



**RENATA ALVES LARA SILVA**

**MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA:  
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS,  
BROTAÇÕES MÚLTIPLAS E CONTEÚDO DE  
DNA**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**RENATA ALVES LARA SILVA**

**MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA:  
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS, BROTAÇÕES MÚLTIPLAS E  
CONTEÚDO DE DNA**

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

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

**LAVRAS – MG**

**2012**

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

Silva, Renata Alves Lara.

Micropropagação da bananeira : características anatômicas,  
brotações múltiplas e conteúdo de DNA / Renata Alves Lara Silva. –  
Lavras : UFLA, 2012.

101 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Anatomia. 2. Qualidade espectral. 3. Malhas coloridas. 4.  
Benzilaminopurina. 5. Citometria de fluxo. I. Universidade Federal  
de Lavras. II. Título.

CDD – 634.77233

**RENATA ALVES LARA SILVA**

**MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA:  
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS, BROTAÇÕES MÚLTIPLAS E  
CONTEÚDO DE DNA**

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

APROVADA em 17 de fevereiro de 2012.

Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dra. Roselaine Cristina Pereira	UFLA
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA

Dr. Moacir Pasqual  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2012**

*A Deus*

**OFEREÇO**

*Aos meus pais*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me fazer suportar as dificuldades encontradas no caminho, permitindo que mais uma etapa pudesse ser concluída depois de tantos obstáculos.

À **Universidade Federal de Lavras**, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

Aos meus pais, **Carlos** e **Jane**, pelo amor e apoio em todas as horas, por todos os ensinamentos de vida e por sempre me incentivarem a seguir em frente, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao professor **Moacir Pasqual**, pela orientação, apoio e amizade, por, desde o início, ter depositado sua confiança em mim e por ter me incluído em sua equipe de trabalho, da qual me orgulho muito.

Ao professor **Evaristo Mauro de Castro**, por ter me acompanhado durante anos, sempre me dando conselhos valiosos e mostrando ser um grande amigo e profissional.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

À **EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical**, por ceder todo o material vegetal utilizado nos experimentos.

À Dra. **Leila Aparecida Salles Pio**, pela enorme amizade, paciência e dedicação. Todo este trabalho teria sido muito mais difícil sem a sua colaboração. Você é uma pessoa muito especial que levarei no coração para sempre.

À Dra. **Roselaine Cristina Pereira**, por aceitar participar da banca avaliadora e por sua atenção e colaboração.

Ao Dr. **Rafael Hansen Madail**, pela grande amizade e pelo auxílio dispensado a mim em todos os trabalhos executados. Sua participação na banca avaliadora de qualificação foi imensamente importante.

Ao professor **Fabrcio José Pereira**, pela participao na banca avaliadora de qualificao e por dar contribuoes valiosíssimas para este trabalho.

Ao **Ramiro**, meu amor, por sempre estar ao meu lado com seu carinho, ateno e apoio e, também, por sua prontidão e auxílio, dos quais precisei muitas vezes. Você  muito especial!

Ao **Filipe Almendagna Rodrigues**, por ter se mostrado um grande amigo com quem pude contar diversas vezes e por sempre me dar boas sugestoes. Suas ideias foram muitíssimo válidas.

A **Cat**, por se mostrar sempre pronta a ajudar e por toda sua colaborao.

Aos amigos queridos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, **Simone, Joyce, Ylana, Gabi, Ana Paula, Karine, Dalilha, Flávia, Davi, Penoni, Camila, Hlida e Fabrcio**, pela amizade mais que especial.

Aos amigos **Vantuil e Claret**, pelo auxílio e por todos os bons momentos que me proporcionaram boas risadas e descontrao.

Aos amigos do **Laboratório de Anatomia Vegetal**, pelo auxílio na realizao das análises.

A **Marli**, pela ajuda e ateno constantes.

A todos os amigos da Pós-Graduao em Agronomia/Fitotecnia, pelas aulas compartilhadas e pela amizade especial que levarei sempre na memória.

Aos meus familiares, em especial meu irmão **Bruno** e meu avô **José**, que sempre torceram pela realizao de mais esta etapa.

s queridas amigas, **Dri e Nathy**, pela amizade e companheirismo diário.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realizao deste trabalho.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da qualidade luminosa sobre diferentes características anatômicas de genótipos de bananeira aclimatizados sob malhas coloridas, avaliar a formação de múltiplas brotações e estabilidade genética a partir de ápices caulinares de bananeira ‘Ouro’ em meio suplementado com elevada concentração de benzilaminopurina (BAP) e avaliar o desempenho de softwares comumente utilizados em análises de citometria de fluxo por meio da análise do conteúdo de DNA e coeficiente de variação (CV) gerados por eles. Para as análises anatômicas, foram coletados segmentos foliares de mudas micropropagadas de 5 genótipos de bananeira (Maçã, Thap Maeo, Caipira, PA 42-44 e Princesa) cultivados por 90 dias sob malhas coloridas (branca, azul, preta e vermelha). Foram avaliadas: densidade estomática, funcionalidade dos estômatos e espessuras de epiderme, hipoderme, parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. Os resultados mostram que a anatomia foliar sofre modificações com a utilização de malhas coloridas e que todas elas, à exceção da preta, favorecem o desenvolvimento de caracteres anatômicos, com destaque para a malha branca. Para as análises de múltiplas brotações, ápices meristemáticos de bananeira ‘Ouro’ foram estabelecidos *in vitro*, em tubos de ensaio contendo meio MS suplementado com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 1,8 g L<sup>-1</sup> de phytigel. O pH foi ajustado para 6,2. Os tubos ficaram 15 dias no escuro e mais 15 dias em ambiente iluminado. Após esse período, os ápices foram submetidos aos tratamentos com duas concentrações de BAP (2,5 e 22,5 mg L<sup>-1</sup>) em meio MS com todas as suplementações do meio de cultura anterior. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 15 repetições. Após 45 dias, realizaram-se a contagem do número de brotações e a análise de citometria de fluxo. Os resultados mostram que os explantes submetidos à concentração de 22,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP não são eficientes na formação de múltiplas brotações e que essa concentração promove perda de DNA nos explantes. Para verificar o desempenho dos softwares, foram preparadas amostras para citometria de fluxo, utilizando 25 segmentos foliares recém-coletados de bananeira ‘NBA’. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD) e os histogramas obtidos com o software CellQuest™. O conteúdo de DNA e o CV foram obtidos por meio dos softwares CellQuest™, WinMDI™, FlowJo™ e FCS Express™. Não houve diferença significativa para o conteúdo de DNA entre os diferentes softwares, porém, o WinMDI™ mostra menor precisão nas análises, ao contrário dos demais.

Palavras-chave: Anatomia. Qualidade espectral. BAP. Citometria de fluxo.



## ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of spectral quality of light of 5 banana genotypes through the use of different colored shading nets in anatomical traits, evaluate the formation of multiple shoots and genetic stability from shoot tips of banana 'Ouro' in medium supplemented with high concentration of benzylaminopurine (BAP) and evaluate the performance of softwares commonly used in flow cytometry analysis, by analyzing DNA content and the coefficient of variation (CV) generated by them. For anatomical analysis, leaf segments of micropropagated seedlings of 5 banana genotypes ('Maçã', 'Thap Maeo', 'Caipira', 'PA 42-44' and 'Princesa') grown for 90 days under colored shading nets (white, blue, black and red) were collected. The traits evaluated were: stomatal density, stomata functionality and thickness of epidermis, hypodermis and parenchyma. The results showed that the leaf anatomy has changed with the use of colored nets and all of them, except the black net, favor the development of anatomical traits, especially the white shading net. For the analysis of multiple shoots, meristematic tips of banana 'Ouro' were established *in vitro* in tubes containing MS medium supplemented with 2.5 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0.1 mg L<sup>-1</sup> AIA, 10 mg L<sup>-1</sup> ascorbic acid, 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 1.8 g L<sup>-1</sup> phytigel. The pH was adjusted to 6.2. The tubes were left in the dark for 15 days and after for 15 days in a bright environment. After this period, the apices were subjected to treatment with two concentrations of BAP (2.5 and 22.5 mg L<sup>-1</sup>) in MS medium with all supplementation of the previous culture medium. The design was completely randomized with 15 repetitions. After 45 days the number of shoots was counted and flow cytometry analysis was made. The results showed that the explants subjected to the concentration of 22.5 mg L<sup>-1</sup> BAP were not efficient in the formation of multiple shoots and this concentration causes loss of DNA in the explants. To verify the performance of softwares, samples were prepared for flow cytometry analysis using 25 fresh leaf segments from banana 'NBA'. The readings were taken in flow cytometer FACSCalibur (BD) and the histograms were obtained with the CellQuest™ software. DNA content and CV were obtained through softwares CellQuest™, WinMDI™, FlowJo™ and FCS Express™. There was no significant difference in DNA content between the different softwares, but the software WinMDI™ showed lower accuracy in the analysis while CellQuest™, FlowJo™ and FCS Express™ were found to generate analysis more reliable.

