

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM BANANEIRA VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES**

VIVIANE PEIXOTO BORGES

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO – 2016**

DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM BANANEIRA VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES

VIVIANE PEIXOTO BORGES

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientadoras: Profª Dra. Daniela Garcia Silveira

Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

Profª Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2016

FICHA CATALOGRAFICA

B732d	<p>Borges, Viviane Peixoto. Duplicação cromossômica em bananeira visando o desenvolvimento de cultivares / Viviane Peixoto Borges. _ Cruz das Almas, BA, 2016. 86f.; il.</p> <p>Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva. Coorientadora: Janay Almeida dos Santos-Serejo.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Banana - Cultivo in vitro. 2.Banana - Melhoramento genético. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Silveira, Daniela Garcia. III.Costa, Maria Angélica Pereira de Carvalho. IV.Título.</p> <p>CDD: 634.772</p>
-------	---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
VIVIANE PEIXOTO BORGES

Membro Presidente: Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva
Instituição: PV / UFRB

Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Leila Aparecida Salles Pio
Instituição: UFLA

Membro Interno do Programa: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Membro Externo à Instituição: Prof. Dr. Edson Perito Amorim
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Lucymeire Souza Moraes Lino
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Homologada em / / .

*Ao meu filho Pedro
Personificação do amor
Luz da minha vida
Fonte de inspiração*

Tudo é por você e para você!

Juntos vencemos,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda, por terem me guiado, iluminado e dado a força necessária para superar todas dificuldades ao longo destes últimos quatro anos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias e aos professores do Doutorado, pela formação acadêmica.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela oportunidade de desenvolver meu experimento com toda infraestrutura necessária. Sinto-me honrada por ter contribuído com o Programa de Melhoramento Genético da Bananeira, um dos mais importantes do mundo.

À Fapesb pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador Sebastião, por ser um exemplo de simplicidade, humildade e alegria. Obrigada pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos, pela disposição para solucionar os problemas e por tornar mais agradável o ambiente acadêmico. Foi um privilégio ser orientada por um dos pesquisadores mais relevantes do melhoramento genético da bananeira.

À minha co-orientadora Janay, por todo apoio relacionado às exigências burocráticas na Embrapa, pelas análises de citometria de fluxo, pelos ensinamentos, pela compreensão com as minhas limitações de horário, palavras de carinho e pelas dicas de mãe.

À minha co-orientadora Daniela pela amizade, carinho e prestatividade, por me ensinar a trabalhar com a cultura de tecidos e me auxiliar na montagem do experimento. Obrigada Dani por me apoiar nos momentos de fraqueza e me fazer crer que tudo daria certo.

À minha co-orientadora Angélica pela amizade e todo apoio durante o período em que desenvolvi meu experimento na UFRB.

Aos meus estagiários Thiago, Alda, Helena e Jamily por toda ajuda nas diferentes etapas do trabalho, sem vocês eu não teria conseguido obter e avaliar 7.500 plantas, muito obrigada!

À Empresa Campo Biotecnologia por ceder a infraestrutura da sala de crescimento artificial quando necessitamos, especialmente a Fernando e Joel pela colaboração.

Ao Bizunga, pessoa querida e especial! Obrigada pelo apoio incondicional na manutenção das plantas e pelo carinho que sempre teve comigo.

Ao Honorato pelas contribuições na montagem do experimento e durante o desenvolvimento das etapas no laboratório e à Fabiana Aud pela simpatia e realização de algumas análises de citometria de fluxo.

À Lucymeire (Meire) por ter me acolhido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa, pelos conhecimentos compartilhados e por ter auxiliado de diversas formas durante a realização do meu trabalho.

À Patrícia Silveira por ter conduzido meu experimento enquanto estive de 'licença maternidade' e contribuído durante todo o período em que estive presente.

Ao Carlos Ledo pelas análises estatísticas, pela solidariedade e compreensão nesta etapa final.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos pela boa convivência e momentos de descontração, em especial à Renata e Lumi pela colaboração.

Aos colegas do Doutorado, em especial, Josi e Nero pela amizade e também pela ajuda na qualificação.

À Banca Examinadora pelas críticas e sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos meus pais Dilson e Nalva pela vida e criação e à minha irmã Valéria por ser um exemplo em minha vida. Agradeço especialmente à minha mãe por ter me ajudado com os cuidados com meu filho, o que permitiu que eu chegasse até aqui. Amo vocês!

Aos demais familiares, principalmente ao meu tio Clovis, por ser um exemplo de profissional, professor e pesquisador, por tudo que me ensinou durante a graduação e continua a ensinar e contribuir.

Às amigas de sempre Marly e Lea, por me apoiarem e torcerem pela minha vitória.

Ao Leonardo pela ajuda, carinho e palavras de incentivo, seu apoio foi valioso nesta reta final.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

Muito obrigada!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
Capítulo 1	
INDUÇÃO DE AUTOTETRAPLOIDES EM BANANEIRA: CARACTERIZAÇÃO IN VITRO	23
Capítulo 2	
PRÉ-SELEÇÃO EM <i>Musa acuminata</i> APÓS INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA IN VITRO	43
Capítulo 3	
CITOMETRIA DE FLUXO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE <i>Musa acuminata</i> APÓS INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
ANEXO.....	84

DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM BANANEIRA VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES

Autora: Viviane Peixoto Borges

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientadoras: Janay Almeida dos Santos-Serejo, Daniela Garcia Silveira, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

RESUMO: A indução de poliploidia é um método promissor que pode ser empregado no melhoramento genético de cultivares estéreis de bananeira. Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação dos antimitóticos amiprofos-metil (APM) e cafeína em plantas de bananeira 'Ouro' (AA), por meio da caracterização morfológica durante o cultivo in vitro e aclimatização; determinar um método prático para pré-selecionar os possíveis poliploides e verificar a eficiência de poliploidização dessas substâncias, comparando-as com a colchicina, o antimitótico tradicionalmente utilizado. As concentrações avaliadas foram: APM 0, 10, 20, 30, 40 e 60 $\mu\text{M L}^{-1}$; cafeína 0, 3, 6, 9 e 12 g L^{-1} e colchicina 2,5 mM L^{-1} (dose comparativa), em dois períodos de exposição, 24 e 48 horas. Em cada tratamento de indução de poliploidia foram utilizados 30 ápices caulinares. Durante o cultivo in vitro, observou-se que as maiores concentrações de APM e cafeína causaram maior mortalidade nos explantes e redução no crescimento. Na fase de aclimatização, foi verificada alta correlação entre a massa fresca foliar e o nível de ploidia das plantas, assim, esse parâmetro foi empregado para pré-selecionar as possíveis autotetraploides. Este método apresentou eficiência de 42,3%, correspondente à proporção de plantas autotetraploides em relação ao total pré-selecionado. A densidade estomática não se mostrou eficiente para diferenciar plantas tetraploides das diploides na fase de aclimatização. Após determinação da ploidia por citometria de fluxo, verificou-se que a colchicina foi o antimitótico que induziu maior proporção de autotetraploides, 54,6 do total pré-selecionado, seguido do APM (40,7%). A cafeína induziu a poliploidia em 9,6% das plantas analisadas, confirmando sua propriedade antimitótica.

Palavras-chave: *Musa acuminata*, cafeína, amiprofos-metil, massa fresca foliar.

CHROMOSOME DOUBLING IN BANANA AIMING AT DEVELOPMENT OF CULTIVARS

Author: Viviane Peixoto Borges

Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-advisors: Janay Almeida dos Santos-Serejo, Daniela Garcia Silveira, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

ABSTRACT: The polyploidy induction is a promising method that can be used in breeding sterile cultivars of banana. The objective of this research was to evaluate the action of antimitotic amiprofos-methyl (APM) and caffeine in Ouro banana (AA) through the morphological characterization during cultivation in vitro and acclimatization; determine a practical method to preselect the possible polyploid and check the efficiency of these substances, comparing them with colchicine, the antimitotic traditionally used. The concentrations tested were: APM 0, 10, 20, 30, 40 and 60 $\mu\text{M L}^{-1}$; Caffeine 3, 6, 9 and 12 g L^{-1} and colchicine 2.5 mM L^{-1} (comparative dose), two periods of exposure of shoot tip, 24 and 48 hours. In each polyploidy induction treatment were used 30 shoot apices. During in vitro culture, it was found that the higher APM concentration and caffeine in explants caused higher mortality and growth reduction. In the acclimatization was verified high correlation between the leaf fresh and the ploidy level, so this parameter was used in the pre-selection, presenting efficiency of 42.3% of tetraploid plants in relation to the preselected total. The stomatal density was not efficient to differentiate tetraploid diploid plants during the acclimatization phase. After determination of ploidy by flow cytometry, it was found that colchicine was antimitotic which induced higher proportion of autotetraploids, 54,6% of the preselected overall, followed by APM (40,7%). Caffeine induced polyploidy in 9,6% of the analyzed plants, confirming have antimitotic property.

Keywords: *Musa acuminata*, caffeine, amiprofos-methyl, leaf fresh weight.

INTRODUÇÃO

A banana é uma importante fonte alimentar para milhões de pessoas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A produção mundial desta fruta no ano de 2013 foi de aproximadamente 106 milhões de toneladas, sendo o Brasil o terceiro maior produtor, com produção de aproximadamente 7,3 milhões de toneladas em uma área cultivada de 503 mil hectares e valor bruto de produção de 1,7 bilhão de dólares anuais (FAO, 2016).

O cultivo da bananeira constitui uma atividade agrícola de relevante papel socioeconômico, por ser feito predominantemente por pequenos e médios produtores e apresentar um fluxo contínuo de produção e renda ao longo do ano.

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta herbácea de grande porte, pertencente a classe das monocotiledôneas, ordem Scitamineae, família Musaceae, subfamília Musoideae e gênero *Musa*. Esse gênero era dividido em quatro subgêneros ou seções: *Eumusa* e *Rhodochlamys* (com $2n = 22$), *Callimusa* e *Australimusa* (com $2n = 20$). Entretanto, com a aplicação de marcadores moleculares foi observada uma estreita relação entre as espécies das seções *Eumusa* e *Rhodochlamys*, e entre as espécies das seções *Callimusa* e *Australimusa* (LI et al., 2010; CHRISTELOVÁ et al., 2011; HIPPOLYTE et al., 2012). Assim, com base em análises de DNA, o gênero *Musa* foi reestruturado em duas seções: *Musa* com 33 espécies, que apresentam número básico de cromossomos igual a 11, engloba as antigas seções *Eumusa* e *Rhodochlamys*, e *Callimusa* com 37 espécies com $n = 10$ e $n = 9$, incorpora a antiga seção *Australimusa* (HÄKKINEN, 2013).

A maioria das espécies cultivadas e de interesse comercial encontra-se na seção *Musa* e compreendem diploides ($2n = 22$), triploides ($2n = 3x = 33$) e tetraploides ($2n = 4x = 44$), que produzem frutos por partenocarpia e originaram-se de hibridações intra e interespecíficas entre duas espécies selvagens seminíferas,

M. acuminata (genoma A) e *M. balbisiana* (genoma B), resultando em genótipos com grupo genômico AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955).

Além dos grupos genômicos, foi estabelecido o termo subgrupo para denominar um conjunto de cultivares que apresentam características comerciais específicas (SHEPHERD et al., 1984). No Brasil, as principais cultivares plantadas são triploides e pertencem ao Grupo AAB, Subgrupo Prata (Prata Anã e Pacovan) e Subgrupo Terra (Terra e Terrinha) para consumo interno, e ao Grupo AAA, Subgrupo Cavendish (Grande Naine, Nanica e Nanicão) tipo exportação. As bananeiras Ouro (AA), Figo Cinza e Figo Vermelho (ABB), Caru Verde e Caru Roxa (AAA), também merecem destaque na bananicultura, apesar de serem plantadas em menor escala (SILVA et al., 2003; DONATO et al., 2009).

Apesar do grande número de cultivares existentes no Brasil, são poucas as que apresentam potencial agrônômico para exploração comercial com alta produtividade, tolerância às pragas e doenças, porte reduzido e menor ciclo de produção (RAMOS et al., 2009). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas cultivares consiste na estratégia a ser utilizada, entretanto existem limitações devido às características genéticas da espécie (esterilidade, triploidia, partenocarpia).

A cultivar Ouro caracteriza-se por possuir pseudocaule de 2,5 m a 4,0 m de altura e 20 cm a 25 cm de diâmetro na base, folhas eretas e cacho com 10 a 12 pencas, com 18 a 24 frutos nas primeiras e 8 a 10 nas últimas. O fruto é pequeno e a polpa é branco-creme ou amarelo-ouro, perfumada e muito doce. Por ser rústica e produzir frutos menores e em menor quantidade em relação às bananeiras triploides, a cultivar Ouro tem pequena importância comercial no Brasil. Possui casca fina e delicada, sendo este um empecilho para a exportação. No entanto, apresenta resistência à sigatoka-negra e frutos de excepcional qualidade para consumo ao natural (SILVA et al., 2016).

Por tais características, a 'Ouro' possui grande potencial para ser explorado no programa de melhoramento genético. Com a indução da duplicação cromossômica, espera-se obter plantas com frutos de alta qualidade, maiores e com maior produção, além de restabelecer a fertilidade para posterior realização de cruzamentos direcionados.

Melhoramento genético da bananeira

O melhoramento genético da bananeira objetiva desenvolver variedades resistentes as sigatokas amarela e negra, ao mal-do-Panamá, ao moko, aos nematoides e à broca-do-rizoma, reduzir o porte da planta, o ciclo da cultura e aumentar a produtividade (SILVA et al., 2001; AMORIM et al., 2013; SILVA et al., 2013).

Os primeiros trabalhos em melhoramento genético da bananeira ocorreram em 1922 em Trinidad e em 1924 na Jamaica, motivados pela ação da murcha do *Fusarium* (mal-do-Panamá), que dizimou as plantações da cultivar Gros Michel na América Central e Jamaica. No início da década de 30, foi sintetizado o primeiro híbrido tetraploide resistente ao *Fusarium* e à sigatoka, a partir do cruzamento do cultivar triploide Gros Michel (AAA) e a espécie selvagem diploide *M. acuminata malaccensis* (AA) (SHEPHERD, 1992).

No Brasil, o programa de melhoramento genético da bananeira foi iniciado no ano de 1983 na Embrapa Mandioca e Fruticultura, com a realização de coleta de germoplasma em nível nacional e internacional e formação do Banco de Germoplasma de Banana (ALVES, 1993). As ações se concentraram principalmente no melhoramento de diploides (AA), seguido do cruzamento destes com triploides AAB, do tipo Prata e Maçã, gerando tetraploides AAAB (SHEPHERD, 1987; AMORIM et al., 2013).

Ao longo destes anos a Embrapa já desenvolveu as seguintes cultivares por meio de hibridação: BRS Caprichosa, BRS Garantida, BRS Japira, BRS Pacovan Ken, BRS Preciosa, BRS Princesa, BRS Tropical, BRS Vitória, BRS Pioneira e BRS Platina. Além dessas cultivares, foram recomendadas a FHIA 01 (BRS Maravilha), BRS Pelipita e BRS Thap Maeo (Mysore) (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2013).

Contudo, o melhoramento genético tradicional apresenta limitações, uma vez que a maioria das cultivares usadas para alimentação são triploides ($2n=3x=33$ cromossomos), apresentam diferentes graus de esterilidade e produzem frutos por partenocarpia (SANTOS-SEREJO, 2006; SILVA et al., 2013).

As dificuldades da hibridação têm levado ao desenvolvimento de novas técnicas de melhoramento, as quais complementam e dão suporte às convencionais. Entre elas, podem-se citar a hibridação somática, a fertilização in

vitro, a mutação, a duplicação de cromossomos e a transformação genética (SILVA et al., 2013).

Importância da poliploidia

A poliploidia, existência de mais de dois genomas completos no núcleo, é um fenômeno de grande importância na evolução das plantas por afetar a constituição genética e o fenótipo do organismo, promovendo a diversificação e especiação (ADAMS e WENDEL, 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2013; HANZL et al., 2014). Os poliploides podem apresentar vantagens fisiológicas (resistência a seca ou a doenças) e boas características de cultivo (florescimento, qualidade pós-colheita), as quais são potencialmente válidas para o sucesso comercial de culturas agrícolas e hortícolas (RIDDLE et al., 2006; XIONG et al., 2006; DHOOGHE et al., 2011).

A poliploidia é generalizada no reino vegetal, mas a sua frequência e os níveis máximos de ploidias variam consideravelmente entre e dentro de diferentes grupos taxonômicos (HUSBAND et al., 2013). Estudos recentes comprovaram que todas as angiospermas, independentemente do tamanho atual do genoma e número de cromossomos, foram afetadas por pelo menos um evento de poliploidia (CORNAI, 2005; JIAO et al., 2011; MCGRATH e LYNCH, 2012; TAYALÉ e PARISOD, 2013).

Os poliploides podem ocorrer de forma espontânea ou serem induzidos artificialmente. A poliploidização espontânea ou natural ocorre a baixas frequências, sendo resultante de variações somáticas durante o cultivo *in vitro*, fusão acidental de protoplastos embriogênicos, endoreduplicação - um ou vários ciclos de síntese de DNA na ausência de mitose, e polispermia - fertilização de um óvulo por mais do que uma célula espermática (JOUBLÈS e CHEVALIER, 2000).

A poliploidização artificial pode ser feita por via somática, mediante a indução da duplicação cromossômica com uso de substâncias antimitóticas, ou de modo sexual, por meio da seleção e cruzamentos de plantas com altas frequências de gametas não reduzidos - gametas com o número somático de cromossomos (SCHIFINO-WITTMANN, 2004; KOHLER et al., 2010).

Poliploidização artificial

A poliploidização artificial ou induzida é uma importante ferramenta para o melhoramento genético vegetal por permitir acelerar etapas e viabilizar o emprego de estratégias que não são possíveis naturalmente (PEREIRA et al., 2012), é aplicável a uma ampla variedade de plantas e objetiva produzir genótipos com características desejáveis (SANFORD, 1983; SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

Embora a duplicação de cromossomos somáticos não introduza um novo material genético e produza apenas cópias adicionais de genes e cromossomos existentes, muitas alterações genômicas ocorrem após a poliploidização (RANNEY, 2006). Geralmente, estas alterações genéticas em culturas poliploides são superiores nos aspectos morfológicos, adaptabilidade genética e tolerância a ambientes estressados (XIONG et al., 2006). As razões para este efeito, ainda que não totalmente esclarecidas, relacionam-se com a herança polissômica, que pode permitir uma melhor resposta às mudanças ambientais pelo aumento na flexibilidade genômica (PARISOD et al. 2010) e pelo aumento global do nível de expressão gênica (OSBORN et al., 2003).

Alguns objetivos podem ser alcançados com a poliploidização: obtenção de plantas mais produtivas, já que poliploides em geral são maiores e mais robustos que seus genitores diploides; possibilidade de ampliação da base genética; obtenção de linhagens em curto espaço de tempo; restauração da fertilidade de híbridos interespecíficos e viabilização de cruzamentos quando os genótipos de interesse apresentam ploidias diferentes (ISHIGAKI et al., 2009; SOUZA-KANESHIMA et al., 2010; PEREIRA et al., 2012). Contudo, existem limitações, a exemplo da toxicidade de agentes antimitóticos, ocorrência de esterilidade, mixoploidia (plantas com células de diferentes ploidias), má formação de plantas, instabilidade genética, dentre outros (RANNEY 2006; ALEZA et al., 2009).

Agentes antimitóticos

Os agentes antimitóticos são substâncias que atuam sobre células em divisão celular, inibindo a formação do fuso mitótico durante a metáfase. Dessa forma, induzem a duplicação cromossômica e, por tal razão, são utilizados em pesquisas de poliploidização.

O mecanismo molecular de ação dos antimitóticos baseia-se na sua afinidade para ligar-se à tubulina, proteína que compõe os microtúbulos, que

constituem o fuso mitótico. Assim, forma-se o complexo antimitótico-tubulina que, além de impedir a polimerização dos microtúbulos do fuso mitótico, perturba a segregação polar normal das cromátides irmãs na anáfase, após a separação do centrômero. Por não haver segregação na anáfase, devido à ausência de fuso mitótico, é esperado que a totalidade do material genético (cromossomos) da célula original ou mãe, nesse momento já duplicado, permaneça no interior do núcleo de uma única célula ao invés de ser distribuído igualmente para duas células-filhas. Como resultado, células com quatro pares de cromossomos idênticos e homólogos em todos os loci são “teoricamente” produzidas e, após sua proliferação já na ausência do antimitótico, originarão sucessivamente células tetraploides (SCHIFINO-WITTMANN, 2004; ALEZA et al., 2009; DHOOGHE et al., 2011; PEREIRA et al., 2012).

A substância tradicionalmente utilizada em trabalhos de poliploidização vegetal é a colchicina, um alcaloide extraído das sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* (EIGSTI e DUSTIN 1955), cujo primeiro relato de uso e eficiência como agente antimitótico data da década de 30 (BLAKESLEE e AVERY, 1937). A colchicina ainda é o antimitótico mais aplicado, extensamente utilizado in vivo e in vitro, especialmente para poliploidização de frutas, legumes e culturas agrícolas (DHOOGHE et al., 2011). No entanto, pode provocar efeitos secundários tais como esterilidade, crescimento anormal, perdas e rearranjos de cromossomos, mutações, além de ser altamente tóxica ao homem devido à sua elevada afinidade com os microtúbulos da célula animal (MOREJOHN et al., 1984; LUCKETT, 1989).

Estas desvantagens, aliadas ao fato da colchicina ligar-se fracamente à tubulina vegetal, necessitando assim de concentrações relativamente elevadas (milimoles), incentivou-se a busca por outros inibidores do ciclo celular, como os herbicidas. Estima-se que cerca de 25% de todos os herbicidas comercializados afetam a mitose como um mecanismo primário de ação, assim estas substâncias passaram a ser avaliadas em pesquisas de poliploidização (DHOOGHE et al., 2011).

Os herbicidas possuem como vantagens a maior afinidade pela tubulina vegetal, o que permite o uso de baixas concentrações (micromoles), e menor toxicidade ao homem (MOREJOHN et al., 1987; QUESENBERRY et al., 2010). Os principais compostos que vêm sendo empregados como agentes antimitóticos são a orizalina, trifluralina e o amiprofos-metil.

