W.; KAUL, M. L. H. Asynapsis and desynapsis in flowering plants. **Nucleus**. 17: 133-166, 1980.

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

HIPPOLYTE, I.; BACKRY, F.; SEGUIN, M.; GARDES, L.; RIVALLAN, R.; RISTERUCCI, A-M.; JANNY, C.; PERRIER, X.; CARREL, F.; ARGOUT, X.; PIFFANELLI, P.; KHAN, I.A.; MILLER, R.N.G.; PAPPAS, G.; MBE-GUIE-A-MBE-GUIE, D.; MATSUMOTO, T., BERNARDINIS, V.; HUTTNER, E.; KILIAN, A.; BAURENS, F-C.; D'HONT, A.; COTE, F.; COURTOIS, B.; GLASZMANN, J-C. A saturated SSR/DArT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. **BMC Plant Biology**, v.10, p. 2010. doi: [10.1186/1471-2229-10-65](https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-65).

JERIDI, M.; BAKRY, F.; ESCOUTE, J.; FONDI, E.; CARREL, F.; FERCHICHI, A.; D'HONT, A.; RODIER-GOUD, M. Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. Revealed by genomic *in situ* hybridization. **Annals of Botany**, v. 108, p. 975-981, 2011.

KANCHANAPOOM, K.; KOARAPATCHAIKUL, K. In vitro induction of tetraploid plants from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) 'Kluai Leb Mu Nang' and 'Kluai Sa'. **Euphytica**, v. 183, p. 111-117, 2012.

ORTIZ, R. Occurrence and inheritance of 2n pollen in *Musa*. **Annals of Botany**, v. 79, p. 449-453, 1997.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 997-1002, 2000.

PELOQUIN, S. J; ORTIZ, R. Techniques for introgressing unadapted germplasm to breeding populations. In: STALKER, H. T; MURPHY, J.P. (EDS). **Plant breeding in the 1990s**. UK: CAB International, P. 485-507, 1992.

PERRIER, X.; BAKRY, F.; CARREE, F.; JENNY, C.; HORRY, J. P.; LEBOT, V.; HIPPOLYTE, I. Combining biological approaches to shed light on the evolution of edible bananas. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 7, p. 199–216, 2009.

PIO, L. A. S.; MORAIS-LINO, L. S.; OLIVEIRA, A. C. L.; SILVA, S. O.; PASQUAL, M.; ASMAR, S. A. Técnica de pré-seleção em diploides de bananeira submetidas a duplicação de cromossomos. In: **Anais... XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Natal. 2010. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/872906/1/ID27114pdf710.pdf>.

Acessado em: 29.jan.2013.

RAMIREZ, D. A. 1990. A cytological survey of Philippine bananas. In: JARRET, R. L. Identification of Genetic Diversity in the Genus *Musa*: **Proceedings of an international workshop held at Los Bãnos**, Philippines, 5-10 September, 1988. 92-107.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide statistics: 9.2. Cary: SAS Institute, 2010.

SHEPHERD, K. **Cytogenetics of the genus *Musa***. INIBAP: C, 1999. 154p.

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

SILVA, S. O.; MORAIS-LINO, L.S.; SANTOS-SEREJO, J. A. 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., 2011. p. 61-70.

SILVA, S. O; SOUZA-JUNIOR, M. T.; ALVES, E. J.; SILVEIRA, J. R. S.; LIMA, M. B. Banana Breeding Program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 399–436. 2001.

SIMMONDS, N. W. **The evolution of bananas**. London: Longman, 1962. 170p.

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

SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SEREJO, J. A. S.; SOUZA, A. S.; MORAIS-LINO, L. S.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 111-118, 2008.

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

SYBENGA, J. Cytogenetics in plant breeding. **Monographs on Theoretical and Applied Genetics**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Alemanha/USA, 485p. 1992.

THONNALAK, T.; SILAYOI, B.; PAISOOKSANTIVATANA, Y.; PONGTONGKAM, P. Meiotic behavior in microsporocytes os some banana in Thailand. **Kasetsart Journal (Nature Science)**, v. 44, p. 536-543, 2010.

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

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, p.25-34, 1996.

WILSON, G. B. Cytological studies in the *Musae*. I. Meiosis in some triploid clones. **Genetics**, v. 31, p. 241-258, 1946a.

WILSON, G. B. Cytological studies in the *Musae*. II. Meiosis in some diploids clones. **Genetics**, v. 31, p. 475-482, 1946b.

WILSON, G. B. Cytological studies in the *Musae*. III. Meiosis in some seedlings clones. **Genetics**, v. 31, p. 475-482, 1946c.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais cultivares comerciais de banana são triploides partenocárpicas com diferentes graus de esterilidade, base genética estreita e que produzem pouca ou nenhuma semente, o que dificulta a geração de cultivares resistentes a doenças. O uso de técnicas biotecnológicas, como a indução da duplicação de cromossomos *in vitro* é uma alternativa para se produzir autotetraploides que serão utilizados em cruzamentos com diploides melhorados para geração de triploides secundários.

Os resultados obtidos em plantas oriundas de experimentos de indução de duplicação de cromossomos dos acessos de 'Lidi' demonstraram efeitos claros da poliploidia em muitos caracteres de interesse ao programa de melhoramento genético da bananeira, tais como aumento no diâmetro do pseudocaule, no número de folhas vivas e de frutos, no tamanho de flores, frutos e peso do cacho, além do aumento da quantidade de pólen em comparação aos controles diploides. Essas respostas indicam que plantas com características promissoras podem ser selecionadas.

Por meio da análise do grau de severidade da Sigatoka amarela, pôde se constatar uma alta frequência de materiais resistentes, pois somente três plantas dos tetraploides apresentaram um leve sintoma da doença, diferente das testemunhas diploides, em que todas tiveram algum sintoma no final da colheita. Considerando que esse é um efeito claro da dosagem gênica dobrada em favor dos autotetraploides, é permitido afirmar que a técnica é eficiente e isto tem implicações na busca para se obter novas variedades resistentes a esta doença.

Os resultados da análise citogenética mostram que em autotetraploides de Lidi, a frequência de anormalidades meióticas nas células analisadas não compromete muito a viabilidade do grão de pólen destes materiais, já que a maioria apresentou boa frequência de pólen viável.

A poliploidização artificial em bananeira pode ser utilizada como ferramenta útil para dar suporte ao programa de melhoramento genético dessa cultura, contribuindo na produção de plantas com características agrônomicas desejáveis e permitindo ao melhorista fazer inferências sobre os melhores cruzamentos, onde há uma grande chance de se obter híbridos triploides secundários resistentes a doenças e com frutos de qualidade.

Em relação às possíveis tetraploides também provenientes de indução de duplicação de cromossomos da cv. Ouro, novos estudos devem ser realizados.

Esse trabalho faz parte da estratégia do programa de melhoramento da bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura para geração de novas cultivares com características de interesse, e dentro desta linha de pesquisa outras cultivares diploides têm sido submetidas à indução de duplicação de cromossomos.