Keywords: Anatomy. Spectral quality. BAP. Flow cytometry.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução geral .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Banicultura</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Radiação no desenvolvimento vegetal</b> .....	14
<b>2.2.1</b>	<b>Uso de malhas coloridas no período de aclimatação</b> .....	17
<b>2.3</b>	<b>Obtenção de brotações múltiplas</b> .....	22
<b>2.4</b>	<b>Citometria de fluxo</b> .....	25
<b>2.4.1</b>	<b>Coeficiente de variação</b> .....	27
<b>2.4.2</b>	<b>Fatores que afetam a confiabilidade das análises</b> .....	28
<b>2.4.3</b>	<b>Principais <i>softwares</i> utilizados</b> .....	30
<b>2.4.3.1</b>	<b>CellQuest™ Pro</b> .....	31
<b>2.4.3.2</b>	<b>WinMDI™ 2.8</b> .....	32
<b>2.4.3.3</b>	<b>Flow Jo™</b> .....	33
<b>2.4.3.4</b>	<b>FCS Express™</b> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
	<b>CAPÍTULO 2</b> Características da anatomia foliar de diferentes genótipos de bananeira ( <i>Musa</i> sp.) cultivadas sob malhas coloridas.....	47
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	50
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68
	<b>CAPÍTULO 3</b> Estabilidade genética de bananeira ‘Ouro’ submetida a tratamento para formação de múltiplos brotos.....	71
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	74
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	76
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	79
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	84
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85
	<b>CAPÍTULO 4</b> Desempenho de <i>softwares</i> nas análises de citometria de fluxo em bananeira.....	88
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	91
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	93
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	96
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	100
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

A bananeira encontra-se entre as principais frutíferas cultivadas em todo o mundo e o Brasil destaca-se entre os principais produtores, assumindo o quarto lugar no ranking, graças as 6,7 milhões de toneladas produzidas, em média, por ano (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2010). Mesmo com produção significativa, a cultura apresenta limitações que impedem o aumento da produtividade no país, a qual é considerada baixa frente a outros produtores mundiais. Manejo inadequado, tecnificação pouco sofisticada e, principalmente, escassez de cultivares resistentes a pragas e doenças são fatores que contribuem para o baixo rendimento da cultura (LEONEL; DAMATTO JÚNIOR, 2007). Em função da importância que a bananicultura representa para o Brasil, projetos de pesquisa são desenvolvidos em diversas instituições, objetivando otimizar o cultivo.

Devido à alta demanda por mudas, a maioria dos materiais utilizados na formação de banais no país advém da micropropagação que proporciona um suprimento constante de mudas sadias para os produtores (BRAGA; SÁ; MUSTAFÁ, 2001). Porém, os protocolos utilizados, tanto na fase *in vitro* como no período de aclimatização, muitas vezes não são totalmente adequados, fazendo com que muitas pesquisas com a cultura sejam realizadas nesse sentido.

Na fase *in vitro*, os reguladores de crescimento têm papel fundamental para o aumento das taxas de multiplicação (ERIG; SCHUCH, 2006). Estudos que visem o aperfeiçoamento dos protocolos estão sendo constantemente realizados, de forma a obterem-se os melhores resultados para a produção de mudas em larga escala. Tais estudos são muito importantes não só quanto às taxas de multiplicação, mas também quanto à ocorrência de variantes somaclonais. Concentrações inadequadas dessas substâncias podem provocar erros na divisão celular, gerando plantas com diferenças no conteúdo de DNA

nuclear, fazendo com que elas tenham desempenho prejudicado futuramente (SINGH, 2002). Assim, após a realização de estudos com reguladores de crescimento, a estabilidade genética das plantas deve ser avaliada. Essa avaliação pode ser estimada através da técnica de citometria de fluxo que apresenta resultados acerca de vários atributos celulares em curto espaço de tempo (YANG et al., 2010). A citometria de fluxo é uma ferramenta muito importante, porém, é necessário que os recursos relacionados a ela, principalmente aqueles inerentes à instrumentação propriamente dita, sejam precisos, de forma a fornecer resultados mais confiáveis (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

Outro ponto do processo de micropropagação refere-se ao período de aclimatização das plantas, uma vez que elas sofrerão mudanças drásticas de ambiente que poderão comprometer seu ciclo de vida (COSTA et al., 2008). Uma medida que já vem sendo utilizada com sucesso para outras espécies de frutíferas e plantas ornamentais é a utilização de malhas coloridas em casas de vegetação, as quais irão atuar na filtração parcial do espectro da radiação solar, favorecendo determinadas características do vegetal, como as anatômicas, que irão certamente influenciar o crescimento e o desenvolvimento da planta (SHAHAK et al., 2004). Modificações em plantas submetidas a essa tecnologia devem ser avaliadas para discriminarem-se quais são as melhores condições, no que se refere à qualidade da luz solar, para cada cultivar.

Objetivou-se, com este trabalho, avaliar: 1) modificações anatômicas em plantas de cinco genótipos de bananeira aclimatizados sob malhas coloridas; 2) a formação de múltiplas brotações quando da aplicação de diferentes concentrações de benzilaminopurina e possíveis alterações do conteúdo de DNA nuclear das plantas por meio de citometria de fluxo e 3) o desempenho de diferentes programas computacionais para análise dos dados obtidos em citometria de fluxo, com base no coeficiente de variação e no índice de DNA.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Bananicultura

A bananeira pertence à família *Musaceae*, da qual o gênero *Musa* é o mais representativo, pois inclui as espécies *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* Colla (que possuem os genomas A e B, respectivamente), as quais podem ter dado origem à maioria das bananeiras comestíveis, resultado da combinação desses genomas (SILVA et al., 2006).

As cultivares apresentam três níveis cromossômicos: diploides (2n), triploides (3n) e tetraploides (4n), sendo o conjunto básico (n) constituído de 11 cromossomos (DANTAS; SOARES FILHO, 1997).

As bananeiras triploides são as mais comercializadas, devido às suas características agronômicas favoráveis, tais como porte adequado, maior produtividade, resistência ao despencamento e arqueamento das folhas (STOVER; SIMMONDS, 1987), entretanto, os genótipos diploides são importantes para o melhoramento por serem fonte de alelos de resistência (JENNY, 1999).

No nível sócio-econômico, as bananeiras e os plátanos (*Musa* sp.) encontram-se entre as frutíferas de maior importância para a alimentação básica de cerca de 400 milhões de pessoas, em vários países subdesenvolvidos (SHIRANI; MAHDAVI; MAZIAH, 2009), com produção mundial de, aproximadamente, 102 milhões de toneladas, no ano de 2010 (FAO, 2010). No Brasil, a bananeira é cultivada em todo o país, em uma área total de cerca de 490 mil ha (FAO, 2010), onde se destacam os estados de São Paulo, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009). O país é o 4º maior produtor, com produção de quase 7 milhões de toneladas (FAO, 2010), porém, a produtividade brasileira

ainda é baixa, quando comparada à de outros países produtores, devido, principalmente, à baixa tecnificação da cultura, ao manejo inadequado e à utilização de cultivares suscetíveis a diversas pragas e doenças (SANTOS et al., 2009).

O crescimento da bananicultura nos últimos anos fez com que a demanda por mudas de qualidade aumentasse. Porém, devido à propagação da bananeira se dar, principalmente, de forma vegetativa (por meio de brotações laterais), a disseminação de pragas e doenças fica facilitada, comprometendo, assim, a sanidade das mudas (ROELS et al., 2005).

A micropropagação tornou-se uma técnica muito utilizada para a propagação massal de mudas sadias, visando atender com maior rapidez às necessidades dos produtores (BRAGA; SÁ; MUSTAFÁ, 2001). Porém, o estabelecimento de protocolos apropriados ainda não está disponível para todas as cultivares, de forma que estudos acerca das melhores condições de cultivo durante a fase *in vitro*, assim como durante o período de aclimatização, são cruciais para otimizar a multiplicação em massa.

## **2.2 Radiação solar no desenvolvimento vegetal**

A qualidade e a intensidade luminosas são fatores fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento das plantas, exercendo ação direta ou indireta na morfogênese vegetal (MORINI; MULEO, 2003). Os vegetais crescem sob uma região limitada do espectro visível e exibem morfologia e fisiologia determinadas pelas variações nesse espectro (FUKUDA et al., 2008).

Os vegetais detectam a qualidade da luz por meio de diferentes fotorreceptores, tais como fitocromos, criptocromos e outros receptores de luz ultravioleta indefinidos (TAIZ; ZEIGER; 2009). Os picos de absorbância dos fitocromos encontram-se na faixa do vermelho (600 a 700 nm) e do vermelho-

distante (700 a 800 nm) e em menor grau na faixa da luz azul (400 a 500 nm), com um padrão típico aproximadamente relacionado com o espectro de absorção dos pigmentos fotossintéticos (RUNKLE; HEINS, 2001). Dessa forma, sob mesma intensidade luminosa, a eficiência fotossintética se modifica de acordo com o comprimento de onda (PARADISO et al., 2011).