Amiprofos-metil (APM) e cafeína

O amiprofos-metil (APM) é um herbicida amido-fosfórico que interage com a tubulina de maneira similar à inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina. Apresenta forte afinidade de ligação com a tubulina vegetal e, portanto, em concentrações muito baixas pode despolimerizar os microtúbulos e bloquear eficientemente as células na metáfase (MOREJOHN e FOSKET 1984; FALCONER e SEAGUL, 1987; SREE RAMULU et al., 1991; PINTOS et al., 2007). O APM é um herbicida de rápida degradação e de baixa toxicidade para mamíferos (BRAHMA e UMESH, 1985).

Há trabalhos de indução de poliploidia utilizando o APM em diversas culturas, como por exemplo: *Allium cepa* (GRZEBELUS e ADAMUS, 2004; FOSCHI et al., 2013; FAYOS et al., 2015), *Beta vulgaris* (HANSEN et al., 2000), *Cucumis melo* var. Makuwa (WANG et al., 2015), *Musa* ssp. (RODRIGUES et al., 2011), *Zea mays* L. (HANTZSCHEL e WEBER, 2010).

A ação da cafeína como indutor de poliploidia se dá pela inibição da formação da parede celular na telófase, o que resulta na produção de células polinucleadas. Nestas células pode ocorrer a fusão dos núcleos, originando células mononucleadas poliploides (KIHLMAN e LEVAN, 1949; GIMÉNEZ-MARTIN et al., 1968). Assim, o tratamento com cafeína ao longo de vários ciclos celulares irá gerar uma população de células com dois ou mais núcleos de ploidia aumentada (ROPER 1976; LIU et al., 1995; THOMAS et al., 1997).

Poucos estudos abordam o uso da cafeína para fins de poliploidização efetiva (THOMAS et al., 1997, SCAGLIUS et al., 2009). A maioria das pesquisas analisam o efeito mutagênico da substância na divisão celular e formação de células polinucleadas (GIMENEZ-MARTIN et al., 1971; KIHLMAN e KRONBORG, 1972; DAVIDSON e ARMSTRONG, 1980; RUIZ e VÁZQUEZ, 1981; MORALES, 2011).

Poliploidização no melhoramento genético da bananeira

A poliploidização na bananeira baseia-se na indução da duplicação cromossômica em diploides promissores (com boas características de frutos), seguida do cruzamento destes autotetraploides com diploides melhorados

(resistentes a pragas), gerando um triploide secundário que apresente resistência a pragas e doenças e potencial comercial (NOVAK, 1992; HAMILL, 1992).

O primeiro estudo de indução artificial de poliploidia em bananeira foi desenvolvido por Vakili (1962) e avaliou aplicação in vivo de colchicina em sementes e plântulas de *Musa balbisiana* sob diferentes estágios de germinação. Os resultados obtidos neste estudo (39% de plantas autotetraploides) demonstraram que a poliploidização artificial tratava-se de um método promissor a ser aplicado no melhoramento genético da bananeira, principalmente devido à esterilidade apresentada pelos cultivares comerciais.

Três décadas após, Hamill et al. (1992) desenvolveram o primeiro protocolo de poliploidização in vitro a partir de ápices caulinares de *Musa acuminata* imersos em soluções de colchicina, e obtiveram 30% de autotetraploides.

O primeiro estudo utilizando um agente antimetabólico alternativo à colchicina para induzir a duplicação cromossômica na bananeira, foi desenvolvido por Van Duren et al. (1996). Ao avaliarem diferentes tratamentos com colchicina e orizalina, os autores verificaram maior formação de autotetraploides e menor número de plantas mixoploides em ápices caulinares tratados com a orizalina.

Posteriormente, foram realizadas outras pesquisas analisando diferentes concentrações, períodos de exposição e formas de aplicação de antimetabólicos em *Musa* spp. (ASIF et al., 2000; GANGA e CHEZHIAN, 2002; CHAI et al., 2004; ROUX et al., 2004; BAKRY et al., 2007; COSTA et al., 2011; PIO et al., 2014). Rodrigues et al (2011), desenvolveram a primeira e, até então, única pesquisa divulgada em periódico científico com uso do APM como agente antimetabólico na bananeira. Foram avaliados dois genótipos diploides de *Musa acuminata* submetidos a duas concentrações de APM (40 e 80 μ M) e três concentrações de colchicina (1,25; 2,5 e 5,0 mM), por 24 e 48 horas de exposição dos ápices caulinares. O tratamento com 40 μ M de APM resultou em 66,7% de plantas tetraploides, sendo mais eficiente que a colchicina.

Não há referências de pesquisas avaliando a capacidade antimetabólica da cafeína na bananeira, sendo este estudo pioneiro nesta abordagem.

Etapas da poliploidização in vitro

Pesquisas de poliploidização *in vitro* são compostas por etapas que necessitam de um planejamento prévio acerca de alguns fatores como: agente antimitótico que será avaliado; concentrações, períodos de exposição e forma de aplicação do antimitótico; tipo de explante; genótipo; número de subcultivos e método de confirmação da ploidia.

A etapa inicial é a aplicação dos tratamentos com a substância antimitótica. Geralmente, soluções com as diferentes concentrações dos antimitóticos são adicionadas ao meio de cultura líquido, onde os explantes são imersos e permanecem sob agitação mecânica durante um tempo de exposição definido. Ao fim do período de aplicação, os explantes são lavados para retirada do excesso da substância e, em seguida, são estabelecidos *in vitro*.

Após o estabelecimento, indica-se a realização de pelo menos três subcultivos, a fim de reduzir a ocorrência de mixoploidia nas plantas regeneradas (ROUX et al., 2004) e aumentar a proliferação de células duplicadas. Em seguida, as brotações são enraizadas e aclimatizadas.

Durante a aclimatização, é possível e, muitas vezes necessário, realizar uma pré-seleção das plantas presumivelmente tetraploides (tetraploides putativos). Esta seleção, normalmente baseia-se em características morfológicas e ou estruturais e tem como objetivo reduzir o número de plantas a serem avaliadas para confirmação da ploidia, minimizando assim, tempo e custos e viabilizando a próxima etapa.

A etapa final corresponde à confirmação da ploidia, que irá determinar a eficiência do protocolo de poliploidização empregado. A determinação da ploidia das plantas pode ser feita por contagem de cromossomos ou pela análise de citometria de fluxo.

Pré-seleção

Plantas poliploides apresentam células e órgãos maiores, o que permite estimar o nível de ploidia por meio da avaliação de características morfológicas (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). Na bananeira, os poliploides apresentam algumas características diferenciadas em relação aos diploides, tais como: folhas arcadas, maior espessura foliar, maior pigmentação nas folhas, crescimento lento, pseudocaule mais espesso, plantas robustas e compactas e maior resistência à

perda de água pelas folhas (BAKRY, 2009; KANCHANAPOOM e KOARAPATCHAIKUL, 2012).

O parâmetro mais referenciado para estimar a ploidia em trabalhos de poliploidização na bananeira é o tamanho e/ou a densidade de estômatos (HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 1996; AZHAR et al., 1998; SUMARDI e WULANDARI, 2010; PIO et al., 2014). Contudo, este método necessita de equipamentos específicos, não sendo muito viável empregá-lo na análise preliminar de centenas ou até milhares de plantas.

Uma estratégia promissora na identificação rápida e prática dos poliploides pode ser aquela baseada na massa fresca foliar, visto estar relacionada com a espessura da folha que, por sua vez, é maior nestas plantas em relação às diploides. Costa (2010) utilizou a massa específica foliar (razão entre o peso seco ou fresco de discos foliares e a área do disco) para estimar a ploidia na bananeira após a poliploidização *in vitro*. Os resultados demonstraram uma boa correlação entre a massa específica e o nível de ploidia das plantas, principalmente considerando-se a massa fresca. Silva et al. (2012) também verificaram que a massa específica com base na massa fresca de discos foliares pode ser utilizada para distinguir diploides dos poliploides em bananeira.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos e organelas) que fluem em uma suspensão líquida (DOLEZEL, 1997). Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (DOLEZEL e BARTOS, 2005).

A partir de poucos gramas de tecido foliar vegetal, é possível obter milhões de núcleos em suspensão em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo e brometo de etídeo) permite ao aparelho (citômetro) estimar a quantidade de DNA, por meio da comparação com amostras de uma espécie utilizada como padrão de referência interno. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o

melhoramento de plantas, incluindo a determinação do tamanho do genoma, avaliação de ploidia, detecção de mixoploidia e aneuploidia, avaliação de ciclo celular, estudo de eliminação cromossômica, separação de células, cromossomos ou organelas e outras aplicações (DOLEZEL e BARTOS, 2005).

A citometria de fluxo apresenta várias vantagens para determinação da ploidia em comparação às contagens cromossômicas. Considerando que, a contagem de cromossomos não pode fornecer uma imagem representativa de uma população heterogênea de células (DOLEZEL et al., 2007), a citometria de fluxo além de determinar a ploidia, permite analisar um grande número de plantas em menor período de tempo, e diferentes tipos de tecidos e células (LEUS et al., 2009).

Diante da importância da poliploidização *in vitro* para o melhoramento genético de cultivares de bananeira e da necessidade de pesquisas na área, este estudo objetivou: avaliar a ação dos antimitóticos amiprofos-metil e cafeína na indução da poliploidia da cultivar Ouro (AA), caracterizando morfologicamente as brotações durante o cultivo *in vitro* e as plantas durante a aclimatização; determinar um método prático e eficaz para realizar a pré-seleção dos possíveis poliploides e verificar, por meio da citometria de fluxo, a eficiência de poliploidização dos antimitóticos avaliados comparando-os com a colchicina, o antimitótico tradicionalmente utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, K.L, WENDEL, J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.135–141, 2005.

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

ALVES, E.J. Programa de melhoramento genético da banana e plátano na Embrapa-CNPMPF: planejamento, implantação e progressos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, v.15, p.83-94, 1993.

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.

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

AZHAR, M. C.; MAK, C.; MOHD NAZIR, B. Polyploidy induction in Pisang Mas, a diploid banana (*Musa* spp). **In: Proceedings of The First National Banana Seminar, Awana Genting, Malaysia, 134-143, 1998.**

BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HORRY, J.P. Genetic Improvement of Banana. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P.M. (Org.). **Breeding plantation tree crops: tropical species**. New York: Springer Science, 2009. p.3-50.

BAKRY, F.; REBERDIERE, N.P. de la; 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.

BLAKESLEE, A.; AVERY, A. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. **The Journal of Heredity** v. 28, p.393-411, 1937.

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

CHAI, M. et al. Biotechnology and *in vitro* mutagenesis for banana improvement. In: JAIN, S. M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular, biology, and induced mutations**. Leuven: Science Publishers, 2004. p. 59-77.

CHRISTELOVÁ, P.; MIROSLAV, V.; HRIBOVÁ, E.; DE ANGHE, E.; DOLEZEL, J. A multi gene sequence-based phylogeny of the Musaceae (banana) family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 1-13, 2011.

CORNAL, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 836-846, 2005.

COSTA F.H.S. **Respostas morfogenéticas de bananeira submetida à poliploidização**. (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras – Lavras. 136 p., 2010.

COSTA F.H.S, PASQUAL M, SILVA, S.O, PEREIRA NETO H., 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.

DAVIDSON, D.; ARMSTRONG, S.W. Cell cycle duration and time of DNA synthesis in binucleate cells induced in *Vicia faba* meristems by caffeine or isobutylmethylxanthine. **Protoplasma**, v.102, p. 28 1-293, 1980.

DHOOGHE, E.; LAERE, K.V.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J.V. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.359-373, 2011.

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

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

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: na overview. In: Dolezel J, Greilhuber J, Suda J (eds) **Flow cytometry with plant cells**. Wiley, Weinheim, pp 41–65, 2007.

DONATO, S.L.R.; ARANTES, A. de M.; SILVA, S. de O. e; CORDEIRO, Z.J.M. Comportamento fitotécnico da bananeira 'Prata-Anã' e de seus híbridos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1608-1615, 2009.

EIGSTI, O.J.; DUSTIN, P. Colchicine. In: **Agriculture, Medicine, Biology, and Chemistry**. Iowa State College Press. Ames, 1955.

FALCONER, M.M.; SEAGULL, R.W.; Amiprofos-methyl (APM): arapid, reversible, anti-microtubule agent for plant cell cultures. **Protoplasma**, v.136, p.118-124, 1987.

FAYOS, O.; VALLÉS, M. P.; GARCÉS-CLAVER, A.; MALLOR, C.; CASTILLO, A. M. Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. **Front. Plant Science**, v. 6, p. 384, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).

The agricultural production. 2013 Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acessado em: 28 de janeiro de 2016.

FOSCHI, M. L.; MARTÍNEZ, L. E.; PONCE, M. T.; GALMARINI, C. R.; BOHANEK, B. Effect of colchicine and amiprofos-methyl on the production of in vitro doubled haploid onion plants and correlation assessment between ploidy level and stomatal size. **FCA UNCUYO**, v.45, n.2, p.155-164, 2013.

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

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

GIMENEZ-MARTIN, G., LOPEZ-SAEZ, J.F.; MORENO, P.; GONZALEZ-FERNANDEZ, A. On the triggering of mitosis and the division cycle of polynucleate cells. **Chromosoma**, v. 25, p. 282-296, 1968.

GIMENEZ-MARTIN, G.; MEZA, I.; DE LA TORRE, C.; GONZALEZ-FERNANDEZ, A., LOPEZ-SAEZ, J.F. Colchicine and caffeine in the estimate of cell-flow and cycle time in *Allium* roots. **Cytologia**, v.36, p. 680-689, 1971.

GRZEBELUS, E.; ADAMUS, A. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. **Plant Science**, v.167, p.569-574, 2004.

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

HÄKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **Taxon**, v. 62, p. 809-813, 2013.

HANSEN, A. L.; GERTZ, A.; JOERSBO, M.; ANDERSEN, S. B. Chromosome doubling in vitro with amiprofos-methyl in *Beta vulgaris* ovule culture. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 50, p. 89-95, 2000.

HANTZSCHEL, K.R.; WEBER, G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. **Protoplasma**, v. 241, p. 91-104, 2010.

HANZL, M.; KOLAR, F.; NOVÁKOVÁ, D.; SUDA, J. Nonadaptive processes governing early stages of polyploid evolution: insights from a primary contact zone of relict serpentine *Knautia arvensis* (Caprifoliaceae). **American Journal of Botany**, v.101, p. 935–945, 2014

HUSBAND, B.C.; BALDWIN, S.J.; SUDA, J. The incidence of polyploidy in natural plant populations: major patterns and evolutionary processes. In LEITCH, I.J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J.F.(eds): **Plant Genome Diversity 2:**

Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes, pp 255–276, Springer, Wien, 2013.

HIPPOLYTE, I.; JENNY, C.; GARDES, L.; BAKRY, F.; RIVALLAN, R.; POMIES, V.; CUBRY, P.; TOMEKPE, K.; RISTERUCCI, A. M.; ROUX, N.; ROUARD, M.; ARNAUD, E.; KOLESNILKOVA-ALLEN, M.; PERRIER, X. Foundation characteristics of edible *Musa* triploids revealed from allelic distribution of SSR markers. **Annals of Botany**, v.109, p. 1-15, 2012.

ISHIGAKI, G. GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multipleshoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, v.55, p.164-170, 2009.

JIAO, Y. WICKETT, N.J.; AYYAMPALAYAM, S.; CHANDERBALI, A.S.; LANDHERR, L. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature** v.473, p. 97–100, 2011.

JOUBÈS, J.; CHEVALIER, C. Endoreduplication in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v.43, p. 735-745, 2000.

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

KIHLMAN, B.A.; KRONBORG, D. Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations. V. The influence of temperature and concentration on the induced aberration frequency in *Vicia faba*. **Hereditas**, v.71, p. 101-118, 1972.

KIHLMAN, B.A.; LEVAN, A. The cytological effect of caffeine. **Hereditas**, v.35, p.109-111. 1949.

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

LEUS, L.; VAN LAERE, K.; DEWITTE, A.; VAN HUYLENBROECK, J. Flow cytometry for plant breeding. **Acta Horticulturae** , v.836, p.221–226, 2009.

LI, L. F. HAKKINEN, M; YUAN, Y. M.;HAO, G; GE, X. J. Molecular phylogeny and systematics of the banana family (Musaceae) inferred from multiple nuclear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to the genus *Musa*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.51, p.1-10, 2010.

LIU, C.M.; JOHNSON, S.; WANG, T.L.; LIU, C.M. *Cyd*, a mutant of pea that alters embryo morphology is defective in cytokinesis. **Developmental Genetics**, v.16, p. 321-331, 1995.

LUCKETT, D. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. **Euphytica**, v.42, p.177-182, 1989.

MCGRATH, C.L.; LYNCH, M. Evolutionary significance of whole-genome duplication. In SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. (eds): **Polyploidy and Genome Evolution**, p. 1–20, Springer, Heidelberg, 2012.

MORALES, F.P. Medición de genotoxicidad cromosómica de meristemas de *Eucalyptus glóbulus labill* inducidas por cafeína y carbetamida. **Revista Científica de Ciencias de la Salud**, v.4, p.97-100, 2011.

MOREJOHN, L.C.; BUREAU, T.E.; MOLEBAJER, J.; BAJER, A.S.; FOSKET, D.E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. **Planta**, v.172, p.252–264, 1987.

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

NOVAK, F.J. *Musa* (banana and plantains). In: HAMMERSCHLAG, F.A; LITS, R.E. (Eds), **Biotechnology of perennial crops**. pp. 449-485. C.A.B. International, Wallingford, U.K. 1992.

OSBORN, T.C.; PIRES, J.C.; BIRCHLER, J.A.; AUGER, D.L.; CHEN, Z.J.; LEE, H.S.; COMAI, L.; MADLUNG, A.; DOERGE, R.W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R.A. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends Genetics**, v.19, p.141–147, 2003.

PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. **New Phytologist**, v.186, p.5–17, 2010.

PEREIRA, R. C.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; TIMBÓ, A. L. O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1278-1285, 2012.

PINTOS, B.; MANZANERA, J.A.; BUENO, M.A. Antimitotic agents increase the productivity of double-haploid embryos from cork oak anther culture. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1595-1604, 2007.

PIO, L.A.S, PASQUAL, M.; SILVA, S.O.; ROCHA, H.S.; MAGALHÃES, H.M.; SANTOS-SEREJO, J.A. Inducing and identifying artificially-induced polyploidy in bananas. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p. 3748-3758, 2014.

QUESENBERRY, K.H.; DAMPIER, J.M.; LEE, Y.Y.; SMITH, R.L.; AEUÑA, C.A. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica** v.175, p. 43-50, 2010.

RAMOS, D. P.; LEONEL, S.; MISCHAN, M. M. Caracterização físico-química dos frutos de genótipos de bananeira produzidos em Botucatu-SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, p. 1.765 -1.770, 2009. Edição especial

RANNEY, T.G. Polyploidy: from evolution to new plant development. **Proceeds of the International Plant Propagators Society**, v.56, p.137–142, 2006.

- RIDDLE, N.C.; KATO, A.; BIRCHLER, J.A. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays* L. **Theoretical Applied Genetics**, v.114, p.101–111, 2006.
- RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; SANTOS, R. R.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 13476-13481, 2011.
- ROPER, W. Nuclear fusion and irregular cytokinesis in binucleate and tetraploid cells of *Vicia faba* after caffeine treatment. **Experientia** (Basel), v.32, p.1260-1262, 1976.
- ROUX, N. S.; STROSSE, H.; TOLOZA, A.; PANIS, B.; DOLEZEL, J. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutant in *Musa* spp. In: JAIN, S. M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular, biology, and induced mutations**. Leuven: Science Publishers, 2004. p. 33-43.
- RUIZ, M. L.; VÁZQUEZ, A. M.; Cell Population Evolution in Tissue Cultures from Embryo Barley (*Hordeum vulgare* L.) After Caffeine Treatment. **Protoplasma**, v.107, p.13-20, 1981.
- SANFORD, J.C. Ploidy manipulations. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (eds) **Methods in fruit breeding**. Purdue University Press, West Lafayette, pp 100–123, 1983.
- 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.
- SCAGLIUS, S.M.; GROSSELLI, D.; RUPPENTHAL, T.E. DEON, A.Z. Estudos preliminares sobre o efeito da cafeína na duplicação cromossômica em plantas

haploides de cevada (*Hordeum vulgare* L.). **Embrapa, documentos Online**, v. 109, 2009.

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

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

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. **Taxonomia e caracterização de cultivares de banana**. Cruz das Almas: Embrapa CNPMF, 1984. 5p.

SILVA, M.R.; SILVA, S. O.; SILVEIRA, D.G.; LINO, L.S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E.P. Estimativa da ploidia de acessos de bananeira pela espessura foliar. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura**, v.1, p. 4696-4699, 2012.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BORGES, A. L. DANTAS, J.L.L. Principais cultivares. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. **O agronegócio da banana**. Embrapa:Brasília, 2016. p.137-170.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.919-931, 2013.

SILVA, S.O.; GASPAROTTO, L.; MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M.; FERREIRA, C. F.; RAMOS, M. M.; JESUS, O. N. **Programa de melhoramento de**

bananeira no Brasil – resultados recentes. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 36 p., 2003.

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

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

SOUZA-KANESHIMA, A.M. SIMIONI, C.; FELISMINO, M.F.; MENDES-BONATO, A.B. Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. **Plant Breeding**, v.129, p.186-191, 2010.

SREE RAMULU, K.; VERHOEVEN, H.A.; DIJKHUIS, P. Mitotic blocking micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofosmethyl and colchicines in potato. **Protoplasma**. v.160, p. 65-73, 1991.

SUMARDI, I.; WULANDARI, M. Anatomy and morphology character of five Indonesian banana cultivars (*Musa* spp.) of different ploidy level. **Biodiversitas**. v.11, p.167-175, 2010.

TAYALÉ, A.; PARISOD, C. Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. In: Stock M, LAMATSCH, D. (eds): Trends in polyploidy research in animals and plants; **Cytogenetic and Genome Research**, v. 140, p.79 – 96, 2013.

THOMAS, J.; CHEN, G.; HOWES, N. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. **Genome**, v.40, p. 552-558, 1997.

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

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.

WANG, K.; HE, L.; YAN, H.; WEI, X. Induction of tetraploidy with antimicrotubule agents in oriental melon (*Cucumis melo* var. Makuwa), **Israel Journal of Plant Sciences**, v.62, p. 198, 2015.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; EMADZADE, K.; JANG, T.-S.; SCHNEEWEISS, G.M. Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. **Cytogenetic and Genome Research**, v.140, p. 137-150, 2013.

XIONG, Y.C.; LI, F.M.; ZHANG, T. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy: root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. **Planta**, v.224, p.710-718, 2006.

CAPÍTULO 1

INDUÇÃO DE AUTOTETRAPLOIDES EM BANANEIRA: CARACTERIZAÇÃO IN VITRO¹

¹Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Pesquisa Agropecuária Brasileira

INDUÇÃO DE AUTOTETRAPLOIDES EM BANANEIRA: CARACTERIZAÇÃO IN VITRO

Autora: Viviane Peixoto Borges

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientadoras: Janay Almeida dos Santos-Serejo, Daniela Garcia Silveira, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

RESUMO: O melhoramento genético convencional de cultivares triploides de bananeira é dificultado devido à esterilidade apresentada em muitos genótipos. A poliploidização in vitro é uma alternativa a ser utilizada na obtenção de triploides secundários, por meio da aplicação de substâncias que inibem a divisão celular (antimitóticos), resultando na duplicação do material genético. Este trabalho objetivou avaliar o efeito dos antimitóticos amiprofos-metil (APM), cafeína e colchicina em ápices caulinares de bananeira 'Ouro' (AA), durante o estabelecimento in vitro e três subcultivos sucessivos. Foram analisados os seguintes tratamentos: APM 0, 10, 20, 30, 40 e 60 $\mu\text{M L}^{-1}$; cafeína 3, 6, 9 e 12 g L^{-1} e colchicina 2,5 mM L^{-1} (dose comparativa), por dois períodos de exposição aos antimitóticos: 24 e 48 horas. O delineamento foi inteiramente casualizado com 15 repetições, cada uma representada por um frasco e dois explantes, num total de 30 explantes por tratamento. Aos 45 dias após o estabelecimento foram avaliadas as variáveis sobrevivência, número de brotos, altura do broto principal e número de raízes. Observou-se alta taxa de mortalidade conforme aumento das concentrações e maior período de exposição ao APM e à cafeína. Os resultados verificados para os parâmetros de crescimento indicaram que as concentrações intermediárias foram as mais promissoras, nos dois tempos de exposição para o APM e em 24 horas para a cafeína. Desordens morfofisiológicas foram observadas em brotações dos tratamentos de colchicina e em algumas concentrações de APM, não ocorrendo nos tratamentos com a cafeína. As maiores concentrações avaliadas de APM (60 $\mu\text{M L}^{-1}$) e cafeína (12 g L^{-1}), afetaram negativamente o desenvolvimento in vitro dos explantes.

Palavras chave: *Musa acuminata*, amiprofos-metil, cafeína, colchicina

AUTOTETRAPLOIDS INDUCTION IN BANANA: IN VITRO CHARACTERIZATION

Author: Viviane Peixoto Borges

Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-advisors: Janay Almeida dos Santos-Serejo, Daniela Garcia Silveira, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

ABSTRACT: The conventional breeding of triploid cultivars of banana is hampered due to sterility presented in many genotypes. The in vitro polyploidization is an alternative to be used to obtain secondary triploid side, through the application of substances which inhibit cell division (antimitotic) resulting in the duplication of genetic material. This study aimed to evaluate the effect of antimitotic amiprofos-methyl (APM), caffeine and colchicine in shoot apexes of banana 'Ouro', during in vitro establishment and three successive subcultures. The following treatments were analyzed: APM 0, 10, 20, 30, 40 and 60 $\mu\text{M L}^{-1}$; Caffeine 3, 6, 9 and 12 g L^{-1} and colchicine 2.5 mM L^{-1} (comparative dose), two periods of exposure to antimitotic 24 and 48 hours. The completely randomized design with 15 repetitions, each represented by a bottle and two explants, a total of 30 explants per treatment. 45 days after the establishment evaluated the survival parameters, number of shoots, main shoot height and number of roots. There was a high mortality rate as increased concentrations and longer period of exposure to APM and caffeine. The results observed for growth parameters indicated that the intermediary concentrations were the most promising in the two exposure times for APM and 24 hours for caffeine. Morphological and physiological disorders were observed in shoots of colchicine treatments and in some APM concentrations, not occurring in the treatments with caffeine. The highest concentrations evaluated APM (60 $\mu\text{M L}^{-1}$) and caffeine (12 g L^{-1}) negatively affected the development of the in vitro explants.

Keywords: Amiprofos-methyl, caffeine, colchicine.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro produtor mundial de banana, com produção de aproximadamente 7,3 milhões de toneladas cultivadas em 503 mil hectares (FAO, 2016). Por apresentarem maior produtividade e qualidade de frutos, as principais cultivares plantadas no país são triploides, e pertencem ao Grupo AAB, Subgrupo Prata (Prata Anã e Pacovan) e Subgrupo Terra (Terra e Terrinha) para consumo interno, e ao Grupo AAA, Subgrupo Cavendish (Grande Naine, Nanica e Nanicão) tipo exportação. Contudo, essas cultivares possuem estreita base genética, a maioria é estéril e suscetível a doenças que causam grandes perdas na produção, como a sigatoka negra e sigatoka amarela (SILVA et al., 2003).

O melhoramento genético convencional da bananeira é baseado no cruzamento de triploides com diploides selvagens ou melhorados (que possuem genes de interesse) e no cruzamento de tetraploides com diploides selvagens ou melhorados (SILVA et al., 2013). Contudo, este método baseado em hibridações é limitado pela ocorrência de esterilidade em materiais de interesse.

Visando contornar tal dificuldade, estão sendo empregadas ferramentas da biotecnologia no desenvolvimento de novas variedades, a exemplo da poliploidização *in vitro*. Esta técnica baseia-se na indução da duplicação cromossômica em diploides promissores, seguida do cruzamento destes autotetraploides com diploides melhorados, gerando um triploide secundário. Desta forma é possível introduzir resistência a doenças nos híbridos gerados, como também obter híbridos triploides secundários com características de fruto semelhantes às variedades de interesse (STOVER e BUDDENHAGEN, 1986; BINSFELD, 2000; SANTOS-SEREJO, 2006, BAKRY et al., 2007; SILVA et al., 2013).

A eficiência da poliploidização depende de diversos fatores, tais como: genótipo avaliado; tipo, concentração, período de exposição e formas de aplicação do agente antimitótico (substância que induz a duplicação cromossômica); condição fisiológica, tipo e manipulação dos explantes (GANGA e CHEZHIAN, 2002; BAKRY et al., 2007; COSTA et al., 2011). As substâncias antimitóticas atuam ligando-se às proteínas que formam as fibras do fuso acromático, denominados tubulinas, impedindo a sua polimerização e conseqüentemente suprimindo a formação das fibras, ou ainda inativando os fusos mitóticos já formados, e assim

não permitem a separação dos cromossomos na anáfase. Consequentemente, as células iniciam o ciclo celular seguinte com a quantidade de DNA duplicado. (GUERRA, 1989; PEREIRA et al., 2012).

O uso de explantes multicelulares como o ápice caulinar, dificulta a atuação homogênea do antimitótico aplicado, devido às camadas de células que recobrem o tecido meristemático. Como não há um protocolo estabelecido de poliploidização em bananeira com o uso de suspensão de células embriogênicas, ao utilizar ápices caulinares faz-se necessário o subcultivo, por pelo menos três vezes, após a indução de poliploidização, com o objetivo de dissociar os autotetraploides estáveis dos mixoploides e diploides (ROUX et al., 2004).

A colchicina é o antimitótico tradicionalmente utilizado em estudos desta natureza, porém, além de apresentar alta toxicidade tanto às plantas quanto ao ser humano, esta substância atua eficientemente somente nas células que estão em divisão. Por não atingir todas as células do material tratado, é comum o aparecimento de mixoploides, crescimento anormal de plantas e ocorrência de esterilidade (CARVALHO et al., 2005). Por tais fatores, tem-se avaliado outros antimitóticos buscando maior eficiência e menor toxidez.

Alguns tipos de herbicidas apresentam capacidade de poliploidização com baixa toxicidade. Um exemplo é o amiprofos-metil (APM), um herbicida amido fosfórico, que vem sendo testado por ser eficaz no bloqueio de células em metáfase (DOLEZEL et al., 1994). Outra substância que está sendo avaliada é a cafeína, que apresenta as vantagens de ser pouco dispendiosa e relativamente não tóxica para as plantas (THOMAS et al., 1997). É importante salientar que há poucos estudos com substâncias alternativas à colchicina, sobretudo com o APM, e não há relatos do uso da cafeína na poliploidização *in vitro* da bananeira.

Desta forma, pesquisas que determinam a ação e eficiência destas substâncias são necessárias para contribuir com o melhoramento genético da bananeira via poliploidização *in vitro*. Este estudo objetivou caracterizar o desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares de bananeira submetidos à poliploidização com os antimitóticos APM, cafeína e colchicina.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas/BA. Foi utilizado o genótipo diploide (AA) Ouro, oriundo do Banco Ativo de Germoplasma de Banana da Embrapa.

Os tratamentos de indução de autotetraploides foram aplicados em ápices caulinares obtidos de brotos micropropagados no segundo subcultivo *in vitro*. Os explantes, com tamanho de um centímetro, foram cortados 4 a 8 mm acima da base e foram removidas algumas bainhas foliares para facilitar a atuação do antimitótico nas células meristemáticas. Os tratamentos constituíram dos antimitóticos: amiprofos-metil - APM (0, 10, 20, 30, 40 e 60 $\mu\text{M L}^{-1}$), cafeína (0, 3, 6, 9, e 12 g L^{-1}) e colchicina (2,5 mM L^{-1}), testados em dois tempos de exposição, 24 e 48 horas. Esta dose de colchicina apresentou bons resultados em estudos de poliploidização na bananeira e servirá como parâmetro de comparação (GANGA e CHEZHIAN, 2002, RODRIGUES et al., 2011).

As soluções de colchicina e cafeína foram preparadas dissolvendo-se as substâncias em água e a de APM em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções foram esterilizadas a frio com uso de filtro Millipore de 45 μm . Para aplicação dos tratamentos, seis explantes foram imersos em 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) líquido, acrescido das soluções dos antimitóticos, num total de cinco frascos e 30 explantes por tratamento. Os explantes permaneceram sob agitação mecânica (120 rpm) durante 24 e 48 horas, em sala de crescimento artificial. Em seguida, foram lavados em água estéril por 24 horas, sob agitação e, posteriormente, foram estabelecidos *in vitro* (dois explantes por frasco).

Após o estabelecimento, foram realizados três subcultivos, mínimo necessário para a redução de mixoploides. Em todas as etapas foi utilizado o meio MS solidificado com 2,4 g L^{-1} de Phytigel® (Sigma-Aldrich), suplementado com 2,5 mg L^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP) e o pH corrigido para $5,8 \pm 0,1$. O meio de cultura (40 mL) foi distribuído em frascos de vidro e em seguida autoclavado por 20 minutos.

Os subcultivos ou ciclos de multiplicação foram realizados em intervalos de 40 a 45 dias, por meio da subdivisão longitudinal das brotações individuais, retirada das partes oxidadas e de raízes existentes, seguido da transferência dos explantes para meio fresco. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento artificial

com fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

As avaliações *in vitro* foram realizadas 45 dias após o estabelecimento sendo analisadas as seguintes variáveis: percentual de sobrevivência, número de brotos, altura do broto principal (cm) e número de raízes. Ao final da etapa do estabelecimento (denominado de 'subcultivo zero') e de cada subcultivo, foi contabilizado o número total de brotos por tratamento.

Os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 15 repetições, cada uma representada por um frasco e dois explantes, num total de 30 explantes por tratamento, sendo: para APM, DIC em esquema fatorial 6×2 , seis concentrações e dois períodos de exposição; para cafeína, DIC em esquema fatorial 5×2 , cinco concentrações e dois períodos de exposição; e para colchicina, DIC com dois períodos de exposição.

Os dados foram submetidos ao teste F da análise de variância e para as médias das concentrações foram ajustados modelos de regressão polinomial, quando possível. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças significativas foram observadas em todas as variáveis analisadas, considerando-se as doses de APM utilizadas e a interação entre dose e o tempo de exposição ao antimetabólito (Tabela 1). Não foi observado efeito do tempo de forma isolada em nenhuma das variáveis.

Para a maioria das variáveis estudadas, não foi possível o ajuste de um modelo de regressão com significado biológico e alto R^2 (Figura 1). Aos 45 dias após indução de poliploidia, os maiores percentuais de sobrevivência dos explantes foram observados na testemunha (ausência de antimetabólito) no tempo de 48 horas (100%) e na concentração de $30 \mu\text{M}$, de APM que apresentou 96,67% e 96,43% de sobrevivência nos períodos de 24 e 48 horas de exposição ao antimetabólito, respectivamente (Figura 1).

Tabela 1. Análise de variância do efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição de ápices caulinares de bananeira 'Ouro' ao amiprofos-metil (APM) na sobrevivência (SOB), número de brotos (NB), altura do broto principal (ALT) e número de raízes (NR).

FV	GL	QM			
		SOB ¹	NB	ALT	Raiz
Tempo	1	0,0585 ^{ns}	0,7968 ^{ns}	0,3536 ^{ns}	1,2048 ^{ns}
Dose	5	2,8656 ^{**}	2,5661 ^{**}	11,8630 ^{**}	55,1875 ^{**}
Tempo x Dose	5	2,2079 ^{**}	1,4217 [*]	9,7997 ^{**}	27,6819 ^{**}
Erro	41	0,2599	0,5536	0,5920	2,6680
CV (%)		29,11	51,40	36,61	43,43
Média Geral		66,01	1,45	2,10	3,76

¹Transformado para $\arcsen \sqrt{(x / 100)}$. ** e * significativo a 1 e 5 %, respectivamente, pelo teste F, ^{ns}não significativo.

De modo geral, não foi possível estabelecer uma relação entre a sobrevivência dos explantes e as doses de APM avaliadas, visto a amplitude dos resultados, não sendo possível, inclusive, ajustar equações de regressão. Contudo, observou-se maior mortalidade quando os explantes foram submetidos a concentrações mais elevadas e maior tempo de exposição aos tratamentos. Estes resultados corroboram com os obtidos por Rodrigues et al. (2011), ao avaliarem a indução de poliploidia na bananeira utilizando o APM, nas concentrações de 40 e 80 μM e exposição por 24 e 48 horas.

Com relação ao número médio de brotos, foi observado um comportamento quadrático para os ápices caulinares tratados por 24 horas. Para 48 horas de exposição, houve uma elevada emissão de brotos na menor dose avaliada (10 μM) em relação à testemunha e demais concentrações. Resultados semelhantes foram verificados por Van Duren et al. (1996), Ganga e Chezhiyan (2002) e Costa et al. (2011) ao avaliarem o uso da orizalina, outro tipo de herbicida, na poliploidização in vitro da bananeira. O aumento no número de brotações em resposta à aplicação do APM, principalmente no tempo de 24 horas de exposição, pode estar relacionado com o fato de que alguns herbicidas inibidores da mitose estimulam o desenvolvimento de plantas quando utilizados em baixas concentrações (GANGA e CHEZHIYAN, 2002).

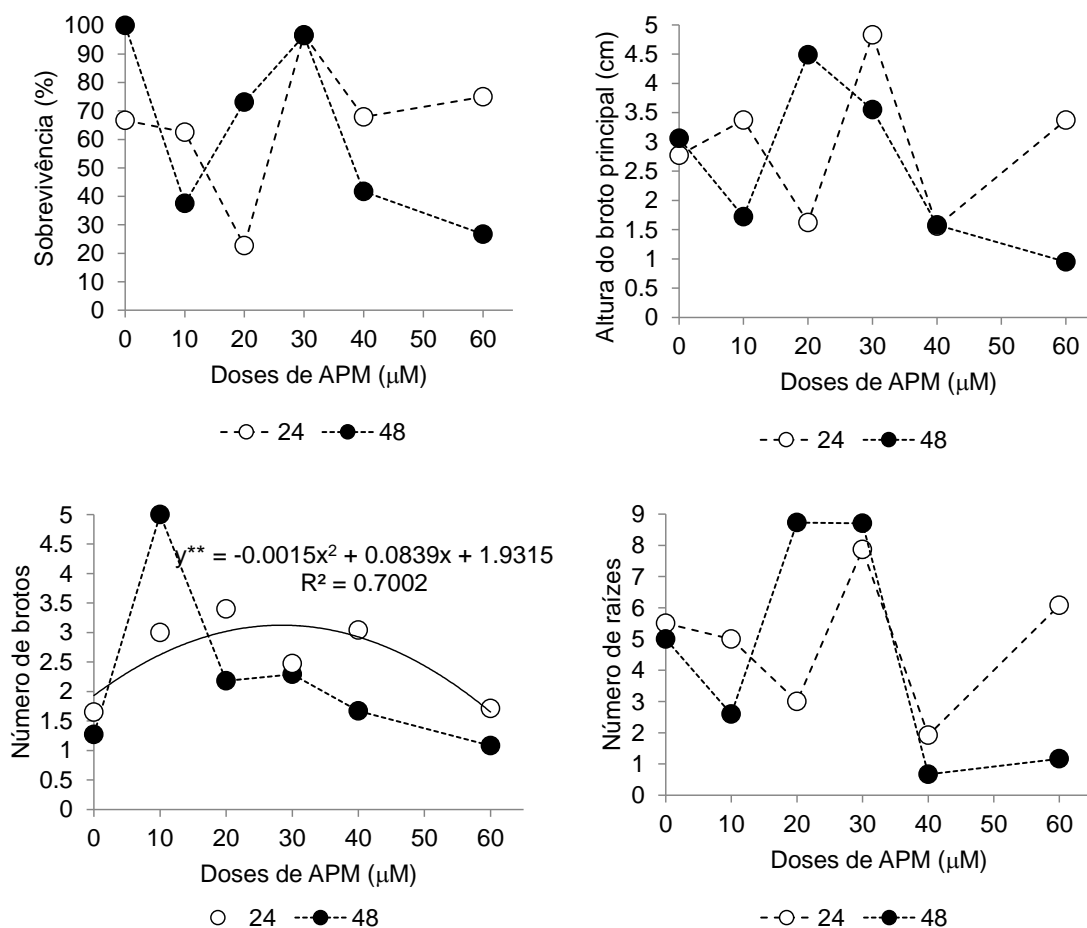


Figura 1. Porcentagem de sobrevivência, número de brotos, altura do broto principal (cm) e número de raízes em ápices caulinares de bananeira 'Ouro', submetidos à poliploidização in vitro com amiprofos-metil (APM), 45 dias após o estabelecimento in vitro.

Para altura do broto principal e número de raízes, resultados satisfatórios foram obtidos nas doses 30 μM de APM para os explantes expostos durante 24 horas, e concentrações de 20 e 30 μM para os explantes submetidos a 48 horas. Observa-se em todos os parâmetros que a combinação maior concentração de APM e maior período de exposição afetou negativamente o desenvolvimento in vitro dos explantes.

No presente trabalho, a indução de poliploidia com APM promoveu diferentes respostas morfofisiológicas, sendo observado que a emissão de folhas e raízes e o crescimento dos explantes foram, ora estimulados (em comparação à testemunha), ora limitados, em função das concentrações e tempo de exposição ao antimetabólito (Figura 2).



Figura 2. Desenvolvimento de ápices caulinares de bananeira 'Ouro' 45 dias após indução de poliploidia com diferentes concentrações de amiprofos-metil (APM) em dois períodos de exposição: 0 $\mu\text{M L}^{-1}$ por 24 h (A) e 48 h (B); 10 $\mu\text{M L}^{-1}$ por 24 h (C) e 48 h (D); 20 $\mu\text{M L}^{-1}$ por 24 h (E) e 48 h (F); 30 $\mu\text{M L}^{-1}$ por 24 h (G) e 48 h (H); 40 $\mu\text{M L}^{-1}$ por 24 h (I) e 48 h (J); 60 $\mu\text{M L}^{-1}$ por 24 h (L) e 48 h (M).

Avaliando-se o uso da cafeína como agente indutor de poliploidia, o primeiro relato na cultura da bananeira, verificou-se interação significativa para os fatores dose e tempo de exposição em todos os parâmetros, exceto número médio de brotos (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância do efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição de ápices caulinares de bananeira 'Ouro' à cafeína na sobrevivência (SOB), número de brotos (NB), altura do broto principal (ALT) e número de raízes (NR).

FV	GL	QM			
		SOB ¹	NB	ALT	Raiz
Tempo	1	3,8921**	0,0080 ^{ns}	23,6828**	6,0940 ^{ns}
Dose	4	1,9592**	0,2237 ^{ns}	8,1321*	30,0481**
Tempo x Dose	4	0,6069*	0,2779 ^{ns}	17,5481**	38,9159**
erro	104 (119 ²)	0,1999	0,1352	2,6628	5,2287
CV (%)		39,45	35,37	42,20	52,19
Média Geral		72,09	1,04	3,87	4,38

¹Transformado para $\arcsen \sqrt{(x/100)}$. ** e * significativo a 1 e 5 %, respectivamente, pelo teste F, ^{ns}não significativo.

Não houve variação significativa para a porcentagem de sobrevivência dos explantes quando submetidos ao tempo de 24 horas, entretanto, em 48 horas de exposição à cafeína, houve uma expressiva redução na sobrevivência conforme aumento das concentrações. A redução na taxa de sobrevivência dos explantes expostos por 48 horas, com o aumento da concentração de 6 g para 9 g, foi de 58,73% mantendo-se o mesmo resultado na concentração de 12 g (Figura 3).