Esses fotorreceptores são capazes de detectar variações na composição da luz e induzir respostas fotomorfogenéticas, tanto em ambiente *in vivo* como *in vitro*, as quais influenciam o crescimento e o desenvolvimento (COSTA et al., 2010), especificamente alterações na anatomia (COSTA et al., 2010; MARTINS et al., 2009; SANTIAGO et al., 2001), morfologia (MEIRELLES et al., 2007), eficiência fotossintética (HANBA; KOGAMI; TERASHIMA, 2002) e composição química (ENGEL; POGIANNI, 1991; MACEDO et al., 2004). Os mecanismos pelos quais os fotorreceptores regulam as respostas nas plantas ainda são, na maior parte, desconhecidos (DIGNART, 2006). Algumas evidências indicam que, em muitas respostas morfogênicas, mais de um receptor deva estar envolvido (OREN-SHAMIR et al., 2001).

A luz vermelha influencia o desenvolvimento vegetal, principalmente pelas alterações nas razões vermelho/vermelho-distante (V:VD) absorvidas pelas formas interconversíveis do fitocromo, o que pode acarretar modificações na condutância estomática, alongamento do caule e dominância apical (ALMEIDA; MUNDSTOCK, 2001; SCHUERGER; BROWN; STRYJEWSKI, 1997). A luz azul é importante em processos como síntese de pigmentos, abertura e fechamento dos estômatos e desenvolvimento de cloroplastídeos (ECKERT; KALDENHOFF, 2001).

Segundo Jiao, Lau e Deng (2007), as plantas desenvolvem sofisticados mecanismos com a finalidade de captar, da melhor forma possível, a energia luminosa, para utilizá-la nos processos fotossintéticos. Elas conseguem reagir às mudanças que ocorrem no espectro da radiação eletromagnética por meio de



alterações na morfologia e nas funções fisiológicas, resultando em adaptação às diferentes condições ambientais (KASPERBAUER; HAMILTON, 1984).

Variações na incidência luminosa podem fazer com que as plantas modifiquem determinadas características, de maneira a reduzir as perdas no processo de fotossíntese, por meio de alterações no tamanho, na inclinação e na espessura das folhas e/ou no tamanho e na densidade dos estômatos da epiderme foliar (LARCHER, 1986). A abundância de luz faz com que os parênquimas paliádico e esponjoso apresentem maior número de camadas, de forma que haja absorção, canalização e dispersão da luz, para que a vitalidade da folha não seja comprometida (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Já plantas que apresentam certa tolerância ao excesso de luz desenvolvem outros mecanismos que evitam a dessecação das folhas, tais como o espessamento foliar. Em condições ambientais de baixa luminosidade, pode ocorrer baixa taxa fotossintética, que contribui para reduzido incremento de biomassa vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009). Além disso, pode ocorrer redução na espessura da folha, devido à diminuição nas camadas dos tecidos parenquimáticos. Em muitos trabalhos foi demonstrado que diferentes intensidades de luz influenciam inúmeras características anatômicas, como densidade estomática, disposição e quantidade de tecido vascular, número de tricomas, número e tamanho de células epidérmicas, e esclerificação de tecidos, dentre outros (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Estudos envolvendo intensidade e qualidade da luz contribuíram para ampliar o conhecimento acerca de vários processos importantes, como germinação de sementes, alongamento do caule e comportamento dos estômatos (ECKERT; KALDENHOFF, 2001).

Muitos pesquisadores afirmam ser necessário conhecer a plasticidade morfofisiológica que as espécies assumem em diferentes condições ambientais, haja vista que essas características poderão influenciar o seu melhor desempenho quanto ao maior crescimento e ao desenvolvimento que essas plantas poderiam

apresentar (MIRALLES et al., 2011). Embora muitos autores tenham confirmado os efeitos da luz sobre caracteres morfo-fisiológicos, as respostas podem sofrer variações, dependendo da espécie em estudo (ANTONOPOLOU et al., 2004).

Conforme relatado por Villar-Salvador et al. (2004), por exemplo, o conhecimento da plasticidade de espécies de sub-bosque é muito importante no momento da formação de mudas, visando à prática de reflorestamento, pois irá contribuir para melhor estabelecimento, sobrevivência e crescimento das plantas após o transplântio.

Em situações similares, cafeeiros submetidos a diferentes condições de luminosidade apresentaram variações significativas em várias características fisiológicas, tais como fotossíntese, condutância estomática e transpiração, o que, certamente, influenciou o crescimento e desenvolvimento das plantas (FREITAS et al., 2003).

O florescimento de diferentes gramíneas forrageiras foi prejudicado quando as plantas foram submetidas à intensidade luminosa reduzida (CASTRO; CARVALHO, 2000).

A retirada da radiação vermelho-distante através de filtros espectrais levou à redução de 19% na altura final de plantas de crisântemo, durante o florescimento (KHATTAK; PEARSON; JOHNSON, 2004).

### **2.2.1 Uso de malhas coloridas no período de aclimatização**

A agricultura vem enfrentando desafios devido a inúmeros fatores, tais como ocorrência de mudanças climáticas globais, avanço da urbanização para áreas marginais, padrões mais rigorosos de mercado quanto a questões de qualidade, utilização de produtos químicos e práticas ambientais sustentáveis (ASSAD; ALMEIDA, 2004). Quanto ao clima, não é possível exercer total

controle, por isso é necessário que as culturas sejam protegidas de forma a serem menos dependentes do ambiente (SHAHAK et al., 2004). Essa proteção pode ser feita por meio do desenvolvimento de cultivares resistentes e/ou do cultivo em ambientes protegidos, como casas de vegetação e estufas com malhas de sombreamento (BELTRÃO; FIDELES FILHO; FIGUEIRÊDO, 2002).

Já é sabido que a radiação solar desempenha papel biológico em inúmeras características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas, o que evidencia, dessa forma, a necessidade de conhecimento adequado de quais são as condições ótimas de luminosidade requerida por cada espécie para seu melhor desenvolvimento (MCMAHON; KELLY, 1995), ou seja, quais porções do espectro estão envolvidas nas respostas de cada planta.

As plantas conseguem perceber pequenas mudanças quanto ao regime luminoso ao seu redor, ou seja, pequenas modificações quanto à composição espectral (qualidade), direção, intensidade de luz (quantidade) ou duração do período luminoso podem acarretar adaptações em diversas funções vitais do crescimento e do desenvolvimento da planta (SHAHAK et al., 2004).

Os vegetais adaptam seu aparato fotossintético, juntamente com diversas características anatômicas, em resposta às diferentes condições de luz, e essas adaptações influenciarão, direta ou indiretamente, o crescimento (FRANKLIN; WHITELAM, 2005). A anatomia foliar pode ser grandemente influenciada pela radiação recebida durante o período de crescimento, uma vez que a folha é um órgão que apresenta elevada plasticidade, além de possuir estrutura interna que lhe permite adaptar-se às variadas condições ambientais (MARTINS et al., 2009; SCHLUTER et al., 2003). A qualidade da luz pode afetar várias características anatômicas, como densidade estomática e organização dos tecidos parenquimáticos, que poderão comprometer as trocas gasosas e limitar a assimilação de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

O desempenho das plantas em relação à energia solar incidente já tem sido investigado há muito tempo. Por isso, foram desenvolvidas algumas estratégias, como a utilização de telas, plásticos ou vidros, que visam simular diferentes espectros de absorção da radiação solar (BRANT et al., 2009). A manipulação espectral da radiação natural tem sido muito utilizada em casas de vegetação, principalmente por meio de coberturas coloridas que modificam a luz nas regiões espectrais do ultravioleta, do visível ou do vermelho-distante, o que favorece o aumento da quantidade de luz difusa em seu interior (OREN-SHAMIR et al., 2001).

A manipulação da luz com propósitos agrícolas tem longa história. Inicialmente, os esforços foram direcionados para o controle da quantidade de luz, no sentido de otimizá-la de acordo com os requerimentos de cada cultura. Em frutíferas, as abordagens mais comumente utilizadas para aumentar a interceptação de luz incluíam o planejamento do plantio, podas e o arqueamento de ramos das plantas (PALMER; AVERY; WERTHEIM, 1992). Porém, percebeu-se que as plantas respondiam não só à quantidade como também à qualidade da luz incidente. Essa resposta é mediada por diversos fotorreceptores baseados em pigmentos que dão início às várias fases do desenvolvimento da planta (SHAHAK et al., 2004). Há alguns anos teve início a aplicação de técnicas de manipulação da qualidade da luz através da iluminação artificial, coberturas refletivas/coloridas de solo e coberturas coloridas para estufas (RAJAPAKSE et al., 1999).

Shahak et al. (2004) apresentaram uma nova abordagem de manipulação da qualidade da luz que se baseia na filtração parcial do espectro da radiação solar por meio de malhas coloridas (*ColorNets*). Os autores citam que as malhas comuns possuem três principais funções na agricultura: i. sombreamento, para proteção da radiação solar excessiva; ii. proteção contra ameaças ambientais, tais como ventos fortes e granizo e iii. proteção contra pássaros, morcegos e insetos.