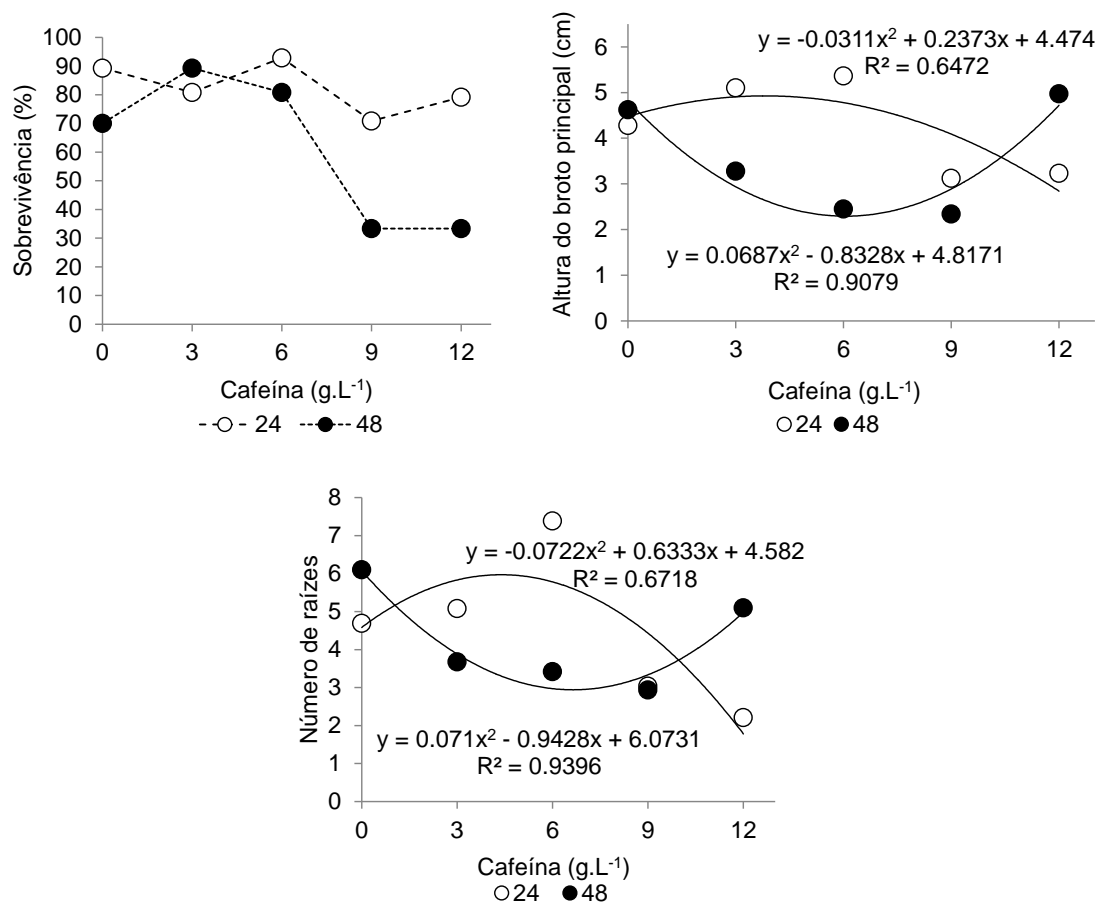


Figura 3. Porcentagem de sobrevivência, altura do broto principal (cm) e número de raízes em ápices caulinares de bananeira ‘Ouro’, submetidos à poliploidização in vitro com cafeína, 45 dias após o estabelecimento in vitro.

O número médio de brotos variou de 0,83 na concentração de 9 g L⁻¹ por 24 h a 1,40 em 12 g L⁻¹ por 48 h, sem haver significância estatística. Para a altura do broto principal e número de raízes, foi possível ajustar equações de regressão, obtendo-se resultados semelhantes entre si, porém, análogos ao observado para a sobrevivência, havendo uma tendência de incremento nestes parâmetros na maior concentração (12 g L⁻¹) por maior tempo de exposição (48 h). Uma possível explicação para esse resultado seria a de que os explantes sobreviventes (33,33%)

não sofreram efetivamente a ação da cafeína nos seus tecidos, visto que o processo de poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, pelos diferentes estágios de divisão em que se encontram (ROTH, 1984)

No geral, as plantas tratadas com cafeína apresentaram aparência e desenvolvimento normal (Figura 4), não sendo observadas anormalidades, como as encontradas nos tratamentos com APM e, principalmente colchicina, a exemplo de raízes rígidas e escurecidas, formação de massa de células não diferenciadas na base dos explantes, não emissão de raízes e ocorrência de multibrotações. Também foi observada menor oxidação nos explantes e no meio de cultura.



Figura 4. Desenvolvimento de ápices caulinares de bananeira 'Ouro' 45 dias após indução de poliploidia com diferentes concentrações de cafeína em dois períodos de exposição: 0 g L⁻¹ por 24 h (A) e 48 h (B); 3 g L⁻¹ por 24 h (C) e 48 h (D); 6 g L⁻¹ por 24 h (E) e 48 h (F); 9 g L⁻¹ por 24 h (G) e 48 h (H); 12 g L⁻¹ por 24 h (I) e 48 h (J).

Estes resultados indicam uma menor fitotoxicidade da cafeína em relação aos demais antimetabólitos avaliados, uma característica desejável, contudo, é preciso considerar se as concentrações utilizadas neste trabalho foram efetivas na indução da duplicação cromossômica em si.

A colchicina é o antimetabólito mais utilizado em pesquisas de poliploidização e, na bananeira, boas taxas de duplicação foram obtidas utilizando-se a concentração de 2,5 mM (GANGA e CHEZHIYAN, 2002, RODRIGUES et al., 2011).

Não ocorreram diferenças significativas nos dois períodos de exposição à colchicina em nenhum dos parâmetros avaliados. Observou-se menor porcentagem média total de sobrevivência dos explantes (50%), em relação ao APM (66%) e cafeína (72%), indicando, conforme esperado, que a colchicina é o antimetabólito que apresenta maior toxicidade aos explantes. A média de brotos por explante foi de 1,95 em 24 h de exposição e 2,25 em 48 h de exposição à colchicina. A altura do broto principal e número de raízes foram, respectivamente, 2,74 cm e 6,50 no tempo de 24 h e 1,85 cm e 3,04 no tempo de 48 h.

As brotações, principalmente aquelas expostas à colchicina por 48 h, apresentaram desenvolvimento anormal, com pouca emissão de folhas e não formação de raízes em várias repetições, enquanto em outras um elevado número dessas estruturas foi observado (Figura 5).

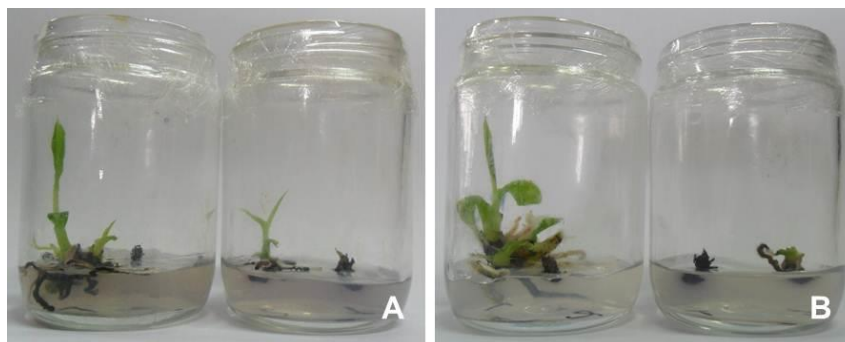


Figura 5. Desenvolvimento de ápices caulinares de bananeira 'Ouro' 45 dias após indução de poliploidia com a concentração de 2,5 mM de colchicina em dois períodos de exposição: 24 h (A) e 48 h (B).

Tais resultados, consequência da fitotoxicidade deste antimetabólito, são frequentemente relatados em estudos de poliploidização. Hamill et al. (1992), citam a ocorrência de crescimento lento, alta taxa de mortalidade, folhas espessas e raízes atrofiadas e grossas em diploides de bananeira tratados com diferentes

concentrações de colchicina. Costa et al. (2011) também relatam desordens morfofisiológicas em ápices caulinares de diploides de bananeira submetidos a poliploidização com colchicina. Sintomas de fitotoxidez também foram verificados em outras espécies, como *Citrus reticulada* e *C. sinensis* (LATADO et al., 2007), *Platanus acerifolia* (LIU et al., 2007) *Allium cepa* (FOSCHI et al., 2013) e *Tagetes erecta* (SAJJAD et al., 2013).

Ao longo dos três subcultivos, foi verificada uma grande proliferação de brotos, a maioria pequenos, com desenvolvimento anormal, sendo comum a ocorrência de uma massa de células não diferenciadas na base destas multibrotações. Essa alta taxa de brotações axilares pode ser explicada pelos níveis de hiperidricidade verificados (Figura 6), já que a baixa hiperidricidade induz uma maior emissão de brotações (VASCONCELOS et al., 2012). A hiperidricidade é caracterizada por caules e folhas túrgidos, espessos, enrugados, torcidos, rígidos, causada por acúmulo anormal de água nas células e tecidos (PICOLI et al., 2001; KEVERS et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2012).

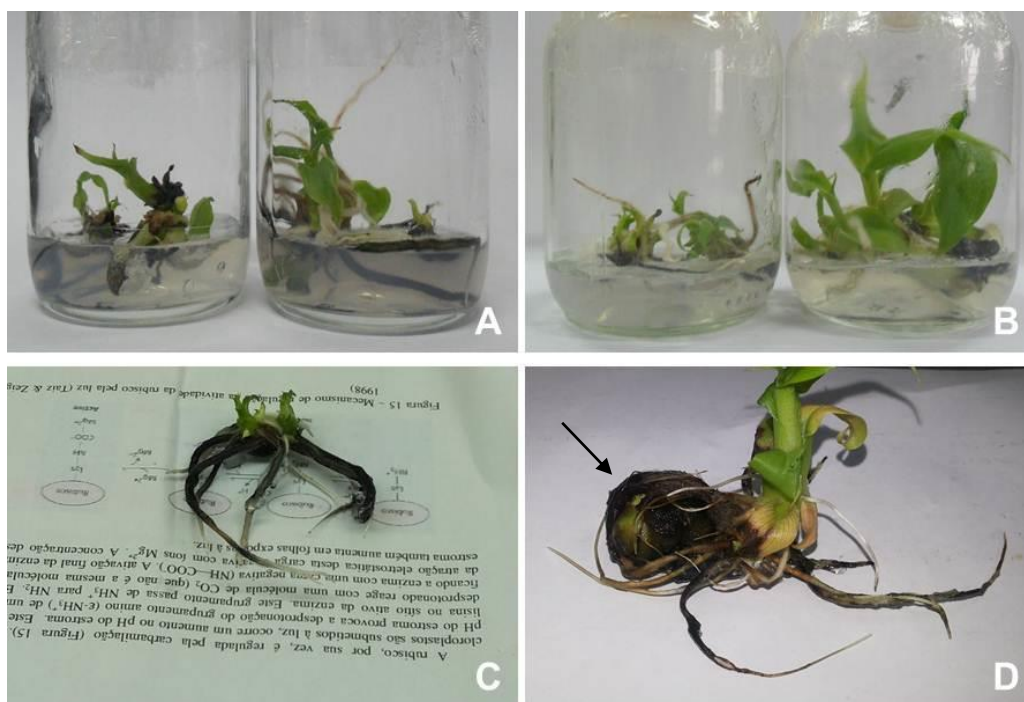


Figura 6. Anormalidades observadas no desenvolvimento de ápices caulinares de bananeira 'Ouro' submetidos à poliploidização. Hiperidricidade em explantes tratados com $40 \mu\text{M L}^{-1}$ de APM por 24 h (A) e $2,5 \text{ mM}$ de colchicina por 48 h (B); raízes rígidas e escuras em brotação do tratamento com $20 \mu\text{M L}^{-1}$ de APM por 24 h (C); Massa de células não diferenciadas em explante tratado com $2,5 \text{ mM}$ de colchicina por 48 h (D).

Na Tabela 4 encontram-se os valores referentes ao número de brotos produzidos em todos os tratamentos avaliados, para cada subcultivo. Observa-se que a partir do primeiro subcultivo (Sub 1), houve aumento no número de brotos em todos os tratamentos, conforme a realização de cada novo subcultivo. É possível verificar comparando-se o número de brotos obtidos ao fim do terceiro subcultivo das diferentes concentrações dos produtos, com o tratamento controle, que tanto o APM quanto a cafeína estimularam a formação de brotos, principalmente nas concentrações mais baixas. Este resultado corrobora com o observado na fase do estabelecimento (Sub 0), conforme discutido anteriormente.

Para os explantes tratados com o APM, houve um expressivo número de brotos ao final do terceiro subcultivo nas concentrações $40 \mu\text{M L}^{-1}$ por 24 horas e $10 \mu\text{M L}^{-1}$ por 48 horas de exposição, com total de 1360 e 1017 brotos respectivamente. Esse valor foi devido à observada ocorrência de um elevado número de explantes anormais que apresentavam multibrotações. Nesses tratamentos, provavelmente formaram-se brotos com diferentes constituições genéticas (mixoploides), que apresentaram desenvolvimento irregular de gemas axilares, por conta de desordens fisiológicas causadas pelo antimitótico, a exemplo do desbalanceamento dos fitohormônios, mais especificamente das citocininas que são as substâncias responsáveis pelo controle dos processos de formação e regeneração de brotos (MAGYAR-TÁBORI et al., 2010).

Nos tratamentos com cafeína, a quantidade de brotos foi muito abaixo da observada com o uso do APM, contudo, foi mais uniforme não havendo uma variação tão destoante entre as concentrações.

Em relação à colchicina, foi possível constatar o quanto o tempo de exposição a esta substância influencia na fisiologia e morfologia dos explantes, visto que a exposição por maior período de tempo, ainda que na mesma concentração, resultou em aumento de 581% no número final de brotos. Esse resultado corrobora a relação entre a ocorrência de plantas anormais e a grande proliferação de brotos, como verificado com o APM, uma vez que no maior tempo de exposição à colchicina, foi observado grande número de explantes com características e desenvolvimento anormais, consequências da fitotoxidez.

Tabela 4: Número de brotos obtidos após indução de poliploidia em bananeira 'Ouro' com os antimitóticos amiprofos-metil (APM, $\mu\text{M L}^{-1}$), cafeína (CAF, g L^{-1}) e colchicina (COL, mM L^{-1}), no estabelecimento (Sub 0) e três subcultivos em intervalos de 45 dias.

Antimitótico	Tempo (horas)	Dose	Nº de brotos			
			Sub 0	Sub 1	Sub 2	Sub 3
APM	24	0	31	38	69	114
APM	24	10	12	24	61	247
APM	24	20	17	82	112	639
APM	24	30	72	91	134	323
APM	24	40	44	98	259	1360
APM	24	60	31	26	37	72
APM	48	0	34	19	29	58
APM	48	10	38	94	198	1017
APM	48	20	43	74	59	100
APM	48	30	56	45	78	164
APM	48	40	6	12	31	146
APM	48	60	9	13	31	93
CAF	24	0	17	11	16	39
CAF	24	3	22	35	36	87
CAF	24	6	32	17	78	282
CAF	24	9	14	15	35	100
CAF	24	12	18	29	45	127
CAF	48	0	14	9	23	77
CAF	48	3	21	34	76	208
CAF	48	6	23	37	61	195
CAF	48	9	9	11	16	47
CAF	48	12	10	18	26	64
COL	24	2,5	25	34	50	186
COL	48	2,5	34	87	280	1268

CONCLUSÕES

Maior taxa de mortalidade é observada conforme aumento das concentrações e maior período de exposição ao APM e à cafeína.

As concentrações de $60 \mu\text{M L}^{-1}$ de APM e 12g L^{-1} de cafeína afetam negativamente o desenvolvimento in vitro dos explantes.

O uso da cafeína como agente antimitótico não causa desordens morfofisiológicas em ápices caulinares de bananeira.

A colchicina proporciona maior fitotoxidez dentre os antimitóticos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKRY, F.; REBERDIERE, N.P. de la; 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.

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

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

COSTA F.H.S, PASQUAL M, SILVA, S.O, PEREIRA NETO H., 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.

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

FAO. **Food and agriculture organization of the United Nations**. Disponível em <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em 27/01/2016.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FOSCHI, M. L.; MARTÍNEZ, L. E.; PONCE, M. T.; GALMARINI, C. R.; BOHANEK, B. Effect of colchicine and amiprophos-methyl on the production of in vitro doubled haploid onion plants and correlation assessment between ploidy level and stomatal size. **FCA UNCUYO**, v.45, p.155-164, 2013.

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

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

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

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: at typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p.181-191, 2004.

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

LIU, G.F.; LI, Z.N.; BAO, M.Z. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. **Euphytica**, v.157, p.145-154, 2007.

MAGYAR-TÁBORI, K.; DOBRÁNSZKI, J.; TEIXEIRA, D.; SILVA, J. A.; BULLEY, S. M.; HUDÁK, I. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.251-267, 2010.

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

PEREIRA, R. C.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; TIMBÓ, A. L. O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v.42, p. 1278-1285, 2012.

PICOLI, E.A.T.; OTONI, W. C.; FIGUEIRA, M. L. Hyperhydricity in in vitro eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, v.160, p.857-868, 2001.

RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; SANTOS, R. R.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 13476-13481, 2011.

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

ROUX, N. S.; TOLOZA, A.; DOLEZEL, J.; PANIS, B. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutant in *Musa* spp. In.: JAIN, S.M.; SWENNEN, R. (Ed.) **Banana improvement: cellular, molecular, biology, and induced mutations**. p. 33-43. 2004.

SAJJAD, Y.; JASKANI, M. J.; MEHMOOD, A. AHMAD, I.; ABBAS, H. Effect of colchicine on in vitro polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). **Pakistan Journal of Botany**, v.45, p. 1255-1258, 2013.

SANTOS-SEREJO, J.A. A introdução de técnicas citomoleculares no melhoramento genético de fruteiras. In: 23 Encontro Sobre Temas de Genética e Melhoramento de Plantas, 2006, Piracicaba. Anais do 23º Encontro Sobre Temas de Genética e Melhoramento de Plantas. v.23. p.22-31, 2006.

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

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.919-931, 2013.

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

THOMAS, J.; CHEN, Q.; HOWES, N. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. **Genome**, v.40, p.552-558, 1997.

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.

VASCONCELOS, A. G. V.; TOMAS, L. F.; CAMARA T. R.; WILLADINA, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v.42, p.837-844, 2012.

CAPÍTULO 2

PRÉ-SELEÇÃO EM *Musa acuminata* APÓS INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA IN VITRO¹

¹Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Euphytica

PRÉ-SELEÇÃO EM *Musa acuminata* APÓS INDUÇÃO DE POLIPLÓIDIA IN VITRO

Autora: Viviane Peixoto Borges

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientadoras: Daniela Garcia Silveira, Janay Almeida dos Santos-Serejo, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

RESUMO: A poliploidização in vitro é uma estratégia que pode ser empregada no melhoramento genético de cultivares estéreis de bananeira. Contudo, apesar de promissora, ainda necessita de um método prático e eficiente de pré-seleção das prováveis plantas tetraploides. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento inicial de plantas submetidas à poliploidização in vitro e determinar se a massa foliar e a densidade estomática são parâmetros eficazes para pré-selecionar plantas autotetraploides de bananeira. Para tal, plantas de bananeira 'Ouro' oriundas de tratamentos de indução da poliploidia com amiprofos-metil (APM), cafeína e colchicina, foram aclimatizadas e avaliadas após 120-150 dias quanto à altura, número de folhas, diâmetro do pseudocaule, massa fresca e seca de disco foliar e densidade estomática. Foi determinada a ploidia, por meio da citometria de fluxo, de uma amostragem de 195 plantas. Como resultado, o único parâmetro que apresentou correlação, posteriormente confirmada estatisticamente, com os níveis de ploidia, foi a massa fresca foliar. Assim, a pré-seleção de todas as plantas obtidas após os tratamentos com os antimitóticos (7.551), foi realizada mediante o valor estabelecido $\geq 0,105$ g de dois discos foliares. Os tratamentos com 2,5 mM de colchicina e 20 μ M de APM, ambos no período de exposição de 48 h, foram os que apresentaram maior proporção de plantas pré-selecionadas. Desordens morfológicas foram observadas durante o crescimento de plantas oriundas dos tratamentos com APM e colchicina. A eficiência de pré-seleção baseada na massa fresca foliar foi de 42,3% de plantas tetraploides do total pré-selecionado. Os resultados indicam que esse é um método promissor por sua praticidade e eficácia, e que deve ser empregado e aperfeiçoado em demais estudos de poliploidização da bananeira.

Palavras chave: Massa fresca foliar, densidade estomática, autotetraploide

PRE-SELECTION IN *Musa acuminata* AFTER IN VITRO POLYPLOIDY INDUCTION

Author: Viviane Peixoto Borges

Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-advisor: Daniela Garcia Silveira, Janay Almeida dos Santos-Serejo, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

ABSTRACT: The in vitro polyploidization is a strategy that can be used in breeding sterile cultivars of banana. However, although promising, still requires a practical and efficient method of pre-selection of the probable tetraploid plants. The objective of this study was to evaluate the initial growth of plants submitted to polyploidy in vitro and determine whether the leaf mass and stomatal density are effective parameters to preselect autotetraploids plant banana. To this end, 'Ouro' banana plants coming from induction treatment of polyploidy with amiprofos-methyl (APM), caffeine and colchicine, were acclimatized and evaluated after 120-150 days for height, number of leaves, pseudostem diameter, fresh and dry weight of leaf disc and stomatal density. It was determined ploidy using flow cytometry, a sample of 195 plants. As a result, the only parameter which correlated subsequently confirmed statistically, with ploidy levels was foliar fresh weight. Thus, the pre-selection of all plants obtained after treatment with antimitotic (7551), was performed using the set value of 0.105 g of the two leaf discs. Treatments with 2.5 mM of colchicine and 20 µM of APM, both in the 48 hours of exposure time, showed the highest proportion of pre-selected plants. Morphological disorders were observed during the growing plants from the treatments with APM and colchicine. The pre-selection methodology efficiency based on fresh leaf mass was 42.3% of tetraploid plants preselected total. The results indicate that this is a promising method for its practicality and effectiveness, and that must be employed and improved in other polyploidization studies of the banana.

Keywords: Leaf fresh mass, stomatal density, autotetraploide.

INTRODUÇÃO

A poliploidização *in vitro* é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de triploides secundários de bananeira resistentes a pragas e com boas características agronômicas (COSTA et al., 2011). A técnica consiste na indução da duplicação cromossômica em diploides promissores, por meio da aplicação de agentes antimitóticos, seguida da obtenção de plantas autotetraploides férteis que, depois de avaliadas e selecionadas no campo, são utilizadas como genitor em cruzamentos com diploides melhorados, originando por fim um triploide secundário (VAN DUREN et al., 1996; GANGA e CHEZHIAN, 2002; BAKRY et al., 2007; SILVA et al., 2013).

Após aplicação dos antimitóticos, geralmente são realizados alguns subcultivos a fim de multiplicar células e tecidos que efetivamente sofreram a duplicação cromossômica, aumentando as chances de obtenção de plantas autotetraploides. Em seguida, é feito o enraizamento *in vitro* das brotações e a aclimatização *ex vitro*. Ao fim destas etapas, um grande número de plantas com diferentes constituições cromossômicas é obtido: diploides, tetraploides e mixoploides (apresentam células com diferentes níveis de ploidia).

A determinação do nível de ploidia em plantas submetidas à duplicação cromossômica pode ser feita por meio da contagem do número de cromossomos em células mitóticas ou meióticas, ou pela citometria de fluxo (SCHIFINO-WITTMANN 2004; OLIVEIRA et al., 2013). Contudo, em se tratando de um elevado número de plantas (centenas ou até mesmo milhares) torna-se indispensável uma forma de pré-selecionar as possíveis poliploides, visto que, a contagem cromossômica é um procedimento laborioso e moroso e a citometria de fluxo requer equipamentos sofisticados, mão de obra especializada e possui elevados custos.

A associação entre o nível de ploidia e as características morfológicas e anatômicas pode auxiliar na separação de poliploides, principalmente porque esses apresentam células e órgãos maiores e geralmente são mais robustos que os diploides (MAGALLANES et al., 1996; SCHIFINO-WITTMANN, 2004; COSTA et al., 2011). Parâmetros como a espessura do limbo foliar, tamanho de células e tamanho e densidade de estômatos podem ser utilizados para estimar a ploidia (HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 1996; GANGA e CHEZHIAN, 2002).

A espessura da folha vem sendo indicada como parâmetro de pré-seleção de plantas poliploides de bananeira (RAMOS, 2012). Esta pode ser mensurada, de forma indireta, com base na massa de discos foliares, por meio da retirada de discos da região mediana do limbo foliar, e posterior pesagem para obtenção da massa fresca e seca (COSTA, 2010). Assim, os poliploides estariam entre os indivíduos com maior massa foliar.

Outra forma indireta de estimativa dos níveis de ploidia é a quantificação da densidade de estômatos. Trata-se de uma técnica rápida, não destrutiva e de baixo custo, com base em uma correlação negativa entre o nível de ploidia e a densidade estomática (RAYBURN et al., 2009; INCEER e HAYIRLIOGLU-AYAZ, 2010; KHAZAEI et al., 2010; FOSCHI et al., 2013).

Considerando o exposto, um método eficiente e prático de pré-seleção de plantas autotetraploides é importante em estudos de poliploidização *in vitro* por permitir a redução significativa no número de plantas a serem analisadas por citometria de fluxo ou contagem de cromossomos, minimizando o tempo e custos a serem empregados na determinação da ploidia. Assim, este trabalho objetivou avaliar o crescimento inicial de plantas de bananeira submetidas à indução de poliploidia *in vitro* e determinar se a massa foliar e a densidade estomática são parâmetros eficazes para pré-selecionar os autotetraploides putativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Poliploidização

A indução de poliploidia foi realizada em ápices caulinares de bananeira 'Ouro' com os seguintes antimetabólitos e concentrações: amiprofos-metil - APM (0, 10, 20, 30, 40 e 60 $\mu\text{M L}^{-1}$), cafeína (0, 3, 6, 9, e 12 g L^{-1}) e colchicina (2,5 mM L^{-1}), em dois períodos de exposição, 24 e 48 horas. Esta dose de colchicina apresentou bons resultados em estudos de poliploidização na bananeira e será utilizada como parâmetro de comparação, visto ser a substância comumente empregada em trabalhos dessa natureza (GANGA e CHEZHIAN, 2002; RODRIGUES et al., 2011). Após o estabelecimento dos explantes tratados, foram realizados três subcultivos e o enraizamento *in vitro*.

Aclimatização

As plantas obtidas (total de 7551) foram transferidas para casa de vegetação e plantadas em tubetes contendo mistura de solo, substrato comercial, vermiculita e areia. Após 20 dias do plantio, as plantas foram transferidas para telado com 50% de sombreamento.

No período de 120 a 150 dias após a transferência para o telado, foram mensuradas em todas as plantas as variáveis altura da planta (cm), tomando-se como base o colo até a inserção da última folha emitida; diâmetro do pseudocaule (cm), com utilização de paquímetro; número de folhas expandidas; massa fresca e seca de dois discos foliares (g).

Para obtenção dos discos foliares, a terceira folha expandida de cada planta (direção ápice base) foi coletada no início da manhã, e colocada em isopor fechado para evitar perda da umidade. Ao fim da coleta diária, o material foi conduzido ao laboratório para determinação, em balança de precisão (0,001 g), da massa fresca de dois discos, retirados da região mediana do limbo foliar, utilizando-se um vazador de 1,75 cm de diâmetro. A massa seca dos discos foliares foi obtida após a secagem em estufa de ventilação forçada (± 65 °C) por 48 horas.

Pré-seleção

Para determinar uma forma prática e eficiente de realizar a pré-seleção dos tetraploides putativos, uma amostra aleatória de 195 plantas foi avaliada quanto a massa fresca e seca de dois discos foliares, densidade estomática e nível de ploidia, mediante a estimativa do conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos confirmaram a relação diretamente proporcional entre a massa fresca foliar e a ploidia, sendo utilizado como parâmetro de corte para pré-selecionar as demais plantas, o valor de 0,105 g (Anexo 1). Assim, após avaliação da altura, número de folhas, diâmetro do pseudocaule e massa fresca e seca foliar, as plantas que apresentaram massa fresca do disco foliar igual ou acima de 0,105 g foram transferidas para sacos de polietileno de 3 L contendo solo, vermiculita e substrato comercial, para posterior confirmação da ploidia por citometria de fluxo. Em todas as plantas pré-selecionadas foi determinada a densidade estomática.

Os dados de crescimento e densidade estomática das plantas pré-selecionadas foram submetidos ao teste F da análise de variância e, para as médias das concentrações, foram ajustados modelos de regressão polinomial. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Análise da densidade estomática

Para determinação da densidade estomática, utilizou-se a técnica de impressão estomática, onde, três fragmentos aleatórios da parte abaxial da mesma folha utilizada para determinação da massa foliar, foram dispostos sobre uma lâmina contendo cola instantânea, durante três minutos. No microscópio óptico foram contabilizados os estômatos em três campos de visão para cada impressão, na área pré-estabelecida de 0,25 mm², totalizando nove contagens por lâmina/planta. Assim, a densidade por mm² foi determinada multiplicando-se as médias das contagens por quatro.

Foram feitas duas avaliações da densidade estomática, a primeira foi realizada no período compreendido entre 120 e 150 dias após a transferência das plantas para o telado e a segunda avaliação foi realizada após um ano, com o objetivo de verificar o comportamento desta variável conforme o crescimento das plantas. As plantas avaliadas foram as da amostra utilizada inicialmente para orientar a forma de pré-seleção. Após um ano, das 195 plantas avaliadas, 105 encontravam-se vivas, sendo 47 diploides, 47 tetraploides e 11 mixoploides. Dessa forma, para análise das duas avaliações foram utilizados somente os dados destas 105 plantas.

Os dados das duas avaliações foram submetidos ao teste F da análise de variância e as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Citometria de fluxo

Para a análise de citometria de fluxo, amostras de folhas jovens de bananeira e do padrão de referência interno *Citrus sinensis* (2C = 0,745 pg) foram trituradas em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação de

núcleos (Dolezel et al., 1989). A suspensão foi filtrada com membrana de 30 μm do filtro Partec CellTrics® e os núcleos foram corados pela adição de 25 μL de solução de 1 mg mL^{-1} de iodeto de propídeo. Foram contabilizados no mínimo 10 mil eventos (núcleos) por amostra no citômetro Attune® Acoustic Focusing (Life Technologies). Os histogramas foram obtidos com o software Atune Cytometric versão 1.2.5. O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 do padrão de referência (*C. sinensis*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de citometria de fluxo estimou-se que, das 195 plantas avaliadas com objetivo de determinar uma forma prática e segura de realizar a pré-seleção dos tetraploides putativos, 139 foram diploides (2x), 48 tetraploides (4x) e 8 mixoploides (2x+4x).

Não foi possível estabelecer uma relação entre a densidade estomática, tampouco entre a massa seca de discos foliares com o nível de ploidia das plantas. Contudo, foi facilmente verificada uma relação entre a ploidia e a massa fresca dos discos foliares, haja vista que, as plantas tetraploides apresentaram valores acentuadamente maiores que as diploides (Anexo 1). Considerando-se que nas plantas tetraploides o menor valor de massa fresca de dois discos foliares encontrado foi de 0,1046 g, utilizou-se como parâmetro de corte o valor de 0,105 g para a pré-seleção.

Visando confirmar tais observações, foi aplicado o coeficiente de correlação de Spearman para determinar o grau de associação entre a ploidia e a massa fresca foliar e a densidade estomática (Tabela 1). Observou-se forte correlação positiva, com alta significância entre a massa fresca e as plantas tetraploides, bem como uma correlação altamente significativa, porém negativa, com as plantas diploides. Este resultado infere que quanto maior a massa fresca foliar, maior a probabilidade da planta ser tetraploide e vice-versa.

Para densidade estomática e ploidia não foi estabelecida uma correlação segundo o coeficiente de Spearman. Este resultado demonstra não haver associação linear entre estas duas variáveis, ou seja, a redução da densidade

estomática não está associada linearmente à ocorrência de indivíduos tetraploides, assim como também não foi significativa a relação de que quanto maior densidade estomática, maior a probabilidade da planta ser diploide.

Tabela 1. Coeficientes de correlação de Spearman entre a probabilidade de ocorrência de plantas de bananeira diploides, tetraploides e mixoploides versus densidades estomática e massa fresca foliar.

	Massa Fresca Foliar	Densidade Estomática
Diploide	-0,7884**	0,3053 ^{ns}
Tetraploide	0,8481**	-0,2084 ^{ns}
Mixoploide	-0,1500 ^{ns}	-0,3061 ^{ns}

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste t de Student. ^{ns}não significativo.

O método mais simples de identificar poliploides é aquele que se baseia na morfologia das plantas, principalmente porque essas apresentam células e órgãos maiores, o chamado “efeito giga” (MAGALLANES et al., 1996; SOUZA e QUEIROZ, 2004). Em bananeira, os poliploides normalmente apresentam folhas arcadas e com limbo mais espesso, maior razão entre largura e comprimento foliar, frutos maiores, plantas robustas e mais compactas e crescimento lento (BAKRY, 2009; KANCHANAPOOM e KOARAPATCHAIKUL, 2012).

Diversos autores citam a densidade estomática como um dos parâmetros morfológicos capazes de inferir sobre o nível de ploidia na bananeira (HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 1996; AZHAR et al., 1998; SUMARDI e WULANDARI, 2010; PIO et al., 2014). Contudo, nestas pesquisas foram realizados testes estatísticos para detectar diferenças entre as médias de densidade estomática encontradas em cada nível de ploidia, ou, foi feita uma estimativa da ploidia com base neste parâmetro e posterior confirmação com citometria de fluxo e/ou contagem de cromossomos. Dessa forma, não há relatos de uso da densidade estomática como método para pré-selecionar plantas presumivelmente tetraploides.

Assim como no presente estudo, Vandenhout et al. (1995), analisaram a correlação entre a densidade estomática e a ploidia de híbridos de bananeira, obtendo-se uma associação significativa negativa, porém, com baixo coeficiente de correlação ($r=-0,49$). Os autores também verificaram que a variabilidade dos

estômatos (tamanho e densidade) é influenciada pelo genótipo, ainda que no mesmo nível de ploidia.

Uma vez que não se encontrou correlação significativa entre a ploidia a densidade estomática, comparou-se as médias desta variável em plantas diploides, tetraploides e mixoploides, em dois períodos do crescimento: aos 120 a 150 dias após aclimatização (DE 1), onde as plantas estavam se adaptando à condição de ambiente externo ao sistema *in vitro* e, portanto, a estrutura foliar estava ainda sendo reorganizada; e um ano após a primeira avaliação (DE 2), onde as plantas já se apresentavam com folhas adaptadas (Tabela 2). Corroborando com a literatura já citada, diferenças significativas foram observadas, sendo que, as plantas diploides apresentam maior número de estômatos por unidade de área (mm^2) que as tetra e mixoploides em ambas avaliações.

Estes resultados demonstram que plantas diploides possuem maior número médio de estômatos em suas folhas em relação às tetraploides e mixoploides, contudo, por não haver uma associação linear entre a ploidia e a densidade estomática, não foi possível estabelecer um valor de referência que permita utilizar, de forma confiável, este parâmetro na pré-seleção das plantas poliploides.

Tabela 2. Densidade estomática (mm^2) de plantas de bananeira ‘Ouro’ após indução artificial da poliploidia, aos 120/150 dias após aclimatização (DE1) e um ano após a primeira avaliação (DE2).

	Densidade Estomática 1	Densidade Estomática 2
Diploide	89,63 a	118,70 a
Tetraploide	75,24 b	97,58 b
Mixoploide	69,74 b	89,05 b

Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Após aplicação dos tratamentos de indução da poliploidia e realização de três subcultivos *in vitro*, foi obtido um número muito elevado de plantas, como ocorre em demais estudos desta natureza, sendo inviável determinar a ploidia de todas, seja por citometria de fluxo ou contagem de cromossomos. Com a realização da etapa de pré-seleção, das 7551 plantas avaliadas, 1276 foram pré-selecionadas tomando-se como referência a massa fresca foliar ($\geq 0,105$ g). Assim, apenas 16,9% das plantas foram consideradas possíveis tetraploides, tornando viável a confirmação da ploidia, ainda que fosse um número relativamente alto de amostras.

A Tabela 3 apresenta o número de plantas pré-selecionadas e o percentual correspondente ao número total de plantas aclimatizadas em cada tratamento. É possível observar que o tratamento com 2,5 mM de colchicina por 48 horas de exposição foi o que apresentou maior número absoluto e proporcional de plantas pré-selecionadas. Por ser a colchicina o antimitótico tradicionalmente utilizado na indução artificial da poliploidia, já era esperada uma maior probabilidade de obtenção de autotetraploides nos tratamentos com esse antimitótico.

Tabela 3. Número de plantas de bananeira 'Ouro' pré-selecionadas com base na massa fresca foliar e percentual correspondente ao total de plantas aclimatizadas após indução da poliploidia com diferentes concentrações dos antimitóticos amiprofos-metil (APM), cafeína e colchicina.

Concentração	N° de plantas pré-selecionadas (% do total aclimatizado)	
	24 h	48 h
APM (μM)		
10	62 (19,8)	112 (11,1)
20	136 (19,9)	29 (31,5)
30	48 (14,2)	39 (13,9)
40	175 (12,1)	31 (21,8)
60	13 (17,1)	62 (25,9)
Cafeína (g)		
3	20 (16,1)	33 (11,2)
6	6 (1,7)	14 (5,5)
9	10 (6,2)	3 (4,4)
12	24 (12,8)	12 (13,6)
Colchicina (mM)		
2,5	48 (18,3)	399 (36,6)

O mecanismo de indução da poliploidia com uso de substâncias tóxicas, ocorre pela capacidade de alguns herbicidas e da colchicina de impedir a polimerização normal dos microtúbulos por meio da formação de complexos com a tubulina, proteína que os constitui (HANSEN et al., 1998). Sem a polimerização dos microtúbulos não há formação do fuso mitótico e, conseqüentemente, não ocorre a separação dos cromossomos metafásicos (BINSFELD et al., 2000). Assim, as desordens ocorridas durante a mitose resultam em algumas plantas com conteúdo genético duplicado, porém, há formação de plantas que apresentam diversas anormalidades durante o crescimento por conseqüência das mutações

cromossômicas. Pela forma de atuação, a dimensão dos efeitos causados pelo uso destas substâncias antimitóticas é amplamente variável.

A Figura 1 apresenta a caracterização das plantas oriundas dos tratamentos com o APM durante a etapa de aclimatização. Não foi possível ajustar equações de regressão com significado biológico em todas as variáveis devido à dispersão dos dados. Para o percentual de sobrevivência, massa fresca e seca de disco foliar e densidade estomática, diferenças significativas foram observadas somente para o fator isolado concentração do antimitótico. Observa-se que, conforme aumento na concentração de APM, a sobrevivência das plantas é reduzida.

Estudos de poliploidização artificial mostram que os agentes antimitóticos em concentrações elevadas e/ou períodos de exposição prolongados causam efeitos tóxicos, gerando grande mortalidade nas plantas tratadas. Nonaka et al. (2011) ao induzirem a duplicação cromossômica em *Lychnis* spp, relataram redução na sobrevivência de plântulas regeneradas conforme aumento da concentração de APM. Foschi et al. (2013) também verificaram redução no percentual de sobrevivência em *Allium cepa*, obtendo, assim como no presente estudo, em torno de 50% de sobrevivência no tratamento com maior concentração de APM.

Para o número de folhas e diâmetro do pseudocaule foram obtidos valores semelhantes nos dois períodos de exposição, sendo observado um incremento nestas variáveis nas concentrações de 40 e 60 $\mu\text{M L}^{-1}$, principalmente em 48 h de exposição. Considerando-se que tais tratamentos causaram maior letalidade, provavelmente as plantas sobreviventes se beneficiaram com a substância, uma vez que, herbicidas inibidores da mitose podem estimular o crescimento vegetal quando utilizados em concentrações baixas (GANGA e CHEZHIYAN, 2002).

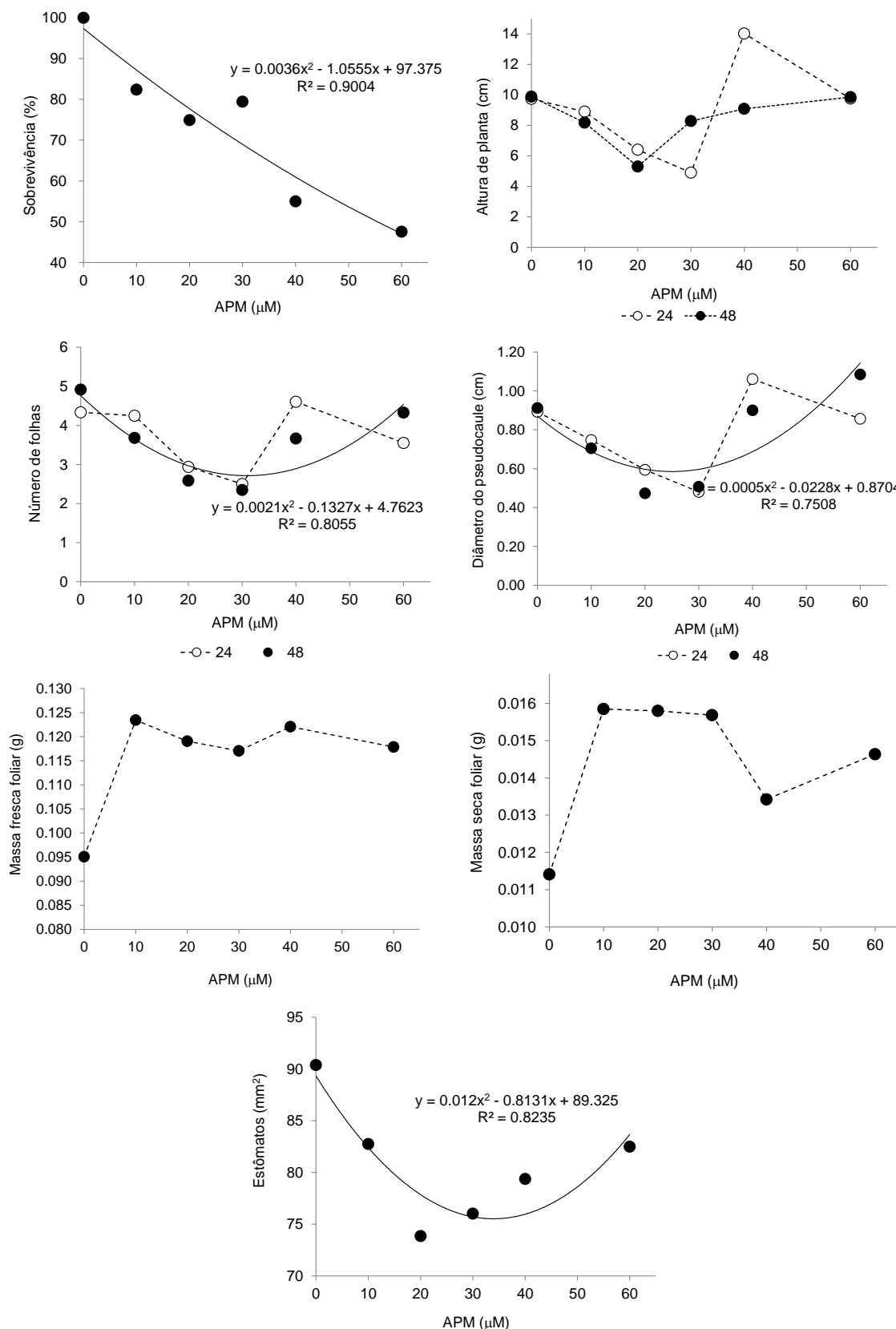


Figura 1. Percentual de sobrevivência, altura de plantas (cm), número de folhas, diâmetro do pseudocaulo (cm), massa fresca foliar (g), massa seca foliar (g) e densidade estomática (mm^2) de plantas de bananeira 'Ouro' submetidas à poliploidização com amiprofos-metil (APM), aos 120/150 dias de aclimatização.

Interação significativa entre os fatores avaliados (concentração x tempo de exposição) foi observada nos tratamentos com cafeína para as variáveis sobrevivência e altura de plantas (Figura 2). Exceto para a concentração de 3 g L⁻¹, os tratamentos com 48 h de exposição apresentaram maior percentual de sobrevivência de plantas durante a aclimatização. Para a altura, diâmetro do pseudocaule e número de folhas, no geral, os resultados obtidos nos tratamentos foram próximos aos observados no controle, indicando não haver uma ação negativa dessa substância no crescimento inicial das plantas.