Logo, a tecnologia das malhas coloridas tem como objetivo combinar essa proteção física da cultura com a filtração específica da luz, promovendo respostas fisiológicas de interesse. Segundo os mesmos autores, essa tecnologia, que é considerada de baixo custo para o produtor, foi inicialmente utilizada para plantas ornamentais que eram cultivadas comercialmente sob malhas pretas. Assim, pesquisas foram realizadas com o objetivo de se determinar um tipo de sombreamento que pudesse apresentar desempenho maior que o da malha preta convencional, utilizando a espécie *Pittosporum variegatum*. A partir desses estudos, as malhas coloridas passaram a ser testadas também em espécies frutíferas, tais como uva, maçã, pêsego, caqui, romã, morango e outras (SHAHAK; GUSSAKOVSKY, 2004).

O uso de malhas coloridas, visando melhor eficiência do aparato fotossintético na captação e na utilização da radiação solar, já vem sendo testado para espécies medicinais (BRANT et al., 2009; MARTINS et al., 2009) e diversas outras ornamentais (KHATTAK; PEARSON; JOHNSON, 2004; NOMURA et al., 2009). As características modificadas são inúmeras, indo desde alterações na anatomia até modificações na altura e na produtividade das plantas.

Em *Pittosporum variegatum* verificou-se maior percentual de ramos de maior comprimento e peso sob malha vermelha em relação ao sombreamento com malha azul ou preta (OREN-SHAMIR et al., 2001). Maior crescimento em altura e número e tamanho de cloroplastos foram observados em plantas de *Ocimum selloi* cultivadas sob malhas coloridas (COSTA et al., 2010). Os autores também relatam que maior acúmulo de amido ocorreu a pleno sol e sob malha vermelha. Porém, acúmulo de biomassa seca total, relação raiz:parte aérea, densidade estomática e espessamento da epiderme adaxial e do parênquima esponjoso foram maiores nas plantas cultivadas a pleno sol.

Em cultivo de alface, foi observado que malhas vermelhas proporcionaram maior peso médio da cabeça quando comparadas com plantas

mantidas sob malhas azuis (GRINGBERGER; SHOMRON; GANELEVIN, 2005).

Em plantas de guaco (*Mikania laevigata*) cultivadas sob malha azul, as concentrações de clorofila a e b foram maiores (SOUZA et al., 2011). Diferentemente da espécie *Ocimum selloi*, a maior densidade de cloroplastos foi obtida nas plantas cultivadas a pleno sol.

Shahak et al. (2002) verificaram aceleração do crescimento vegetativo sob malha vermelha e atraso no crescimento sob malha azul, para as espécies *Aralia* sp., *Monstera deliciosa*, *Aspidistra elatior* e *Asparagus* sp.

Para a espécie *Zantedeschia* sp., o cultivo sob malha vermelha 40% aumentou o número de folhas e de flores, indicando que essa malha parece ter mais efeito na produtividade e altura de hastes (FAGNANI; LEITE, 2003).

Henrique et al. (2011) relatam que, para cafeeiros da cultivar Catucaí Amarelo, a malha vermelha foi a que proporcionou maiores valores para altura de plantas, área e massa de matéria-seca foliar e massa de matéria-seca total. Essa malha foi a que proporcionou mudas de café com maior vigor e qualidade.

O cultivo sob malhas amarelas promoveu a obtenção de cenouras com maiores teores de vitamina C e  $\beta$ -caroteno (ANTONIOUS; KASPERBAUER, 2002).

São diversos os trabalhos que envolvem a utilização de malhas coloridas e, graças a tantos resultados favoráveis obtidos, pode-se afirmar que o uso dessa tecnologia de baixo custo pode ser incorporado no manejo de muitas espécies, levando a resultados qualitativos e econômicos satisfatórios (SHAHAK et al., 2002). Assim, por meio da utilização de malhas coloridas, podem ser estabelecidas diferentes condições de cultivo por meio da manipulação da intensidade e da qualidade espectral que irão modificar a intensidade e a composição da luz transmitida para as plantas, melhorando o rendimento das culturas (OREN-SHAMIR et al., 2001).

### 2.3 Obtenção de brotações múltiplas

O sucesso da formação e da regeneração da maioria das plantas depende do balanço entre os diversos fitohormônios, tais como auxinas e citocininas. Porém, são as citocininas as principais substâncias responsáveis pelo controle dos processos de formação e regeneração de brotos (MAGYAR-TÁBORI et al., 2010).

As citocininas estão envolvidas em vários processos fisiológicos, atuando desde a senescência foliar e a mobilização de nutrientes até a dominância apical e a formação e atividade de meristemas apicais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Essas substâncias têm um papel muito importante na regeneração de brotações durante o período de indução (YANG et al., 2010). Algumas substâncias pertencentes a esse grupo, tais como 6-benzilaminopurina (BAP), TDZ/Thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-thidiazol-5-il-urea), cinetina e zeatina, induzem à formação de brotos em uma grande variedade de plantas (GRAÇA et al., 2001).

A concentração e o tipo dessas substâncias influenciam a multiplicação *in vitro* e as concentrações que normalmente são utilizadas estão em um intervalo de 0,0 e 5,0 mg/L (MORALES et al., 1999). Dentre as citocininas, o BAP tem sido muito utilizado em trabalhos de cultura de tecidos, sendo adicionado ao meio de cultura ou em combinação com outros reguladores (CARVALHO et al., 1997).

Quando o nível de citocininas supera o de auxinas, a formação de brotações é favorecida (KRIKORIAN, 1995; WAGNER JÚNIOR; COUTO; QUEZADA, 2003). Devido a isso, quase a totalidade dos trabalhos que visam à ocorrência de organogênese *in vitro* fazem uso de citocininas, de forma a suplementar o meio de cultura (SILVA, 2001).

Os reguladores do grupo das citocininas têm atuação na quebra da dominância apical dos brotos (ERIG; SCHUCH, 2006) e no controle das divisões celulares (TAIZ; ZEIGER, 2009), resultando no aumento da taxa de multiplicação. Devido às suas funções, a aplicação de citocininas ao meio de cultura com a finalidade de favorecer a organogênese tem se tornado uma prática de rotina. Os pesquisadores buscam alcançar as melhores taxas de multiplicação de plantas sem anormalidades, testando várias concentrações de determinado regulador (CHRISTENSEN et al., 2008) ou a combinação deles (KIM et al., 2007; MORALES et al., 1999), assim como testar vários tipos de explante (VENKATACHALAM; JAYABALAN, 1997).

Em estudo com o porta-enxerto de ameixeira ‘Julior’, a combinação de diferentes concentrações de BAP e AIB acarretou diferentes respostas quanto ao número de brotações, em que a concentração de 0,6 mg/L de BAP proporcionou os melhores resultados, enquanto as concentrações do AIB não tiveram influência na taxa de multiplicação (WAGNER JÚNIOR; COUTO; QUEZADA, 2003).

Múltiplas brotações de beterraba foram obtidas cultivando-se ápices da inflorescência em meio de cultura suplementado com BAP e ANA (YANG et al., 2004).

Elevada produção de brotos também foi observada quando se adicionou BAP (8 $\mu$ M) e ANA (1 $\mu$ M) em meio para cultivo de bambu (*Dendrocalamus hamiltonii*) (AGNIHOTRI; MISHRA; NANDI, 2009).

A concentração de 5  $\mu$ M de TDZ favoreceu o maior percentual de gemas em internódios de videira cv. Merlot (CARVALHO et al., 2011).

Em grão de bico, observou-se que, em concentrações de BAP menores que 7,5  $\mu$ M, a formação de brotos acontecia em um intervalo de 30 dias, enquanto, para concentrações maiores (75-100  $\mu$ M), essa formação era obtida



em 45 a 90 dias. Concentrações mais altas também prejudicaram o enraizamento dos brotos (POLISETTY et al., 1997).

Em experimento para avaliar a ação do BAP e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de duas cultivares de macieira ('Galaxy' e 'Maxigala'), os autores concluíram que o BAP é indispensável para a multiplicação, tendo a concentração de 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP, combinada com utilização de luzes branca e vermelha, produzido melhores resultados para taxa de multiplicação de brotos de maçã (ERIG; SCHUCH, 2006).

Outro detalhe importante no processo de formação de múltiplos brotos induzida por reguladores de crescimento é que a estabilidade genética das brotações deve ser mantida, ou seja, o conteúdo de DNA não pode sofrer mudanças. Karp (1995) salienta o fato de que a aplicação de concentrações inadequadas de reguladores, como as citocininas, pode levar à ocorrência de mutantes, devido aos efeitos maléficos durante as divisões celulares, ocasionando desestabilização da constituição genética, dando origem a plantas com diversas anormalidades, denominadas de variantes somaclonais.