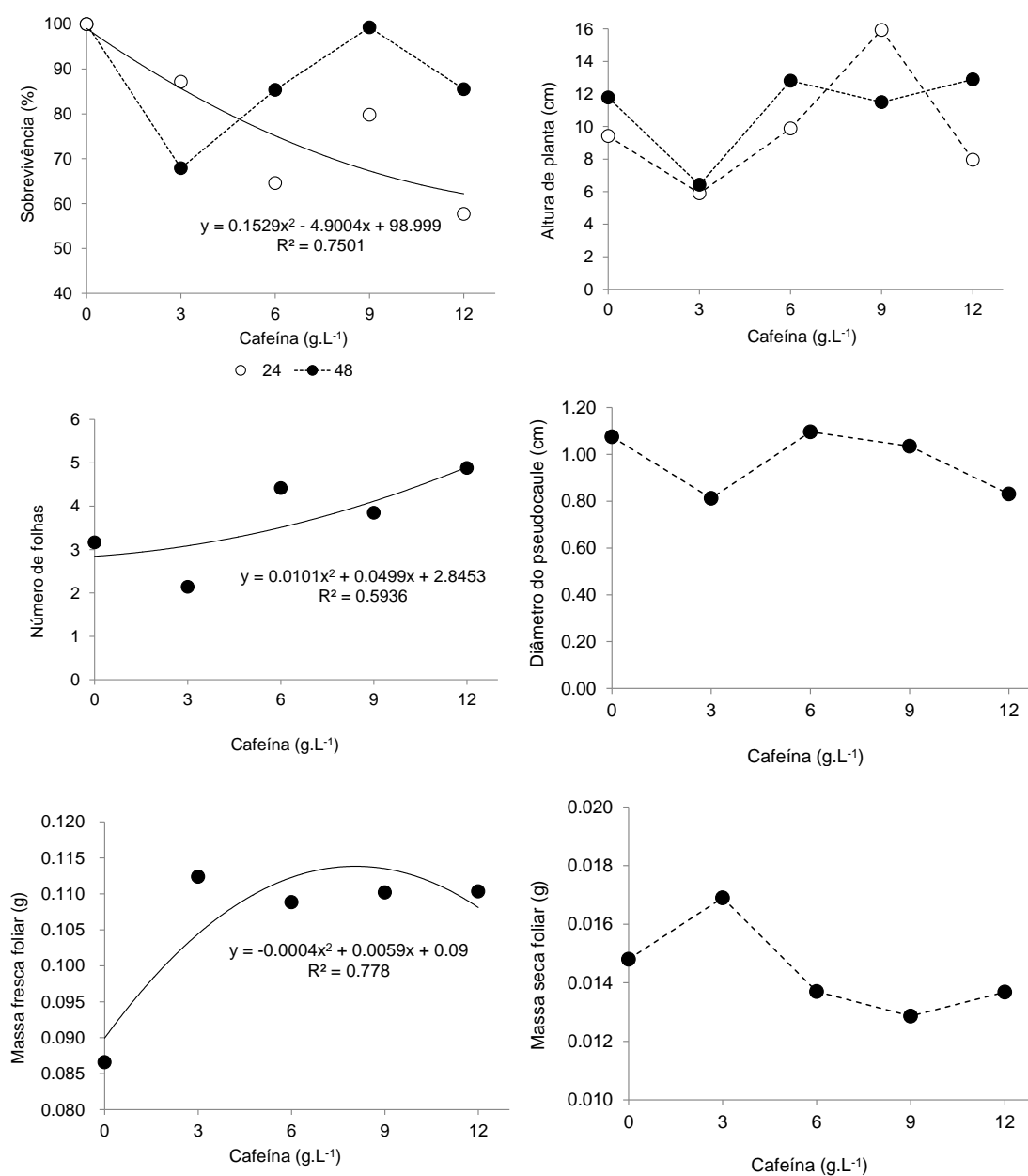


Figura 2. Percentual de sobrevivência, altura de plantas (cm), número de folhas, diâmetro do pseudocaule (cm), massa fresca foliar (g) e massa seca foliar (g) de

plantas de bananeira 'Ouro' submetidas à poliploidização com cafeína, aos 120/150 dias de aclimatização.

De modo geral, as plantas oriundas dos tratamentos com a cafeína apresentaram melhor desenvolvimento, tanto durante a fase de estabelecimento e subcultivos *in vitro*, quanto na aclimatização, em comparação àquelas dos tratamentos com APM e colchicina. Anormalidades observadas com o uso do APM e da colchicina, como deformidades no limbo foliar, aspecto coreáceo das folhas (semelhante a couro e que se quebra facilmente) e arquitetura diferenciada da planta, também foram pouco observadas. Contudo, tais resultados parecem indicar que as concentrações de cafeína utilizadas e/ou o tempo de exposição não foram capazes de causar grandes alterações mitóticas. Inclusive, conforme exposto na Tabela 3, o número de plantas pré-selecionadas foi bastante reduzido em relação aos outros dois antimitóticos.

Para certificar-se que o valor estabelecido para pré-selecionar as plantas também se aplicava aos tratamentos com a cafeína, visto o baixo número de plantas com massa fresca foliar $\geq 0,105\text{g}$, foi feita a determinação da ploidia em 50 plantas que não foram pré-selecionadas, obtendo-se como resultado da citometria de fluxo 100% de plantas diploides.

Para a densidade estomática não foi observada significância estatística para a concentração ou tempo de exposição isolados nem para a interação entre estes fatores. No tempo de 24 h as médias variaram de $74,7\text{ mm}^2$ (0 g L^{-1}) a $96,0\text{ mm}^2$ (9 g L^{-1}) e no período de 48 h de $80,3\text{ mm}^2$ (3 g L^{-1}) a $97,0\text{ mm}^2$ no controle (0 g L^{-1}).

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos no tratamento com 2,5 mM de colchicina nos dois períodos de exposição. Nenhuma das variáveis diferiu estatisticamente entre os dois períodos avaliados, porém, apesar deste resultado, observou-se durante as etapas *in vitro* e a aclimatização, que no tratamento com 48 h de exposição houve grande ocorrência de brotações anormais que resultaram em um elevado número de plantas que também apresentaram características diferenciadas durante a aclimatização, a exemplo de crescimento reduzido, folhas acentuadamente oblongas, folhas com textura coreácea, arquitetura diferenciada e folhas variegadas (Figura 3). Não por acaso, este foi o tratamento que apresentou maior proporção de plantas pré-selecionadas como possíveis tetraploides.

Tabela 4. Percentual de sobrevivência, altura de plantas (cm), número de folhas, diâmetro do pseudocaule (cm), massa fresca foliar (g), massa seca foliar (g) e densidade estomática (mm²) de plantas de bananeira 'Ouro' submetidas à poliploidização com 2,5 mM de colchicina, aos 120/150 dias de aclimatização.

Colchicina	24h	48h
Sobrevivência (%)	58,36 a	64,17 a
Altura de planta (cm)	9,2 a	8,1 a
Nº de folhas	3,3 a	3,8 a
Diâmetro do pseudocaule (cm)	0,98 a	0,87 a
Massa fresca foliar (g)	0,1224 a	0,1196 a
Massa seca foliar (g)	0,0137 a	0,0140 a
Densidade estomática (mm ²)	68,44 a	65,09 a

Letras minúsculas iguais nas linhas não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

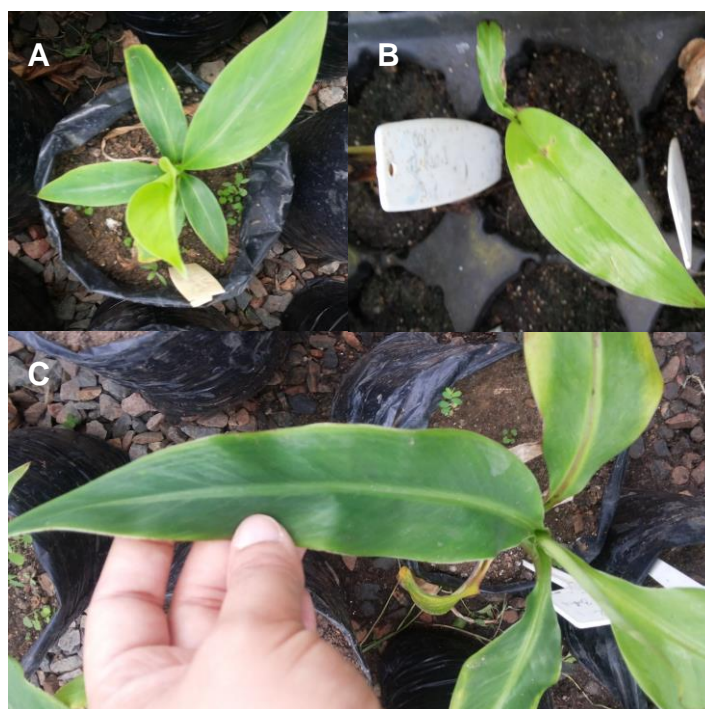


Figura 3. Anormalidades em plantas de bananeira 'Ouro' submetidas a poliploidização. A: arquitetura diferenciada; B: crescimento irregular; C: Folhas variegadas e textura coreácea.

Ao fim das avaliações, das 1276 plantas pré-selecionadas, 771 foram analisadas por citometria de fluxo (número reduzido devido a morte de plantas durante o período de conclusão das etapas da pesquisa e disponibilidade de realização das análises no citômetro). Destas, 326 foram tetraploides, 80 foram consideradas mixoploides e 365 diploides. Considerando-se apenas as plantas tetraploides, a eficiência da forma de pré-seleção empregada foi de 42,3%. Este é um valor expressivo para estudos desta natureza e demonstra que o uso da massa

fresca de discos foliares como parâmetro de pré-seleção de plantas autotetraploides, trata-se de um método bastante promissor pela sua praticidade, por não necessitar de equipamentos sofisticados, pelo resultado imediato e, principalmente, pela eficácia verificada.

CONCLUSÕES

É possível pré-selecionar plantas autotetraploides de bananeira 'Ouro' mediante a massa fresca de discos foliares, sendo este parâmetro altamente correlacionado com a ploidia;

A eficiência do método de pré-seleção baseado na massa fresca foliar é de 42,3%;

A densidade estomática não é um parâmetro eficaz para pré-selecionar plantas autotetraploides de bananeira 'Ouro';

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZHAR, M. C.; MAK, C.; MOHD NAZIR, B. Polyploidy induction in Pisang Mas, a diploid banana (*Musa* spp). **In:** Proceedings of The First National Banana Seminar, Awana Genting, Malaysia, p.134-143, 1998.

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

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

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

COSTA F.H.S.; PASQUAL M, SILVA, S.O.; PEREIRA NETO H.; 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.

DOLEZEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v.31, p.113–120, 1989.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FOSCHI, M. L.; MARTÍNEZ, L. E.; PONCE, M. T.; GALMARINI, C. R.; BOHANEK, B. Effect of colchicine and amiprofos-methyl on the production of in vitro doubled haploid onion plants and correlation assessment between ploidy level and stomatal size. **FCA UNCUIYO**, v.45, p. 155-164, 2013.

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.

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.

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

INCEER, H.; HAYIRLIOGLU-AYAZ, S. Chromosome numbers in Tripleurospermum Sch. Bip. (Asteraceae) and closely related genera: relationships between ploidy level and stomatal length. **Plant Systematics Evolution**. v.285, p.149-157, 2010.

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.

KHAZAEI, H.; MONNEVEUX, P.; HONGBO, S.; MOHAMMADY, S. Variation for stomatal characteristics and water use efficiency among diploid, tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v.57, p. 307-314, 2010.

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, p. 480-484, 1996.

NONAKA, T. E.; OKA, M.; ASANO, S.; KUWAYAMA, H.; TASAKI, D.-S.; HAN, T.; GODO, M.; NAKANO, A. Chromosome doubling of *Lychnis* spp. by in vitro spindle toxin treatment of nodal segments. **Scientia Horticulturae**, v.129, p.832-839, 2011.

OLIVEIRA, A. C. L.; PASQUAL, M. PIO, L. A. S.; LACERDA, W. S.; SILVA, S. O. Utilização da modelagem matemática (redes neurais artificiais) na classificação de autotetraploides de bananeira (*Musa acuminata* Colla). **Bioscience Journal**, v.29, p.617-622, 2013.

PIO, L.A.S, PASQUAL, M.; SILVA, S.O.; ROCHA, H.S.; MAGALHÃES, H.M.; SANTOS-SEREJO, J.A. Inducing and identifying artificially-induced polyploidy in bananas. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p. 3748-3758, 2014.

RAMOS, M. S. **Caracterização física e anatômica de folhas de acessos de bananeira com diferentes ploidias**. Tese (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Cruz das Almas. 71 p., 2012.

RAYBURN, A.; CRAWFORD, J.; CHARLOTTE, M.; RAYBURN, C. M.; JUVIK, J. A. Genome size of three *Miscanthus* species. **Plant Molecular Biology**. v.27, p.184-188, 2009.

RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; SANTOS, R. R.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 13476-13481, 2011.

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

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.919-931, 2013.

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

SUMARDI, I.; WULANDARI, M. Anatomy and morphology character of five Indonesian banana cultivars (*Musa* spp.) of different ploidy level. **Biodiversitas**. v.11, p.167-175, 2010.

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.

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

CAPÍTULO 3

CITOMETRIA DE FLUXO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Musa acuminata* APÓS INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA¹

¹Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Plant Cell, Tissue and Organ Culture.

CITOMETRIA DE FLUXO E CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Musa acuminata* APÓS INDUÇÃO DE POLIPLÓIDIA

Autora: Viviane Peixoto Borges

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-orientadoras: Janay Almeida dos Santos-Serejo, Daniela Garcia Silveira, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

RESUMO: A poliploidização induzida representa uma alternativa que pode ser empregada no melhoramento genético de cultivares estéreis de bananeira, sendo a citometria de fluxo uma técnica eficiente para determinação da ploidia após este processo de indução. Os objetivos deste estudo foram avaliar a eficiência de poliploidização dos agentes antimitóticos amiprofos-metil (APM), cafeína e colchicina na bananeira 'Ouro' (AA), identificar a concentração e tempo de exposição que resultam em maior formação de plantas autotetraploides e avaliar o crescimento inicial das plantas tratadas. Foram utilizadas as seguintes concentrações dos antimitóticos: APM (0, 10, 20, 30, 40 e 60 $\mu\text{M L}^{-1}$), cafeína (0, 3, 6, 9, e 12 g L^{-1}) e colchicina (2,5 mM L^{-1}) em dois períodos de exposição, 24 e 48 horas. Após a realização de uma pré-seleção das plantas tratadas, com base na massa fresca foliar, foi estimado o conteúdo de DNA nuclear em 771 plantas, por meio da citometria de fluxo. A colchicina foi o antimitótico que apresentou maior eficiência de duplicação cromossômica com 54,6% de plantas autotetraploides, seguida do APM (40,7%). A cafeína induziu a poliploidia em 9,6% das plantas analisadas, o que confirma sua propriedade antimitótica, contudo, são necessários estudos complementares para avaliar concentrações mais elevadas dessa substância e ou períodos mais longos de exposição. As concentrações de 10 e 40 $\mu\text{M L}^{-1}$ de APM resultaram em maior número de plantas tetraploides e baixa ocorrência de mixoploidia, demonstrando serem promissoras na poliploidização da bananeira.

Palavras-chave: Amiprofos-metil, cafeína, colchicina.

FLOW CYTOMETRY AND PLANT CHARACTERIZATION OF *Musa acuminata* AFTER POLYPLOIDY INDUCTION

Author: Viviane Peixoto Borges

Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-advisor: Janay Almeida dos Santos-Serejo, Daniela Garcia Silveira, Maria Angelica Pereira de Carvalho Costa

ABSTRACT: The induced polyploidization represents an alternative that can be used in genetic improvement of sterile cultivars of banana, and flow cytometry an efficient technique for determination of ploidy after this induction process. The objectives of this study were to evaluate the polyploidization efficiency of antimetabolic agents amiprofos-methyl (APM), caffeine and colchicine in 'Ouro' banana (AA), identify the concentration and time of exposure that result in increased formation of autotetraploids plants and evaluate the initial growth of the treated plants. The following concentrations of the antimetabolic were used: APM (0, 10, 20, 30, 40 and 60 $\mu\text{M L}^{-1}$), caffeine (0, 6, 3, 9, and 12 g L^{-1}) and colchicine (2.5 mM L^{-1}) in two periods of exposure, 24 and 48 hours. After performing a pre-selection of the treated plants, based on leaf fresh mass was estimated nuclear DNA content in 771 plants by means of flow cytometry. Colchicine was antimetabolic which presents a higher chromosome duplication efficiency with 54.6% of autotetraploids plants, followed by APM (40.7%). Caffeine induced the polyploidy in 9.6% of the analyzed plants, which confirms its antimetabolic property, however, further studies are needed to evaluate higher concentrations of this substance and or longer exposure periods. The concentrations of 10 and 40 $\mu\text{M L}^{-1}$ APM resulted in greater number of tetraploid plants and low occurrence of mixoploidy, proving to be promising in banana polyploidization.

Keywords: Amiprofos-methyl, caffeine, colchicine.

INTRODUÇÃO

A banana, juntamente com o arroz, trigo e o milho, é considerada uma das fontes alimentares mais importantes do mundo (PERRIER et al., 2011). Contudo, poucas cultivares estão disponíveis para exploração comercial com potencial agrônômico, tolerantes às pragas e doenças, e que apresentem frutos com boas características de mercado (SILVA et al., 2013).

De maneira geral, as bananeiras comestíveis são partenocárpicas e estéreis, características que dificultam o melhoramento genético convencional, o que tem levado ao desenvolvimento e emprego de novas técnicas, tais como, indução de mutação, duplicação de cromossomos (poliploidização) e transformação genética (SILVA et al., 2011).

A poliploidização artificial em bananeira foi empregada inicialmente por Vakili (1962), ao utilizar sementes em germinação de *Musa balbisiana* numa solução de colchicina. Hamil et al. (1992), desenvolveram o primeiro protocolo de indução de poliploidização in vitro, resultando na obtenção de autotetraploides estáveis. Esse estudo ampliou as possibilidades de utilização da técnica no melhoramento genético da bananeira e serviu como base para outros trabalhos posteriores (VAN DUREN et al., 1996; GANGA e CHEZHIAN, 2002; BAKRY et al., 2007; COSTA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; PIO et al., 2014).

O processo de poliploidização in vitro inicia com o tratamento do material vegetal com agentes antimitóticos, em seguida são realizados um ou vários ciclos de multiplicação e, por fim, é feita a confirmação da ploidia para medir a taxa de sucesso (DHOOGHE et al., 2011; RÉGO et al., 2011).

Vários métodos podem ser utilizados para determinar a ploidia: contagem de cromossomos, citometria de fluxo e avaliação de parâmetros morfológicos e de anatomia (DHOOGHE et al., 2011). A determinação do nível de ploidia das plantas mediante avaliações cariotípicas, fazendo-se a contagem do número de cromossomos metafásicos, além de ser uma técnica morosa, demanda operadores qualificados, reduzido número de amostras e não fornece uma imagem representativa de uma população heterogênea de células (DOLEZEL et al., 2007; OCHATT et al., 2011).

A citometria de fluxo apresenta várias vantagens em comparação com as contagens cromossômicas por ser um método rápido para o teste de ploidia e permitir a análise de grande número de plantas e de diferentes tipos de tecido.

A análise do conteúdo de DNA nuclear, por citometria de fluxo é baseada no uso de fluorocromos específicos para o DNA e na análise da intensidade de fluorescência do núcleo corado. A intensidade de fluorescência relativa de núcleos isolados de folhas jovens produz um histograma com um pico dominante que corresponde aos núcleos que se encontram na fase G1 do ciclo celular e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G2. Para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G1 de um histograma é comparada com a posição do pico G1 de uma planta padrão, cuja ploidia é conhecida (DOLEZEL, 1991; DOLEZEL 1997).

Este artigo tem como objetivo, determinar a eficiência de indução de poliploidia dos antimitóticos amiprofos-metil e cafeína na bananeira 'Ouro' e caracterizar morfológicamente as plantas conforme o nível de ploidia.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram avaliadas plantas de bananeira 'Ouro' (*Musa acuminata*, AA) regeneradas após a exposição de ápices caulinares a diferentes concentrações dos antimitóticos: APM (0, 10, 20, 30, 40 e 60 $\mu\text{M L}^{-1}$), cafeína (0, 3, 6, 9, e 12 g L^{-1}) e colchicina (2,5 mM L^{-1}) em dois períodos de exposição, 24 e 48 horas. Esta dose de colchicina apresentou bons resultados em estudos de poliploidização de bananeira e servirá como parâmetro de comparação, visto ser a substância comumente utilizada em trabalhos dessa natureza (GANGA e CHEZHIYAN, 2002; RODRIGUES et al., 2011).

Caracterização morfológica

Após a realização de uma pré-seleção feita com base na massa fresca foliar, 771 plantas foram consideradas presumivelmente tetraploides. Nestas plantas foram quantificadas as variáveis, aos 7-12 meses de aclimatização: altura da planta, tomando-se como base o colo até a inserção da última folha emitida;

diâmetro do pseudocaule, com utilização de paquímetro e número de folhas expandidas.

Citometria de fluxo

Para estimar o conteúdo de DNA nuclear das plantas pré-selecionadas (total de 771), foi coletada uma folha de cada planta e retirada uma pequena porção na região mediana. Foram obtidas suspensões nucleares em tampão LB01, utilizando como padrão interno *Citrus sinensis* (2C = 0,745 pg). Para tal, fragmentos de folhas jovens de bananeira e citros foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL do tampão LB01 para a liberação dos núcleos (Dolezel et al., 1989). A suspensão de núcleos foi aspirada, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada com membrana de 30 µm do filtro Partec CellTrics®. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de solução de 1 mg mL⁻¹ de iodeto de propídeo. Em seguida, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Attune® Acoustic Focusing (Life Technologies), utilizado para medir a fluorescência dos núcleos corados, contabilizando no mínimo 10 mil eventos. Os histogramas foram obtidos com o software Atune Cytometric versão 1.2.5.

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

$$\text{DNA amostra} = \frac{G1 \text{ amostra}}{G1 \text{ padrão}} \times \text{DNA padrão, onde:}$$

DNA amostra: conteúdo 2C de DNA nuclear da amostra (pg)

G1 amostra: canal do pico G1 da amostra

G1 padrão: canal do pico G1 de *Citrus sinensis*

DNA padrão; conteúdo 2C de DNA de *Citrus sinensis* (0,745 pg)

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo de DNA nuclear foi quantificado para estimar a ploidia de 771 plantas submetidas à poliploidização *in vitro* e previamente pré-selecionadas como possíveis tetraploides por meio da massa fresca foliar (dados não apresentados). Destas, 413 são oriundas dos tratamentos com amiprofos-metil (APM), 275 dos tratamentos com colchicina e 83 com cafeína.

A Figura 1 apresenta os histogramas com os níveis de ploidia verificados nas plantas avaliadas. Os picos da esquerda correspondem ao padrão de referência utilizado - *Citrus sinensis* - para calcular o conteúdo de DNA das amostras analisadas, e os da direita às amostras de bananeira. Os resultados das análises de citometria de fluxo se resumem em: plantas diploides, com conteúdo 2C de DNA (Fig.1A), plantas tetraploides com 4C de DNA (Fig.1B) e plantas mixoploides que apresentam dois picos, correspondentes aos conteúdos 2C e 4C de DNA (Fig.1C).

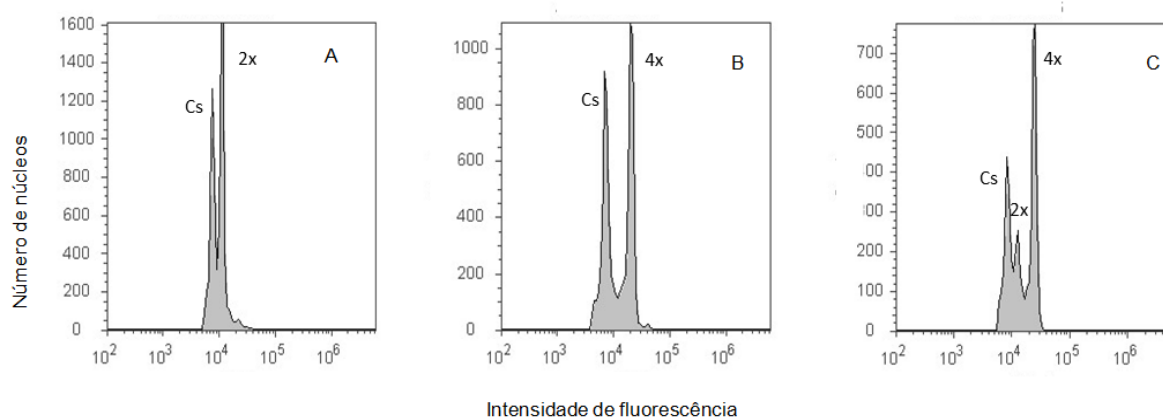


Figura 1. Histogramas obtidos após citometria de fluxo para quantificação do conteúdo de DNA nuclear de amostras de folhas de bananeira 'Ouro' submetidas a indução de poliploidia, utilizando-se *Citrus sinensis* (Cs) como padrão de referência. A - plantas diploides (2x); B - plantas autotetraploides (4x); C - plantas mixoploides (2x+4x).

A colchicina, na concentração de 2,5 mM L⁻¹, foi o antimitótico que promoveu maior formação de plantas autotetraploides (2n=4x=44), com percentual médio total de 54,6%, tendo também apresentado maior proporção de plantas mixoploides (plantas que possuem células e tecidos com diferentes níveis de ploidia) equivalente a 24,7% do total analisado por citometria de fluxo. O APM induziu a formação de 40,7% de plantas tetraploides e a cafeína 9,6% (Figura 2).

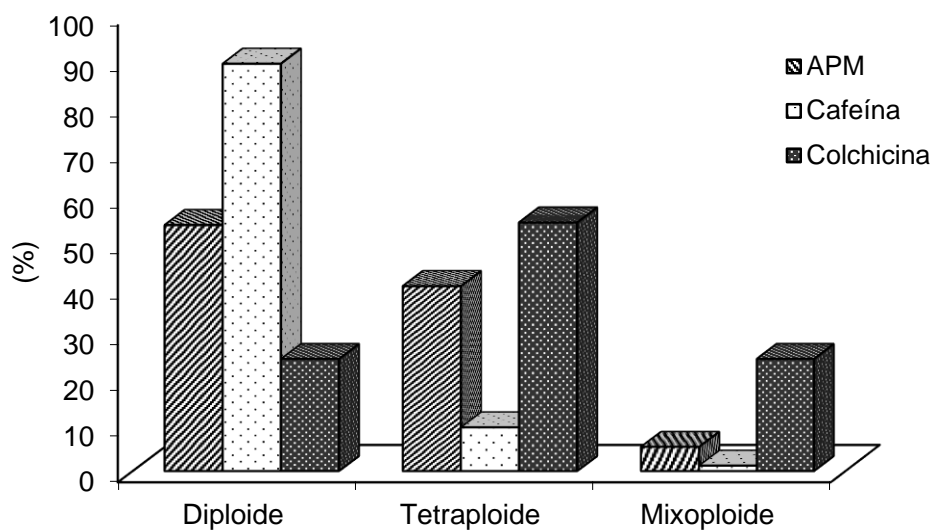


Figura 2. Níveis de ploidia de plantas de bananeira 'Ouro' após indução de poliploidia com os antimitóticos amiprofos-metil (APM), cafeína e colchicina.

A colchicina é o antimitótico mais utilizado na indução de poliploidia em espécies vegetais. Na bananeira, o uso dessa substância para fins de poliploidização foi descrito pela primeira vez por Vakili (1962), mediante a aplicação *in vivo* em plântulas de *Musa balbisiana* sob diferentes estágios de germinação. Verifica-se em outros estudos com a cultura, taxas variáveis de obtenção de autotetraploides com o uso da colchicina: 31,5% na concentração de 0,5% por 2 h (HAMILL et al., 1992); 15,03% utilizando 2,5 mM L⁻¹ por 24 h (GANGA e CHEZHIYAN, 2002); 41,18% com 1,0% de colchicina por 3 h (CHAI et al., 2004) e 50% ao testar 2,5 mM L⁻¹ por 48 h (RODRIGUES et al., 2011).

Apesar da eficiência, a elevada toxidez da colchicina impulsiona a busca por outras substâncias com potencial antimitótico. O APM é um herbicida amido-fosfórico que tem forte afinidade de ligação com a tubulina vegetal e, portanto, em concentrações muito baixas (micromolar) pode despolimerizar os microtúbulos e bloquear eficientemente as células na metáfase (MOREJOHN e FOSKET 1984; FALCONER e SEAGUL, 1987; SREE RAMULU et al., 1991; PINTOS et al., 2007).

O percentual de plantas tetraploides obtido com o uso do APM nesse estudo (40,7%), demonstra notável capacidade antimitótica dessa substância. Apesar da proporção total de autotetraploides ser menor que a da colchicina (54,6%), o APM proporcionou baixa ocorrência de mixoploidia, apenas 5,3%, enquanto que o uso da colchicina resultou em 20,7% de plantas mixoploides.

Em relação à cafeína, é importante destacar a confirmação da capacidade de indução de poliploidia, ainda que pese ter sido obtido um reduzido número de plantas autotetraploides (9,6%). Considerando-se que este é o primeiro estudo avaliando atividade antimitótica da cafeína na cultura da bananeira, os resultados obtidos servirão para orientar novas pesquisas, explorando outras concentrações e/ou períodos de exposição para alcançar maior eficiência de poliploidização.

As proporções de plantas tetraploides e mixoploides para cada concentração dos antimitóticos e tempo de exposição avaliados encontram-se na Tabela 1. Para os tratamentos com o APM, as concentrações de 10 e 40 $\mu\text{M L}^{-1}$ apresentaram os melhores percentuais de plantas tetraploides nos dois tempos de exposição, sendo obtido 65,4% de tetraploides na dose de 40 $\mu\text{M L}^{-1}$ em 48 h. Os resultados mostram que, mesmo em baixas concentrações, o APM proporciona uma satisfatória taxa de poliploidização, indicando bom potencial de uso dessa substância no programa de melhoramento genético não convencional da bananeira.

Em relação à ocorrência de mixoploidia, todas as plantas classificadas como mixoploides apresentaram constituições genômicas $2x+4x$. Nos tratamentos com APM, houve pouca ocorrência de plantas mixoploides, sendo os maiores percentuais observados na concentração de 30 $\mu\text{M L}^{-1}$ em ambos os períodos de exposição. Nonaka et al. (2011), ao avaliar as concentrações de 1, 5 e 10 mg L^{-1} de APM por 24 h para induzir a duplicação cromossômica em *Lychnis senno*, também encontraram uma baixa taxa de mixoploides (7,69%), entretanto, diferente do presente estudo, a taxa de poliploidização foi de apenas 2,56%. Nimura et al (2006), analisando a poliploidização em um híbrido de *Dianthus caryophyllus* \times *D. japonicus*, obtiveram de 25% a 70% de mixoploides com as concentrações de 5; 10 e 20 mg L^{-1} de APM por 24 h e 5% de plantas tetraploides.

Na bananeira há somente um relato na literatura de utilização do APM para fins de duplicação cromossômica, onde, Rodrigues et al. (2011) encontraram de 18,8% a 66,67% de autotetraploides com as concentrações de 40 e 80 $\mu\text{M L}^{-1}$ e tempos de exposição de 24 h e 48 h, contudo, o número de repetições neste estudo foi menor que o analisado na presente pesquisa.

Tabela 1. Percentual e número correspondente de plantas diploides, tetraploides e mixoploides de bananeira 'Ouro' após indução de poliploidia com os antimitóticos amiprofos-metil (APM), cafeína e colchicina.

Concentração	Diploides (N° de plantas)		Tetraploides (N° de plantas)		Miploides (N° de plantas)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
APM (μM)						
10	49,0 (26)	50,0 (25)	47,2 (25)	46,0 (23)	3,8 (2)	4,0 (2)
20	67,6 (25)	88,9 (8)	27,0 (10)	11,1 (1)	5,4 (2)	0,0 (0)
30	62,5 (20)	61,5 (8)	25,0 (8)	15,4 (2)	12,5 (4)	23,1 (3)
40	41,7 (55)	34,6 (9)	53,8 (71)	65,4 (17)	4,5 (6)	0,0 (0)
60	60,0 (6)	80,4 (41)	40,0 (4)	13,7 (7)	0,0 (0)	5,9 (3)
Cafeína (g)						
3	100,0 (12)	90,0 (9)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	10,0 (1)
6	100,0 (5)	100,0 (14)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
9	100,0 (8)	50,0 (1)	0,0 (0)	50,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)
12	81,0 (17)	72,7 (8)	19,0 (4)	27,3 (3)	0,0 (0)	0,0 (0)
Colchicina (mM)						
2,5	4,8 (1)	26,4 (67)	90,4 (19)	51,6 (131)	4,8 (1)	22,0 (56)

Em relação aos resultados alcançados utilizando-se a cafeína como indutor de poliploidia, plantas tetraploides foram obtidas nos tratamentos 9 g L⁻¹ por 48 h (50%) e em 12 g L⁻¹ por 24 h (19%) e 48 h (27,3%). Contudo, em valores absolutos, estas proporções referem-se a apenas oito plantas, representando 9,6 % do total analisado por citometria de fluxo, como mostrado anteriormente na Figura 2. Em relação à ocorrência de mixoploidia, foi verificada apenas em uma planta, no tratamento com 3 g L⁻¹ por 48 h.

A cafeína atua inibindo a formação da parede celular na telófase, produzindo células polinucleadas, bem como células poliploides mononucleadas originadas por fusão nuclear nas células anteriormente mencionadas (KIHLMAN e LEVAN, 1949; GIMÉNEZ-MARTIN et al., 1968). Assim, o tratamento com cafeína ao longo de vários ciclos celulares irá gerar uma população de células com dois ou mais núcleos de ploidia aumentada (ROPER 1976; LIU et al., 1995; THOMAS et al., 1997). Os resultados encontrados indicam que as combinações avaliadas de concentração e período de exposição à cafeína, não foram muito eficientes em alterar a ploidia dos explantes tratados, seja pela formação de plantas autotetraploides, que é o objetivo central do trabalho, ou pela formação de mixoploides, que apesar de não serem inicialmente desejados, demonstram a capacidade da substância em promover alterações durante a divisão celular que resultem em variações cromossômicas numéricas.

Ruiz e Vázquez (1981) ao realizarem um estudo citogenético em embriões cultivados in vitro de cevada (*Hordeum vulgare* L.) após aplicação da cafeína no meio de cultura, constataram inicialmente a formação de células bi, tri e polinucleadas e, posteriormente, a predominância de células mononucleadas poliploides. Os autores verificaram que esta fusão dos núcleos ocorre continuamente mesmo após os explantes não estarem mais em contato com a cafeína. Os resultados mais satisfatórios foram encontrados na maior concentração utilizada (1,0 g L⁻¹) e maior período de exposição (4 dias) com 67,9% de plantas tetraploides.

Ao avaliarem a duplicação cromossômica em plantas haplóides de trigo comum (*Triticum aestivum* L.) Thomas et al. (1997) observaram que as maiores concentrações de cafeína resultaram em maior formação de sementes recuperadas e a combinação mais eficaz foi de 3,0 g L⁻¹ por 24 h de exposição.

Contudo, comparando-se com um tratamento padrão de colchicina, todos os tratamentos de cafeína produziram menos sementes.

Há pouca literatura abordando o uso da cafeína como agente antimitótico para fins de melhoramento genético vegetal. De forma geral, os estudos citados assemelham-se com este, no que se refere às melhores taxas de duplicação serem obtidas nas maiores concentrações avaliadas, indicando que os mecanismos celulares desencadeados pela cafeína que induzem a duplicação cromossômica, são mais eficientes em maior concentração da substância e/ou maior tempo de exposição aos tecidos.

A concentração de 2,5 mM L⁻¹ de colchicina resultou na maior formação de plantas tetraploides dentre os antimitóticos avaliados (Tabela 1). Em 24 h de exposição, 90,4% das plantas pré-selecionadas foram confirmadas como tetraploides, o que demonstra a alta capacidade antimitótica da colchicina. Com o aumento do período de exposição à substância, a proporção de plantas duplicadas foi menor (51,6%), provavelmente por consequência da ocorrência de mixoploidia em 22% das plantas analisadas.

A colchicina é um alcalóide extraído das sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* (EIGSTI e DUSTIN 1955), utilizado desde 1930 para aumentar os níveis de ploidia em plantas (BLAKESLEE e AVERY, 1937). No entanto, em muitas espécies, provoca efeitos secundários, tais como a esterilidade, perdas e rearranjos de cromossomos, mutações, crescimento ou a formação anormal de quimeras, devido à divisão celular assíncrona (LUCKETT 1989; WAN et al., 1989). Além disso, em razão da sua elevada afinidade com os microtúbulos de células animais, é muito tóxica para humanos (MOREJOHN et al. 1984). A colchicina se liga fracamente à tubulina vegetal, portanto, deve ser utilizada em concentrações relativamente elevadas em comparação a outras drogas poliploidizantes, como o APM.

Assim, ao estabelecer o agente antimitótico a ser utilizado em trabalhos de poliploidização, é necessário ponderar fatores como toxicidade às plantas e ao manipulador, custos em função da natureza do material e da quantidade necessária e, obviamente, capacidade de duplicação cromossômica, com baixa formação de plantas mixoploides.

A Figura 3 apresenta a caracterização morfológica durante o crescimento inicial das plantas em função do nível de ploidia. Para as três variáveis

analisadas, as plantas mixoploides apresentaram valores significativamente menores em relação às diploides e tetraploides. Este resultado é consequência da variação no número cromossômico que compromete o desenvolvimento, a fertilidade e a estabilidade e, por tal razão, a mixoploidia é indesejável sob o ponto de vista comercial e ou para fins de melhoramento genético (PEREIRA et al., 2012). Amaral et al. (2015), ao caracterizar agronomicamente plantas de bananeira obtidas via poliploidização in vitro, relataram que, embora estivessem vivas, as plantas mixoploides apresentavam o desenvolvimento comprometido e não produziram flores.

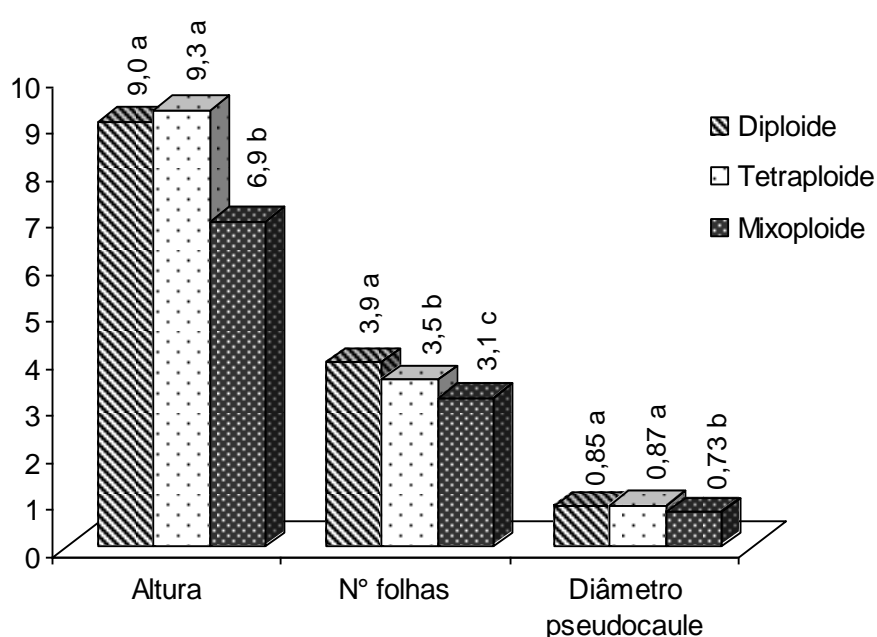


Figura 3. Altura de plantas (cm), número de folhas e diâmetro do pseudocaule (cm) em função do nível de ploidia de plantas de bananeira 'Ouro' submetidas à indução de poliploidia com os antimitóticos amiprofos-metil, cafeína e colchicina.

Para as variáveis altura de planta e diâmetro do pseudocaule, as plantas tetraploides e diploides apresentaram resultados semelhantes, diferindo apenas em relação ao número de folhas, com maior emissão nas plantas diploides. Em bananeira, os poliploides normalmente apresentam folhas arcadas e com limbo mais espesso, frutos maiores, pseudocaule mais espesso, plantas robustas e mais compactas e crescimento lento (BAKRY, 2009; KANCHANAPOOM e KOARAPATCHAIKUL, 2012). Contudo, estas características evidenciam-se mais em estágios avançados do desenvolvimento da planta.

CONCLUSÕES

Dentre os antimitóticos avaliados, a colchicina é o que possui maior capacidade de poliploidização na bananeira 'Ouro';

O APM apresenta bom potencial antimitótico, sendo as concentrações de 10 e 40 $\mu\text{M L}^{-1}$ as que proporcionam maior formação de plantas autotetraploides;

A cafeína possui capacidade de induzir a poliploidia na bananeira, sendo necessários estudos complementares com diferentes concentrações e tempos de exposição;

Plantas mixoploides apresentam crescimento mais lento em relação às diploides e tetraploides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, C. M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O; LEDO, C. A. S.; AMORIM, E. P. Agronomic characterization of autotetraploid banana plants derived from '*Pisang Lilin*' (AA) obtained through chromosome doubling. **Euphytica**, v.202, p.435-443, 2015.

BAKRY, F.; REBERDIERE, N.P. de la; 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.**

BLAKESLEE, A.; AVERY, A. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. **The Journal of Heredity** v. 28, p.393-411, 1937.

CHAI. M.; HO, Y.W.; LIEW, K.W.; ASIF, J.M. Biotechnology and in vitro mutagenesis for banana improvement. **In: JAIN, S.M.; SWENNEN, R. (Ed.)**

Banana improvement: cellular, molecular, biology, and induced mutations. p.59-77. 2004.

COSTA F.H.S.; PASQUAL M.; SILVA, S.O.; PEREIRA NETO H.; 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.

DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; VAN HUYLENBROECK, J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.359–373, 2011.

DOLEZEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**. v.31, p.113–120, 1989.

DOLEZEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v.2, p.143-154, 1991.

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

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

EIGSTI, O.J.; DUSTIN, P. Colchicine. **In: Agriculture, Medicine, Biology, and Chemistry**. Iowa State College Press. Ames, 1955.

FALCONER, M.M.; SEAGULL, R.W.; Amiprofos-methyl (APM): a rapid, reversible, anti-microtubule agent for plant cellcultures. **Protoplasma**, v.136, p.118-124, 1987.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

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

GIMENEZ-MARTIN, G., LOPEZ-SAEZ, J.F.; MORENO, P.; GONZALEZ-FERNANDEZ, A. On the triggering of mitosis and the division cycle of polynucleate cells. **Chromosoma**, v.25, p.282-296, 1968.

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.

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

KIHLMAN, B.; LEVAN, A. The cytological effect of caffeine. **Hereditas**, v.35, p.109-111. 1949.

LIU, C.M.; JOHNSON, S.; WANG, T.L.; LIU, C.M. *Cyd*, a mutant of pea that alters embryo morphology is defective in cytokinesis. **Developmental Genetics**, v.16, p.321-331, 1995.

LUCKETT, D. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. **Euphytica**, v.42, p.177-182, 1989.

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

NIMURA, M.; KATO, J.; HORAGUCHI, H.; MII, M.; SAKAI, K.; KATOH, T. Induction of Fertile Amphidiploids by Artificial Chromosome-doubling in

Interspecific Hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. **Breeding Science**, v.56, p.303-310, 2006.

NONAKA, T. E.; OKA, M.; ASANO, S.; KUWAYAMA, H.; TASAKI, D.-S.; HAN, T.; GODO, M.; NAKANO, A.. Chromosome doubling of *Lychnis* spp. by in vitro spindle toxin treatment of nodal segments. **Scientia Horticulturae**, v.129, p.832-839, 2011.

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

PEREIRA, R. C.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v.42, p.1278-1285, 2012.

PERRIER, X.; DE LANGHE, E.; DONOHUE, M.; LENTFER, C.; VRYDAGHS, L.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; HIPPOLYTE, I.; HORRY J. P.; JENNY, C.; LEBOT, V.; RISTERUCCI, A. M.; TOMEKPE, K.; DOUTRELEPONT, H.; BALL, T.; MANWARING, J.; DE MARET, P.; DENHAM, T. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.108, p.1311-1318, 2011.