Yang et al. (2010) avaliaram a homogeneidade genética de plantas regeneradas a partir de segmentos cotiledonares de algodão cultivados em meio MSB (MS + vitaminas do B5) suplementado com 4,0 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de TDZ e posteriormente cultivados em meio com 2 mg/L de BAP. Estes autores verificaram, pela técnica de citometria de fluxo e contagem de cromossomos, que as plantas regeneradas e suas brotações apresentaram conteúdo de DNA similar ao daquelas plantas originais, sendo consideradas geneticamente estáveis.

## 2.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida no final da década de 1950, com a finalidade de promover a contagem e a análise de células sanguíneas humanas, principalmente nas áreas da hematologia e imunologia (CÔRTE-REAL et al., 2002). Durante muitos anos, essa técnica foi sendo aperfeiçoada por meio da obtenção de protocolos mais adequados, devido à utilização de novos marcadores fluorescentes (fluorocromos) e tampões de extração, fazendo com que ela pudesse ser direcionada também aos estudos que envolvessem células vegetais (DOLEZEL, 1997).

O primeiro trabalho em que se utilizou a citometria de fluxo em vegetais data de 1973, quando o botânico alemão Friedrich Otto Heller verificou sinais de fluorescência de núcleos isolados de *Vicia faba* (HELLER, 1973). Mas, foi apenas no início dos anos 1980, depois de inúmeras pesquisas, que a citometria de fluxo começou a ter significativas aplicações em células vegetais, tornando-se uma técnica rotineira em muitos laboratórios em todo o mundo (DOLEZEL, 1991).

Desde então, a citometria de fluxo tem sido explorada em múltiplas aplicações, tais como estudos de determinação de conteúdo de DNA de espécies, análise de ploidias (detecção de plantas haploides e linhas di-haploides, detecção de novos níveis de ploidia, detecção de híbridos interespecíficos, controle da estabilidade do nível de ploidia, detecção de aneuploidias e taxonomia), estimativa do tamanho do genoma e outras aplicações mais específicas, tais como análises de ciclo celular e de genotoxicidade (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

O princípio dessa técnica baseia-se na análise das propriedades ópticas de partículas que fluem em uma suspensão líquida. Tais partículas em suspensão movem-se imersas em um fluido (tampão de extração) no interior de um capilar

dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo (RIESEBERG et al., 2001). Essas partículas são introduzidas no interior de uma câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente ('sheath fluid'), o qual apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida. Elas são forçadas a moverem-se individualmente no centro do fluxo, fenômeno esse conhecido como focagem hidrodinâmica (DOLEZEL, 1997). Essas partículas intersectam, uma a uma, o feixe de *laser*, ocorrendo um processo de dispersão da luz e/ou emissão de fluorescência (DOLEZEL; BARTOS, 2005). Certas moléculas, que perdem energia por fluorescência emitindo luz (fluorescência), quando excitadas, são separadas pela utilização de uma série de espelhos dicróicos, filtros e fotomultiplicadores (EECKHAUT; LEUS; HUYLENBROECK, 2005). Assim, é possível separá-las da fluorescência emitida por diferentes moléculas excitadas pela mesma fonte de luz, utilizando espelhos dicróicos (KACHEL; MESSESCHMIDT; HUMMEL, 1990). Os circuitos dentro do aparelho convertem esses sinais fluorescentes em valores digitais que são armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007; OCHATT, 2008). Devido ao fato de as partículas serem analisadas individualmente e em alta velocidade, grandes populações podem ter o conteúdo de DNA mensurado em curto espaço de tempo. Além disso, é possível detectar a presença de subpopulações (SHAPIRO, 2004).

Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração dessa amostra com fluorocromos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de material genético. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas. No entanto, a estimativa do conteúdo de DNA nuclear foi a primeira

e ainda continua a ser a principal aplicação da citometria de fluxo em vegetais (LOUREIRO; SANTOS, 2004). Na cultura de tecidos, a técnica de citometria de fluxo torna-se muito útil na identificação de variação somaclonal que ocorre com certa frequência em materiais micropropagados muito antigos ou submetidos a tratamentos com doses elevadas de fitorreguladores. A ocorrência de variação somaclonal pode causar o desenvolvimento de plantas de porte modificado, bem como com folhas lanceoladas ou variegadas (SAHIJRAM; SONEJI; BOLLAMMA, 2003). Essas anormalidades prejudicam o crescimento e o desenvolvimento vegetal, e a detecção desses problemas, antes das plantas irem para o campo, nem sempre é fácil. Dessa forma, a citometria de fluxo é uma técnica que pode contribuir, a partir de estimativas do conteúdo de DNA, para a detecção inicial de plantas anormais.

#### **2.4.1 Coeficiente de variação na citometria de fluxo**

O coeficiente de variação (CV) é uma medida de dispersão que tem a finalidade de comparar distribuições diferentes, expressando a variabilidade dos dados (COSTA; SERAPHIN; ZIMMERMANN, 2002). Essa medida é definida pelo desvio padrão ( $\sigma$ ) dividido pela média ( $\mu$ ):

$$CV = \frac{\sigma}{\mu}$$

Segundo Scapim, Carvalho e Cruz (1995), é muito importante que exista um coeficiente que possa estimar a precisão de experimentos, uma vez que todos os ensaios são comparados, e o coeficiente de variação é uma das medidas estatísticas mais utilizadas pelos pesquisadores na avaliação da precisão de ensaios (COSTA; SERAPHIN; ZIMMERMANN, 2002).

Na citometria de fluxo, o coeficiente de variação é uma medida muito importante para se verificar a precisão dos picos das distribuições nos

histogramas, de forma que quanto menor for o CV maior será a precisão. A variação do pico é, geralmente, estimada pelo coeficiente de variação na metade do pico (LOUREIRO, 2007). Ao contrário do desvio padrão, o CV não depende da média do pico, permitindo, assim, uma comparação direta de picos posicionados em diferentes canais (DOLEZEL; BARTOS, 2005). Segundo Loureiro (2007), normalmente são obtidos valores para o CV na faixa de 1% a 10%, para estudos com células vegetais. De acordo com Marie e Brown (1993), o CV é um critério elementar na validação de métodos citológicos e definem uma gama de valores entre 1% e 2%, para análises de alta qualidade e 3% como valor de rotina. Para algumas espécies que apresentam certas peculiaridades, tais como grandes quantidades de compostos citosólicos ou pequeno tamanho do genoma, esses valores são mais difíceis de alcançar, de forma que CVs com valores menores que 5% são aceitáveis (GALBRAITH et al., 2002).

Além de ser dependente do material vegetal, o CV também é muito influenciado pelo tipo de fluorocromo utilizado, pelo preparo das amostras e pelo tampão de extração utilizado para lise das células (LOUREIRO, 2007).

#### **2.4.2 Fatores que afetam a confiabilidade das análises**

Inúmeros são os problemas encontrados nas análises de citometria de fluxo, os quais poderão influenciar os valores para o coeficiente de variação, ocasionando precisões sub ou superestimadas, que acarretarão interpretações inadequadas dos resultados (DOLEZEL; BARTOS, 2005; LOUREIRO, 2007). Dentre os fatores que podem modificar os valores de CV das análises podem ser citados os seguintes:

*i.* material vegetal e preparo das amostras: recomenda-se a utilização de tecidos foliares frescos, ou seja, recém-coletados e que estejam livres de

doenças. Porém, outros tecidos também podem ser utilizados se os resultados obtidos a partir da folha mostrarem-se insatisfatórios (LOUREIRO, 2007). O material fresco deve ser mantido a baixas temperaturas, até o local onde deverá ser feito o preparo das amostras (DOLEZEL; BARTOS, 2005). A quantidade de material vegetal também dependerá da espécie em estudo. Normalmente, são necessárias de 20 a 100 mg de tecido foliar para a grande maioria das espécies. Em espécies com elevadas quantidades de compostos citosólicos ou em amostras provenientes de sementes ou calos *in vitro*, normalmente, são requeridas menores quantidades de material vegetal (LOUREIRO, 2007). Materiais congelados também podem ser estratégias de armazenamento (SUDA; TRAVNICEK, 2006);

ii. tampão de extração: o tampão está relacionado ao isolamento dos núcleos. A composição do tampão é muito importante para que ocorra a liberação de núcleos intactos e livres de citoplasma aderente, bem como para a manutenção da estabilidade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). O tampão também contribui para a proteção contra a degradação por enzimas endonucleases e por danos ocasionados por compostos do citosol, como clorofilas e alguns metabólitos secundários (DOLEZEL et al., 2007). Existem inúmeros tampões de extração, tais como LB01, Otto I, Otto II, Galbraith, Marie e Tris.MgCl<sub>2</sub>, que são desenvolvidos por laboratórios de pesquisa em todo o mundo, com a finalidade de otimizar os protocolos de isolamento de núcleos de acordo com a espécie em estudo (LOUREIRO, 2007). Dessa forma, antes de dar início às análises no citômetro de fluxo, é necessário que diversos tampões sejam testados para a espécie de interesse, de modo a melhorar os histogramas obtidos, o que contribuirá para menores valores de CV;

iii. fluorocromos: são as substâncias que irão se ligar às moléculas de DNA e absorver energia de um comprimento de onda específico, emitindo a fluorescência que será registrada pelo citômetro de fluxo. Os tipos de fluorocromos geralmente são divididos de acordo com o modo como se intercalam nas bases do DNA (ORMEROD, 2008). Mitramicina, cromomicina, olivomicina são fluorocromos que se ligam aos pares de bases G-C, enquanto DAPI e corantes Hoechst se intercalam aos pares de bases A-T. Esses fluorocromos são exemplos de substâncias altamente específicas a moléculas de DNA, porém, o uso deles pode levar a estimativas incorretas acerca do conteúdo de DNA, pois serão obtidas estimativas apenas dos pares de bases aos quais essas substâncias se ligam (DYKE; DERVAN, 1983; PORTUGAL; WARING, 1988). Segundo Cowden e Curtis (1981), o corante DAPI é muito utilizado nas análises de citometria de fluxo por não ser influenciado pela estrutura da cromatina, o que irá acarretar em picos de baixo coeficiente de variação. O iodeto de propídeo, outro fluorocromo intercalante muito utilizado, também mostra resultados com menores valores de CV (YANPAISAN; KING; DORAN, 1999).