PINTOS, B.; MANZANERA, J.A.; BUENO, M.A. Antimitotic agents increase the productivity of double-haploid embryos from cork oak anther culture. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1595-1604, 2007.

PIO, L.A.S, PASQUAL, M.; SILVA, S.O.; ROCHA, H.S.; MAGALHÃES, H.M.; SANTOS-SEREJO, J.A. Inducing and identifying artificially-induced polyploidy in bananas. Inducing and identifying artificially-induced polyploidy in bananas. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p.3748-3758, 2014.

RÊGO, M. M. do; RÊGO, E. R.; BRUNCKNER, C. H.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated

by colchicine and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.451-459, 2011.

RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; SANTOS, R. R.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 13476-13481, 2011.

ROPER, W. Nuclear fusion and irregular cytokinesis in binucleate and tetraploid cells of *Vicia faba* after caffeine treatment. **Experientia** (Basel), v.32, p.1260-1262, 1976.

RUIZ, M. L.; VÁZQUEZ, A. M.; Cell Population Evolution in Tissue Cultures from Embryo Barley (*Hordeum vulgare* L.) After Caffeine Treatment. **Protoplasma**, v.107, p.13-20, 1981.

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

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.919-931, 2013.

SREE RAMULU, K.; VERHOEVEN, H.A.; DIJKHUIS, P. Mitotic blocking micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofosmethyl and colchicines in potato. **Protoplasma**. v.160, p.65-73, 1991.

THOMAS, J.; CHEN, G.; HOWES, N. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. **Genome**, v.40, p.552-558, 1997.

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

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.

WAN, Y.; PETOLINO, J.F.; WIDHOLM, J.M. Efficient production of doubled-haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.77, p.889-92, 1989.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da relevância econômica e social da bananicultura, ainda existem limitações quanto a oferta de genótipos resistentes a pragas, com potencial produtivo e alta qualidade de frutos. O melhoramento genético de cultivares comerciais de bananeira, a exemplo daquelas pertencentes ao subgrupo Cavendish (AAA), é dificultado devido à esterilidade. Dessa forma, a indução de poliploidia em diploides promissores (AA) e posterior cruzamento destes autotetraploides férteis (AAAA) com diploides melhorados (AA), permite a obtenção de triploides secundários (AAA) com boas características de fruto e resistência a doenças. Assim, a poliploidização constitui uma alternativa ao melhoramento genético convencional, baseado em hibridações.

Esta pesquisa foi desenvolvida para complementar demais estudos sobre a poliploidização *in vitro* na bananeira, objetivando, além de verificar a eficiência antimitótica do amiprofos-metil e da cafeína, apresentar uma caracterização morfológica das plantas durante o cultivo *in vitro* e a aclimatização, e estabelecer um método eficiente de pré-seleção dos possíveis poliploides. Destaca-se o fato de ser o primeiro estudo a abordar a aplicação e os efeitos da cafeína como indutor de poliploidia na bananeira.

Após análises preliminares, verificou-se uma correlação entre a massa fresca foliar e o nível de ploidia das plantas, dessa forma, foi utilizado este parâmetro para realizar a pré-seleção. Este método, além de muito simples e prático, apresentou boa eficiência. Verificou-se que a colchicina, avaliada de forma comparativa às outras substâncias, apresenta maior fitotoxicidade *in vitro*, contudo, foi o antimitótico que resultou em maior percentual de plantas

autotetraploides. O amiprofos-metil promoveu boa formação de autotetraploides, com menor ocorrência de mixoploidia em relação à colchicina, demonstrando ser promissor na poliploidização da bananeira. Constatou-se que a cafeína possui capacidade antimitótica, sendo necessários novos estudos contemplando diferentes concentrações e períodos de exposição.

Com a obtenção de autotetraploides (AAAA), o Programa de Melhoramento Genético da Bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura prosseguirá as etapas de avaliação destes materiais em campo para a seleção e realização de cruzamentos. Espera-se que futuramente sejam obtidos triploides secundários que auxiliem no desenvolvimento e recomendação de materiais elites, fortalecendo a bananicultura nacional.

Anexo

Anexo A: Níveis de ploidia de plantas de bananeira ‘Ouro’ submetidas à poliploidização, organizadas por ordem crescente da massa fresca de disco foliar (MFDF). Branco: plantas diploides; amarelo: tetraploides; azul: mixoploides.

SUBST.	TRAT	REP	PLANTA	ALTURA	Nº FOLHAS	DIÂMETRO	MFDF(g)	MSDF(g)	EST/mm ²	PLOIDIA
APM	5	1.2	85	14.00	2	0.50	0.0721	0.0122	104.89	2x
COL	2	11.2	100	8.5	2	0.40	0.0739	0.0067	75.11	2x
APM	5	1.2	104	13.00	1	0.50	0.0771	0.0125	75.56	2x
APM	3	1.1	4	9.2	4	1.00	0.0772	0.0108	67.56	2x
APM	3	1.1	27	7.8	4	1.00	0.0787	0.0102	80.89	2x
APM	5	1.2	51	13.00	2	0.55	0.0801	0.0151	60.00	2x
APM	5	1.2	93	15.50	3	0.90	0.0804	0.0121	114.67	2x
APM	5	1.2	97	12.00	2	0.60	0.0806	0.0134	66.22	2x
APM	3	1.1	1	10.0	4	0.90	0.0808	0.0117	86.22	2x
APM	3	1.1	31	12.0	5	0.90	0.0815	0.0107	83.56	2x
APM	1	3.2	9	29.50	5	0.72	0.0819	0.0103	76.89	2x
APM	5	1.2	31	11.50	3	0.50	0.0840	0.0110	90.22	2x
COL	2	11.2	98	6.0	2	0.40	0.0846	0.0113	80.44	2x
APM	5	1.2	92	12.00	2	0.60	0.0848	0.0131	77.78	2x
APM	5	1.2	98	13.00	2	0.60	0.0851	0.0149	95.56	2x
APM	5	1.2	46	9.50	2	0.50	0.0854	0.0131	80.89	2x
COL	2	11.2	111	8.5	3	0.50	0.0857	0.011	79.56	2x
APM	3	1.1	24	11.8	3	0.75	0.0860	0.0117	84.89	2x
COL	2	3.1	283	6.0	4	0.40	0.0862	0.0110	76.44	2x
APM	5	1.2	41	11.00	2	0.60	0.0867	0.0147	121.78	2x
APM	5	1.2	21	12.50	3	0.80	0.0868	0.0131	104.89	2x
COL	2	11.2	87	8.0	3	0.50	0.0871	0.0117	63.11	2x
COL	2	11.2	78	7.2	3	0.40	0.0874	0.0112	106.67	2x
APM	5	1.2	49	11.50	3	0.50	0.0876	0.0136	90.22	2x
APM	5	1.2	88	13.00	2	0.40	0.0877	0.0146	103.56	2x
COL	2	11.2	71	9.0	4	0.50	0.0878	0.0103	81.33	2x
COL	2	11.2	69	9.0	3	0.70	0.0879	0.0127	89.33	2x
APM	5	1.2	25	10.00	3	0.70	0.0881	0.0152	117.33	2x
APM	5	1.2	29	12.50	2	0.80	0.0881	0.0134	123.56	2x
APM	1	2.1	1	35.50	5	0.98	0.0883	0.0095	63.56	2x
APM	3	1.1	2	11.2	4	1.00	0.0883	0.0106	68.44	2x
APM	5	1.2	28	12.50	3	0.60	0.0883	0.0136	111.11	2x
COL	2	11.2	85	7.0	4	0.50	0.0885	0.0149	107.11	2x
COL	2	11.2	99	7.5	3	0.55	0.0885	0.0090	82.22	2x
COL	2	11.2	89	7.0	4	0.50	0.0893	0.0086	63.11	2x
APM	5	1.2	33	11.00	3	0.70	0.0896	0.0130	173.78	2x
APM	3	1.1	23	10.5	4	1.00	0.0897	0.0144	86.67	2x
APM	3	1.2	10	10.00	4	0.55	0.0899	0.0126	104.89	2x
APM	3	1.2	18	7.5	4	0.75	0.0899	0.0122	102.67	2x
COL	2	11.2	80	8.5	4	0.50	0.0899	0.0104	73.33	2x
APM	2	1.1	2	33.00	5	0.78	0.0901	0.0085	73.78	2x
APM	1	3.2	7	29.00	3	0.90	0.0903	0.0121	82.67	2x
APM	5	1.2	40	11.50	2	0.90	0.0906	0.0130	73.78	2x
APM	5	1.2	83	12.50	3	0.70	0.0908	0.0155	96.89	2x
COL	2	11.2	113	7.5	3	0.50	0.0911	0.0131	76.00	2x
APM	3	1.1	13	11.0	3	0.80	0.0911	0.0098	88.00	2x
APM	1	7.2	23	28.50	5	0.78	0.0912	0.0108	93.78	2x
COL	2	11.2	83	7.0	4	0.55	0.0912	0.0126	70.67	2x
APM	3	1.1	6	11.5	4	0.78	0.0913	0.0118	84.44	2x
APM	5	1.2	16	8.50	4	0.70	0.0915	0.0135	104.44	2x
APM	3	1.1	10	10.2	4	0.80	0.0916	0.0141	73.78	2x
APM	3	1.1	32	7.5	5	0.98	0.0916	0.0154	86.67	2x
APM	3	4.1	77	10.2	4	0.80	0.0917	0.0107	88.89	2x
APM	3	1.1	14	10.8	4	1.00	0.0919	0.0128	100.89	2x
APM	3	1.1	22	11.2	5	0.98	0.0920	0.0145	101.33	2x
COL	2	11.2	117	5.8	3	0.45	0.092	0.0105	87.11	2x
APM	5	1.2	35	8.50	3	0.60	0.0921	0.0155	121.78	2x
APM	3	1.1	29	8.8	5	1.00	0.0925	0.0125	63.56	2x
COL	2	11.2	107	9.0	3	0.50	0.0927	0.0114	75.11	2x
COL	2	3.1	275	7.5	4	0.40	0.0928	0.0153	122.22	2x
COL	2	11.2	75	6.0	2	0.40	0.0929	0.0121	81.78	2x
APM	3	4.1	90	10.00	6	0.70	0.0930	0.0123	66.22	2x
APM	3	1.1	5	11.8	3	0.98	0.0932	0.0125	95.56	2x
APM	3	1.1	30	9.5	4	1.05	0.0932	0.0177	71.56	2x
COL	2	11.2	101	8.0	2	0.50	0.0942	0.0078	87.11	2x
APM	5	1.2	30	10.50	2	0.70	0.0943	0.0139	109.78	2x
APM	3	1.1	11	8.7	3	0.70	0.0944	0.0153	83.11	2x
COL	2	11.2	64	7.0	3	0.60	0.0948	0.0175	122.22	2x
COL	2	3.1	282	7.5	3	0.50	0.0949	0.0107	84.44	2x
APM	3	1.1	18	6.5	4	1.00	0.0952	0.0128	96.89	2x
APM	1	2.1	3	28.50	5	0.70	0.0958	0.0098	85.33	2x
APM	3	1.1	3	11.0	3	0.95	0.0961	0.0123	68.44	2x
APM	5	1.2	45	10.50	2	0.60	0.0966	0.0157	135.11	2x
COL	2	11.2	74	6.5	3	0.50	0.0969	0.0126	80.89	2x
COL	2	11.2	76	5.5	3	0.50	0.0978	0.0150	100.44	2x
APM	1	3.2	10	23.50	6	0.98	0.0984	0.0154	107.56	2x
COL	2	11.2	68	7.5	3	0.50	0.0985	0.0145	69.78	2x
COL	2	3.1	277	5.0	4	0.40	0.0988	0.0143	82.67	2x
APM	3	1.1	7	11.20	4	1.00	0.0989	0.0123	41.78	2x
APM	4	1.1	7	8.0	4	0.75	0.0992	0.0130	97.33	2x
APM	2	5.1	10	21.50	5	0.95	0.0993	0.0111	102.67	2x
COL	2	11.2	84	6.5	4	0.40	0.0993	0.0105	66.22	2x
COL	2	11.2	116	6.5	3	0.50	0.0994	0.0116	86.22	2x
APM	2	1.1	1	25.00	5	1.00	0.0995	0.0124	92.89	2x
APM	5	1.2	111	9.00	2	0.50	0.0998	0.0136	104.89	2x
COL	2	11.2	112	8.5	4	0.55	0.0998	0.0136	78.67	2x
COL	2	11.2	67	9.0	3	0.70	0.1003	0.0142	71.11	2x
COL	2	11.2	66	6.5	3	0.50	0.1007	0.0106	62.67	2x
COL	2	11.2	81	7.0	3	0.45	0.1007	0.0116	61.33	2x
COL	2	11.2	61	6.0	3	0.50	0.1008	0.0117	73.78	2x
COL	2	11.2	114	7.0	4	0.50	0.1009	0.0132	73.33	2x
COL	2	11.2	73	6.5	3	0.50	0.1011	0.0103	75.11	2x
APM	3	1.1	91	9.00	4	0.55	0.1013	0.0114	68.00	mixo
COL	2	11.2	72	6.0	2	0.40	0.1014	0.0116	86.22	2x
COL	2	12.1	8	6.5	3	0.50	0.1015	0.0144	104.44	2x
APM	3	1.1	19	8.5	4	0.90	0.1019	0.0150	111.11	2x
COL	2	3.1	307	6.5	4	0.50	0.1020	0.0154	106.22	2x

COL	2	11.2	77	6.0	2	0.40	0.1020	0.0114	71.11	2x
APM	3	1.1	16	10.3	3	1.00	0.1021	0.0137	87.11	2x
APM	1	7.2	18	27.00	3	0.75	0.1025	0.0120	96.44	2x
COL	2	11.2	103	7.0	3	0.30	0.1025	0.0089	77.33	2x
COL	2	11.2	108	9.0	3	0.50	0.1025	0.0100	70.22	2x
APM	3	1.1	49	9.5	4	1.00	0.1028	0.0149	84.00	2x
COL	2	12.1	7	6.0	3	0.45	0.1029	0.0102	67.11	2x
APM	2	4.1	9	27.00	5	0.90	0.1030	0.0125	102.22	2x
APM	3	1.1	25	11.5	3	0.63	0.1031	0.0141	105.33	2x
COL	2	3.1	272	4.5	2	0.40	0.1043	0.0100	68.89	mixo
COL	2	11.2	106	10.0	4	0.55	0.1043	0.0120	84.44	2x
COL	2	3.1	273	7.0	4	0.55	0.1045	0.0129	104.00	2x
COL	2	3.1	286	5.0	2	0.40	0.1046	0.0127	98.67	4x
COL	2	7.1	86	7.5	4	0.50	0.1049	0.0097	51.11	2x
COL	2	7.1	34	9.0	4	0.90	0.1053	0.0159	61.78	2x
COL	2	11.2	105	6.0	2	0.50	0.1055	0.0127	75.11	2x
COL	2	12.1	6	6.5	4	0.45	0.1055	0.0117	59.56	2x
COL	2	3.1	276	7.5	3	0.50	0.1060	0.0142	95.56	2x
APM	3	1.1	34	11	5	0.98	0.1061	0.0165	85.78	2x
COL	2	11.2	82	9.0	3	0.45	0.1063	0.0083	52.89	mixo
APM	3	4.1	86	13.00	6	0.93	0.1066	0.0118	69.33	4x
APM	3	1.1	60	8.00	5	0.70	0.1068	0.0138	66.67	4x
APM	3	1.1	12	10.0	4	1.00	0.1074	0.0150	89.78	2x
COL	2	11.2	79	7.0	3	0.40	0.1074	0.0103	64.00	2x
APM	3	1.1	43	6.5	4	0.75	0.1076	0.0172	81.78	2x
COL	2	11.2	65	6.0	3	0.40	0.1076	0.0148	118.22	4x
COL	2	3.1	287	5.5	3	0.60	0.1079	0.0127	92.00	2x
COL	2	11.2	90	8.0	3	0.50	0.1082	0.0098	56.00	4x
COL	2	11.2	110	9.0	3	0.50	0.1082	0.0117	74.67	2x
COL	2	3.1	271	5.5	4	0.50	0.1087	0.0122	91.56	2x
APM	3	1.1	51	8.00	4	0.70	0.1090	0.0156	73.78	2x
APM	3	1.1	21	12.0	6	1.05	0.1090	0.0137	73.33	2x
APM	3	1.1	59	9.0	5	0.75	0.1091	0.0165	80.00	2x
COL	2	12.1	5	8.5	4	0.55	0.1096	0.0145	92.89	2x
APM	3	1.1	8	7.0	4	0.78	0.1099	0.0163	114.22	2x
APM	3	1.1	61	4.5	3	0.48	0.1101	0.0141	88.00	2x
COL	2	11.2	95	4.5	3	0.50	0.1116	0.0117	89.33	4x
COL	2	11.2	86	7.5	3	0.65	0.1121	0.0107	70.67	2x
APM	3	1.1	20	9.2	4	0.90	0.1122	0.0156	83.11	2x
COL	2	3.1	270	6.0	2	0.40	0.1122	0.0131	83.11	2x
COL	2	11.2	94	2.5	4	0.25	0.1122	0.0090	61.11	mixo
COL	2	11.2	91	8.0	3	0.45	0.1124	0.0094	62.22	mixo
COL	2	3.1	269	5.0	2	0.50	0.1129	0.0106	85.33	2x
COL	2	11.2	109	8.5	4	0.50	0.1136	0.0130	81.33	2x
APM	3	1.2	49	7.50	4	0.70	0.1151	0.0140	95.11	4x
COL	2	12.1	4	16.5	3	0.50	0.1152	0.0101	69.78	4x
COL	2	3.1	288	3.0	2	0.25	0.1155	0.0133	56.44	4x
APM	3	1.1	79	6.20	4	0.75	0.1158	0.0158	85.78	2x
APM	3	4.1	103	10.50	4	0.60	0.1161	0.0137	76.00	4x
APM	4	2.1	2	7.50	4	1.00	0.1175	0.0141	59.56	4x
APM	3	1.2	54	8.50	4	0.55	0.1178	0.0130	70.67	4x
APM	3	4.1	100	10.00	5	0.87	0.1179	0.0128	83.56	4x
APM	3	1.1	38	12.5	4	0.78	0.1190	0.0115	84.44	2x
COL	2	3.1	281	7.0	3	0.60	0.1190	0.0121	65.78	4x
APM	3	1.1	41	8.5	4	0.75	0.1191	0.0136	89.78	2x
COL	2	11.2	97	7.5	3	0.50	0.1191	0.0100	62.22	4x
APM	4	2.1	70	7.50	3	0.75	0.1197	0.0135	68.44	4x
APM	4	2.1	23	11.20	3	0.75	0.1202	0.0149	59.56	4x
COL	2	4.1	1	7.0	4	0.45	0.1203	0.0112	70.22	mixo
COL	2	3.1	300	6.0	3	0.50	0.1204	0.0134	88.89	4x
APM	3	4.1	134	5.60	5	0.80	0.1207	0.0153	109.33	4x
APM	3	4.1	20	6.70	4	0.70	0.1217	0.0195	85.33	2x
APM	3	4.1	92	5.00	4	0.65	0.1219	0.0137	91.11	4x
COL	2	11.2	62	7.0	3	0.60	0.1220	0.0120	53.78	mixo
APM	4	2.1	59	9.30	2	0.60	0.1229	0.0145	61.78	4x
COL	2	11.2	93	7.0	3	0.50	0.1235	0.0121	69.33	4x
COL	2	11.2	96	6.0	3	0.45	0.1236	0.0113	52.44	4x
APM	3	4.1	65	9.00	3	0.50	0.1237	0.0128	76.44	4x
APM	3	4.1	118	8.20	5	0.70	0.1249	0.0181	97.78	4x
APM	3	4.1	128	4.80	3	0.60	0.1252	0.0161	107.56	4x
APM	4	2.1	61	7.20	2	0.90	0.1257	0.0194	66.22	4x
COL	2	3.1	279	4.0	1	0.40	0.1259	0.0140	84.00	4x
APM	4	2.1	25	9.30	4	0.80	0.1260	0.0142	52.00	4x
APM	3	4.1	101	6.50	4	0.73	0.1263	0.0146	88.44	4x
APM	3	3.1	2	8.80	4	1.00	0.1265	0.0160	99.11	4x
APM	3	4.1	132	8.20	3	0.70	0.1272	0.0166	79.11	4x
COL	2	3.1	268	5.0	2	0.50	0.1298	0.0136	73.78	4x
APM	4	1.1	3	10.30	3	0.75	0.1300	0.0190	115.56	4x
COL	2	12.1	3	11.0	4	0.50	0.1300	0.0107	69.78	4x
COL	2	11.2	92	7.0	4	0.40	0.1309	0.0066	71.56	4x
COL	2	3.1	290	5.0	3	0.50	0.1328	0.0134	73.78	4x
APM	3	1.1	54	12.0	2	0.75	0.1330	0.0196	94.22	2x
APM	3	1.1	63	12.00	3	0.72	0.1339	0.0177	87.56	2x
COL	2	7.1	55	7.0	3	0.50	0.1373	0.0125	53.33	2x
COL	2	4.1	2	6.0	3	0.50	0.1380	0.0131	75.56	4x
APM	3	1.1	35	8.50	4	0.78	0.1428	0.0170	60.00	4x
COL	2	12.1	2	16.0	3	0.45	0.1430	0.0115	80.89	4x
COL	2	3.1	298	5.5	2	0.40	0.1434	0.0146	77.33	4x
COL	2	7.1	30	8.0	3	0.60	0.1441	0.0134	41.33	4x
COL	2	3.1	267	5.5	3	0.40	0.1474	0.0163	78.67	4x
APM	3	4.1	83	7.50	4	0.70	0.1487	0.0140	88.44	2x
APM	3	3.1	4	7.00	4	0.73	0.1492	0.0162	72.00	4x
APM	3	1.1	70	6.50	3	0.55	0.1512	0.0202	85.33	2x
APM	3	1.1	40	11.00	3	0.70	0.1514	0.0167	61.78	mixo
APM	3	1.2	59	7.50	5	0.80	0.1515	0.0119	72.89	4x
APM	4	2.1	31	9.70	3	0.75	0.1517	0.0107	59.56	4x
COL	2	3.1	265	5.5	3	0.50	0.1679	0.0148	66.67	4x
APM	3	3.1	13	5.50	3	0.40	0.1883	0.0137	108.44	4x