Assim, antes das análises propriamente ditas, deverão ser realizados testes com os diversos fluorocromos, para avaliar a eficácia de cada um deles nos diferentes tipos de tecidos, como se deve proceder com os tampões de extração.

#### **2.4.3 Principais softwares utilizados**

Atualmente, estão disponíveis, para pesquisa, inúmeros softwares que são utilizados em análises de citometria de fluxo. Alguns exemplos são: CellQuest<sup>TM</sup>, FCS Express<sup>TM</sup>, VenturiOne<sup>TM</sup>, Kaluza<sup>TM</sup> e WinList<sup>TM</sup>. Adicionalmente, existem inúmeros outros aplicativos gratuitos que também são

utilizados nessa linha de pesquisa, tais como WinMDI™, Cyflogic™, MFI™, Analyse™ e IDLYK™. Possivelmente esses softwares podem apresentar pequenas diferenças quanto aos valores das estimativas do conteúdo de DNA da amostra em questão e coeficiente de variação obtido na análise (CHI, 2010).

Um estudo comparativo entre esses programas poderia auxiliar na obtenção de resultados mais confiáveis e precisos. Segue a descrição dos quatro softwares estudados neste trabalho.

#### **2.4.3.1 CellQuest™ Pro**

O software CellQuest™ Pro foi desenvolvido pela empresa BD Biosciences e acompanha o citômetro de fluxo FACSCalibur e similares produzido pela mesma. É um programa que permite a obtenção e análise de informações a partir de citômetro de fluxo acoplado a um computador com sistema operacional Mac® OS X, desenvolvido pela Apple Computer, Inc. Por meio desse software, é possível criar diversos tipos de plotagens, incluindo plotagens de contorno multicoloridas e histogramas sobrepostos, além de gerar estatísticas para gráficos de pontos, histogramas, gráficos de densidade, plotagens 3D e plotagens de contorno. Esse programa dispõe de uma versátil paleta de ferramentas gráficas que auxilia na produção de documentos de qualidade (BECTON DICKINSON BIOSCIENCES - BD BIOSCIENCES, 2002).

O CellQuest™ deve ser utilizado juntamente com um dos seguintes citômetros de fluxo: BD FACSCalibur™, BD FACScan™, BD FACSort™ ou BD™ LSR, e também aqueles da família BD FACSVantage™ (BD FACSVantage, BD FACSVantage SE ou BD FACSVantage SE com a opção BD FACSDiVa). A plataforma requerida para o computador é a BD FACStation™ Power MacIntosh® G4, adquirida através da BD Biosciences.



Várias são as estatísticas apresentadas por este programa, dentre elas: níveis e limites de marcação, número de eventos, média, média geométrica (Gmean), desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV), mediana, pico e canal do pico, entre outras.

O coeficiente de variação é dado pelo desvio padrão dividido pela média dos dados e, nesse programa, é apresentado em porcentagem. Quando o CV é aplicado aos dados do canal medido em uma população de células, ele constitui uma medida da variação independente da média populacional (BD BIOSCIENCES, 2002).

As médias e as médias geométricas também podem ser calculadas neste programa. As médias geométricas são preferíveis quando se trabalha com populações distorcidas. As equações para a obtenção de ambas são as seguintes:

$$\text{média} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\text{média geométrica} = 10^{\frac{\sum \log(X_i)}{n}}$$

em que  $X_i$  é o valor do canal ou o valor linear para o  $i$ -ésimo evento e  $n$  é o número de eventos utilizados no cálculo.

#### 2.4.3.2 WinMDI™ 2.8

O Windows Multiple Document Interface, ou WinMDI™, é um *software* gratuito desenvolvido pelo pesquisador Joe Trotter, juntamente com os Laboratórios de Citometria da Universidade de Purdue, com o objetivo de analisar arquivos de dados obtidos por meio de citometria de fluxo. Esse programa necessita do sistema operacional Microsoft Windows XP ou anterior

para funcionamento adequado. Pode ser utilizado para realizar análises de leituras obtidas em citômetros do tipo FACSCalibur™ (GREGORI; RAGHEB; ROBINSON, 2004).

Por meio desse programa podem ser obtidas informações de porcentagem total de eventos, marcadores, média, média geométrica, coeficiente de variação, mediana e valor do pico em dado canal, entre outras. Análises dos atributos celulares também podem ser obtidas, porém, a gama de ferramentas é menor quando comparada às dos demais programas.

Usuários afirmam que o WinMDI™ subestima os valores de CV, levando a se pensar que este seja o programa que confira maior precisão das análises. Além disso, por algumas vezes, nas análises do padrão de referência, a média geométrica aparece com valor zero, o que evidencia um erro do programa.

Embora o WinMDI™ não seja compatível com alguns dos mais recentes instrumentos da citometria de fluxo, ele pode ser útil em análises mais básicas.

#### **2.4.3.3 FlowJo™**

O FlowJo™ é um software pago, desenvolvido pela empresa Tree Star, com a finalidade de realizar diversos tipos de análises celulares, tais como ciclo celular, análises de ploidia, proliferação e cinética. É considerado um dos melhores softwares do mercado na atualidade, sendo, muitas vezes, o favorito entre os pesquisadores. Esse programa pode realizar tanto análises mais simples quanto nas mais avançadas (TREE STAR, 2011).

Pode ser utilizado em computadores que tenham sistema operacional Macintosh ou Microsoft Windows, sendo, para este último, necessário que o computador apresente a linguagem de programação Java 1.6. É um dos poucos programas compatíveis com o Mac para análises *offline*. Assim como nos programas CellQuest™ e WinMDI™, pode ser utilizado para realizar análises de

leituras obtidas em citômetros do tipo FACSCalibur™. Tem boa compensação de cores (tanto manual como automática), que representa a sobreposição espectral em células marcadas com vários tipos de fluorocromos. O programa apresenta uma janela de trabalho que exibe todas as amostras e suas variáveis analisadas, na qual os usuários podem organizar e gerenciar seus dados. É mais apropriado para instalações centrais e usuários individuais. Para análise de dados *offline*, o FlowJo™ é um dos programas dominantes do mercado (CHI, 2010). Porém, também apresenta algumas desvantagens, como lentidão na execução de grandes conjuntos de dados e custo para instalação (TREE STAR, 2011). Oferece muito mais do que um usuário médio de citometria de fluxo necessita, não apresentando uma versão mais compacta e leve.

#### **2.4.3.4 FCS Express™**

O FCS Express™ é um software conhecido pela acessibilidade no mercado e por ser altamente personalizável. É apropriado para diferentes usuários, desde iniciantes até níveis mais avançados (DE NOVO SOFTWARE, 2010). A interface do usuário é muito parecida com o do Microsoft PowerPoint.

Para sua utilização, o programa necessita de qualquer um dos sistemas operacionais da Microsoft Windows. É de fácil utilização para qualquer usuário que já tenha trabalhado com o Microsoft Office e os dados podem ser facilmente gerados em arquivos do Power Point.

Este software possui muitas vantagens, tais como permitir o compartilhamento de estratégias com outros colaboradores, no caso da versão gratuita FCS Express™ 3.0. Reader; permitir que usuários casuais analisem experimentos com um ou dois fluorocromos em vez de 18, no caso da versão 'lite' e as análises estatísticas são alteradas automaticamente quando o usuário modifica suas análises, as quais devem estar vinculadas com algumas

ferramentas do programa (DE NOVO SOFTWARE, 2010). Realiza análises de histogramas, dot plots, gráficos de contorno, densidade, superfície, dispersão e barras, ciclo celular, cinética e proliferação. Suporta ampla gama de recursos estatísticos, porém, não é tão rico em recursos como o programa FlowJo™. Possui análises de ciclo celular e proliferação, mas não apresenta muitas aplicações de alto nível.

## REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, R. K.; MISHRA, J.; NANDI, S. K. Improved *in vitro* shoot multiplication and rooting of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro: production of genetically uniform plants and field evaluation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Pozann, v. 31, n. 5, p. 961-967, May 2009.
- ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. O afilhamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 393-400, maio/jun. 2001.
- ANTONIOUS, G. F.; KASPERBAUER, M. J. Color of light reflected to leaves modifies nutrient of carrot roots. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 4, p. 1211-1216, Apr. 2002.
- ANTONOPOLU, C. et al. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 48, n. 4, p. 549-553, Apr. 2004.
- ASSAD, M. L. L.; ALMEIDA, J. Agricultura e sustentabilidade: contextos, desafios e cenários. **Ciência & Ambiente**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 15-30, 2004.
- BECTON DICKINSON BIOSCIENCES. **BD CellQuest Pro software user's guide**. Fraklin Lakes, 2002. 258 p.
- BELTRÃO, N. E. M.; FIDELES FILHO, J.; FIGUEIRÊDO, I. C. M. Uso adequado de casa-de-vegetação e de telados na experimentação agrícola. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 3, p. 547-552, 2002.
- BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa* sp.) cv. 'Caipira' (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.
- BRANT, R. S. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1401-1407, set./out. 2009.
- CARVALHO, D. C. et al. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 108-114, jan./fev. 2011.

- CARVALHO, G. R. et al. Efeito do triadimenol e benzilaminopurina no desenvolvimento de brotos *in vitro* do cafeeiro cv. 'Catuaí'. **Revista Unimar**, Marília, v. 19, n. 3, p. 767-775, 1997.
- CASTRO, C. R. T.; CARVALHO, M. M. Florescimento de gramíneas forrageiras cultivadas sob luminosidade reduzida. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 163-166, jan./fev. 2000.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- CHI, K. R. Let the data flow: rethink your data analysis tools for flow cytometry. **The Scientist**, Ontario, v. 24, n. 6, p. 63-65, June 2010.
- CHRISTENSEN, B. et al. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 93, n. 2, p. 151-161, 2008.
- CÔRTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, v. 71, n. 1, p. 19-33, 2002.
- COSTA, F. H. S. et al. Modificações na anatomia foliar de bananeiras durante o processo de micropropagação. **Interciência**, Caracas, v. 33, n. 9, p. 663-667, 2008.
- COSTA, L. C. B. et al. Effects of coloured shade netting on the vegetative development and leaf structure of *Ocimum selloi*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 2, p. 349-359, 2010.
- COSTA, N. H. A. D.; SERAPHIN, J. C.; ZIMMERMANN, F. J. P. Novo método de classificação de coeficientes de variação para a cultura do arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 243-249, 2002.
- COWDEN, R. R.; CURTIS, S. K. Cephalopods. In: \_\_\_\_\_. **Invertebrate blood cells: general aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods**. New York: Academic, 1981. p. 301-323.
- DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem e evolução. In: ALVES, E. J. (Org.). **Banana para exportação: aspectos técnicos**

de produção. 2. ed. rev. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1997. p. 9-13. (Série Publicações Técnicas Frupex, 18).

DE NOVO SOFTWARE. **FCS express users manual**. 4<sup>th</sup> ed. Los Angeles, 2010. 1433 p.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana***: alterações anatômicas e fisiológicas. 2006. 132 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 38, n. 3, p. 258-302, June 1997.

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

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

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

DYKE, W. W. van; DERVAN, P. B. Chromomycin, mithramycin and olivomycin binding sites on heterogeneous deoxyribonucleic acid: footprinting with (methidiumpropyl-EDTA) iron(II). **Biochemistry**, Washington, v. 22, n. 10, p. 2373-2377, May 1983.

ECKERT, M.; KALDENHOFF, R. Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 51, n. 349, p. 1435-1442, 2001.

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

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 151-155, 2006.

FAGNANI, M. A.; LEITE, C. A. Produção de copo-de-leite colorido, *Zantedeschia sp.* em telado de malha termorefletora e foto conversora vermelha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO DE CULTURA DE TECIDO DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 1 CD-ROM.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Final 2010 data now available**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 21 dez. 2011.

FRANKLIN, K. A.; WHITELAM, G. C. Phytochromes and shadeavoidance responses in plants. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 2, p. 169-175, Feb. 2005.

FREITAS, R. B. et al. Influência de diferentes níveis de sombreamento no comportamento fisiológico de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 804-810, jul./ago. 2003.

FUKUDA, N. et al. Directional blue light irradiation triggers epidermal cell elongation of abaxial side resulting in inhibition of leaf epinasty in geranium under red light condition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 176-182, Jan. 2008.

GALBRAITH, D. W. et al. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J. et al. (Ed.). **Current protocols in cytometry**. New York: J. Wiley, 2002. p. 7.6.1-7.6.22.

\_\_\_\_\_. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GRAÇA, M. E. C. et al. Efeitos das citocininas benzilaminopurina e thidiazuron na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 43, n. 1, p. 107-112, 2001.



GREGORI, G.; RAGHEB, K.; ROBINSON, J. P. **Introduction to WinMDI 2.8 (J. Trotter) for the analysis of flow cytometry listmode data files**. Purdue: Purdue University Cytometry Laboratories, 2004. 30 p.

GRINGBERGER, A.; SHOMRON, M.; GANELEVIN, R. **Shading nets testing**. Disponível em:  
<<http://www.polysack.com/files/9cdc41ead551379aff948702623148f2.pdf>>.  
Acesso em: 15 dez. 2011.

HANBA, Y. T.; KOGAMI, H.; TERASHIMA, I. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1021-1030, Aug. 2002.

HELLER, F. O. DNA-measurement of *Vicia faba* L. with pulse cytophotometry. **Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Stuttgart, v. 86, n. 5/9, p. 437-441, 1973.

HENRIQUE, P. C. et al. Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de mudas de café cultivadas sob telas de diferentes colorações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 5, p. 458-465, maio 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em:  
<<http://www.IBGE.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl1.asp?c=1613&n=0&u=0&z=p&o=23&i=P>>. Acesso em: 5 nov. 2011.

JENNY, C. F. et al. Les bananiers. In: HAMON, P. et al. (Ed.). **Diversité génétique des plantes tropicales**. Montpellier: Cirad, 1999. p. 113-139.

JIAO, Y.; LAU, O. S.; DENG, X. W. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, n. 3, p. 217-230, Mar. 2007.

KACHEL, V.; MESSESCHMIDT, R.; HUMMEL, P. Eight-Parameter PC-AT based flow cytometric data system. **Cytometry**, New York, v. 11, n. 7, p. 805-812, Mar. 1990.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 295-302, Feb. 1995.

KASPERBAUER, M. J.; HAMILTON, J. L. Chloroplast structure and starch grain accumulation in leaves that received different red and far-red levels during development. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 74, n. 4, p. 967-970, Apr. 1984.

KHATTAK, A. M.; PEARSON, S.; JOHNSON, C. B. The effects of far red spectral filters and plant density on the growth and development of chrysanthemums. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 335-341, Nov. 2004.

KIM, K. M. et al. Production of multiple shoots and plant regeneration from leaf segments of fig tree (*Ficus carica* L.). **Journal of Plant Biology**, New York, v. 50, n. 4, p. 440-446, Aug. 2007.

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones**. 2<sup>nd</sup> ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 774-796.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: Pedagógica Universitária, 1986. 319 p.

LEONEL, S.; DAMATTO JUNIOR, E. R. Caracterização das áreas de cultivo da bananeira 'maçã' na região de Ribeira do Sul/SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 958-965, jul./ago. 2007.

LOUREIRO, J. C. M. **Flow cytometric approaches to plant genomes**. 2007. 246 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Aveiro, Coimbra, 2007.

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

MACEDO, A. F. et al. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on plantlets of *Alternanthera brasiliana* cultured under different spectral quality of lights. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 4, p. 515-519, Aug. 2004.

MAGYAR-TÁBORI, K. et al. The role of cytokinins in shoot organogenesis in Apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 101, n. 3, p. 251-267, June 2010.

MARIE, D.; BROWN, S. C. Acytometric exercise in plant DNA histograms, with 2c values for seventy species. **Biology of the Cell**, London, v. 78, n. 1, p. 41-51, 1993.

MARTINS, J. R. et al. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 82-87, jan./fev. 2009.

MCMAHON, M. J.; KELLY, J. W. Anatomy and pigments of chrysanthemum leaves developed under spectrally selective filters. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 203-209, Nov. 1995.

MEIRELLES, A. J. A. et al. Influência de diferentes sombreamentos e nutrição foliar no desenvolvimento de mudas de palmeira ráfia *Rhapis excelsa* (Thunberg) Henry ex. Rehder. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1884-1887, nov./dez. 2007.

MIRALLES, J. et al. *Rhamnus alaternus* growth under four simulated environments: morphological, anatomical and physiological responses. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, n. 4, p. 562-570, Feb. 2011.

MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 3-35.

NOMURA, E. S. et al. Crescimento e produção de antúrio cultivado sob diferentes malhas de sombreamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1394-1400, set./out. 2009.

OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry Part A**, New York, v. 73A, n. 7, p. 581-598, July 2008.

OREN-SHAMIR, M. et al. Coloured shade nets can improve the yield and quality of Green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 353-361, 2001.

ORMEROD, M. **Flow cytometry: a basic introduction**. Oxford: BPR, 2008. 116 p.

PALMER, J. W.; AVERY, D. J.; WERTHEIM, S. J. Effect of apple tree spacing and summer pruning on leaf area distribution and light interception. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 52, n. 4, p. 303-312, Dec. 1992.

PARADISO, R. et al. Spectral dependence of photosynthesis and light absorbance in single leaves and canopy in rose. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, n. 4, p. 548-554, Feb. 2011.

POLISETTY, R. et al. Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 8, p. 565-571, May 1997.

PORTUGAL, J.; WARING, M. Assignment of DNA binding sites for dapi and bisbenzimidazole (hoeschst 33258): comparative footprinting study. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 949, n. 1, p. 158-168, 1988.

RAJAPAKSE, N. C. et al. Plant height control by photoselective filters: current status and future prospects. **HorTechnology**, Alexandria, v. 9, n. 4, p. 618-624, 1999.

RIESEBERG, M. et al. Flow cytometry in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3/4, p. 350-360, Aug. 2001.

ROELS, S. et al. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 82, n. 1, p. 57-66, Jan. 2005.

RUNKLE, E. S.; HEINS, R. D. Specific functions of red, far red and blue light in flowering and stem extension of long-day plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 126, n. 3, p. 275-282, June 2001.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J. R.; BOLLAMMA, K. T. Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, New York, v. 39, n. 6, p. 551-556, Nov. 2003.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1035-1042, set./out. 2001.

SANTOS, V. P. et al. Fertirrigação da bananeira variedade fertirrigação da bananeira variedade Prata-Anã com N e K em um argissolo vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 567-573, jun. 2009.

SCAPIM, C. A.; CARVALHO, C. G. P.; CRUZ, C. D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 683-686, maio 1995.

SCHLUTER, U. et al. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 54, n. 383, p. 867-874, 2003.

SCHUERGER, A.; BROWN, C. S.; STRYJEWSKI, E. C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 3, p. 273-282, Mar. 1997.

SHAHAK, Y. et al. Color nets: a new approach for light manipulation in fruit trees. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 636, p. 609-616, Apr. 2004.

\_\_\_\_\_. Growing Aralia and Monstera under colored shade nets. **Olam Poreah**, v. 13, n. 1, p. 60-62, 2002.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E. E. ColorNets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 659, n. 1, p. 143-151, 2004.

SHAPIRO, H. M. The evolution of cytometers. **Cytometry Part A**, New York, v. 58A, n. 1, p. 13-20, 2004.

SHIRANI, S.; MAHDAVI, F.; MAZIAH, M. Morphological abnormality among regenerated shootsof banana and plantain (*Musa* spp.) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 21, p. 5755-5761, 2009.

SILVA, P. C. **Organogênese *in vitro* em explantes de epicótilo de tangerina ‘Cleópatra’**. 2001. 100 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

SILVA, S. O. et al. Avaliação de clones de banana Cavendish. **Ciência e Agroecologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 832-837, set./out. 2006.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, 2002. 463 p.

SOUZA, G. S. et al. Características biométricas e fisiológicas de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 330-335, 2010.

\_\_\_\_\_. Teores de pigmentos fotossintéticos, taxa de fotossíntese e estrutura de cloroplastos de plantas jovens de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (guaco) cultivadas sob malhas coloridas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-13, 2011.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. **Banana**. 3<sup>th</sup> ed. London: Longmans, 1987. 468 p.

SUDA, J.; TRAVNICEK, P. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry: new prospects for plant research. **Cytometry Part A**, New York, v. 69A, n. 4, p. 273-280, Apr. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TREE STAR. **FlowJo basic tutorial**. Ashland, 2011. 29 p.

VENKATACHALAM, P.; JAYABALAN, N. Effect of auxins and cytokinins on efficient plant regeneration and multiple-shoot formation from cotyledons and cotyledonary-node explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) by *in vitro* culture technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Indianapolis, v. 67, n. 3, p. 237-247, Sept. 1997.

VILLAR-SALVADOR, P. et al. Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performance relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 196, n. 2/3, p. 257-266, July 2004.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; QUEZADA, A. C. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira 'Julior'. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 121-124, 2003.

YANG, A. et al. Induction of multiple bud clumps from inflorescence tips and regenerations of salt-tolerant plantlets in *Beta vulgaris*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 29-34, 2004.

YANG, X. Y. et al. Multiple shoots induction in wild cotton (*Gossypium bickii*) through organogenesis and the analysis of genetic homogeneity. **Biologia**, Bratislava, v. 63, n. 3, p. 496-503, June 2010.

YANPAISAN, W.; KING, N. J.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 17, n. 1, p. 23-27, Mar. 1999.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERÍSTICAS DA ANATOMIA FOLIAR DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE BANANEIRA (*Musa sp.*) CULTIVADOS SOB MALHAS COLORIDAS**



## RESUMO

A manipulação espectral da radiação solar por meio da utilização de malhas coloridas em cultivos em estufa, casa de vegetação ou a pleno sol tem sido considerada uma estratégia de baixo custo para o produtor, além de apresentar resultados interessantes para diferentes características, tanto fisiológicas como morfológicas. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da qualidade espectral da luz por meio do uso de malhas coloridas sobre diferentes características anatômicas de plantas jovens de bananeira. Plantas de bananeira dos genótipos 'Maçã', 'Thap Maeo', 'Caipira', 'Princesa' e 'PA 42-44', oriundas de micropropagação, foram cultivadas sob malhas nas cores azul, branca, preta e vermelha. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 5x4, sendo cinco genótipos e quatro cores de malhas, constituindo 20 tratamentos em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições. A coleta das folhas para as avaliações anatômicas foram realizadas após noventa dias de aclimatização nos cinco ambientes. Para isso, foram coletadas folhas bandeiras de cinco plantas de cada genótipo. As amostras foram fixadas em FAA<sub>70%</sub> e armazenadas em etanol<sub>70%</sub>. Foram realizadas secções paradermicas e transversais do material. As lâminas semipermanentes foram montadas, observadas em microscópio óptico e fotografadas. As características avaliadas foram: funcionalidade dos estômatos, densidade estomática e espessuras de epiderme, hipoderme, parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. As medições foram feitas utilizando-se o programa ImageTool 3.0 e os dados foram submetidos à análise de variância, pelo programa SISVAR e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os resultados mostram que a utilização das malhas coloridas proporciona respostas diferenciadas nos cinco genótipos e que todas elas, à exceção da preta, favorecem o desenvolvimento de caracteres antômicos, com destaque para a malha branca.

Palavras-chave: Qualidade espectral. Anatomia. Malhas fotoconversoras.

## ABSTRACT

The spectral manipulation of solar radiation through the use of colored shading nets in greenhouses or full sunshine has been considered a low-cost strategy for the producer, and it presents interesting results for different characteristics, such as physiological and morpho-anatomical traits. This study aimed at evaluating the effect of spectral quality of light through the use of different colored shading nets in anatomical characteristics of young plants of banana. Banana plantlets of five genotypes ('Maçã', 'Thap Maeo', 'Caipira', 'Princesa' and 'PA 42-44') derived from micropropagation were grown in a greenhouse and inside wooden structures covered with different colored shading nets (blue, white, black and red). The experiment was conducted in a factorial scheme 5x4, with five genotypes and four colored nets, constituting 20 treatments in a completely randomized design with 20 replications. The collect of leaves for anatomical assessments was performed after ninety days of acclimatization in five environments. For this, the youngest fully expanded leaves of five plants of each genotype were collected. The samples were fixed in FAA<sub>70%</sub> and stored in ethanol<sub>70%</sub>. Paradermic and transversal sections were carried out. The semi-permanent glass coverslip were mounted and then, observed under an optical microscope and photographed. The evaluated characteristics were: polar and equatorial diameters of the stomata, stomatal density and thickness of the epidermis, hypodermis, palisade and spongy parenchymas. Measurements were made using the software ImageTool 3.0 and the data were subjected to analysis of variance by software SISVAR and means were compared by Scott-Knott test at 5% probability. The results show that the use of colored shading nets provides different responses in the five genotypes and all nets, except the black, favor the development of anatomical traits, especially white shading net.

Keywords: Spectral quality. Anatomy. Colored shading nets.

## 1 INTRODUÇÃO

A radiação solar é um fator ambiental essencial no que diz respeito à regulação direta ou indireta do crescimento e do desenvolvimento vegetal (MORINI; MULEO, 2003). Dentre as características da radiação, a qualidade espectral é um fator que pode ter efeitos expressivos nos processos fisiológicos das plantas (SCHUERGER; BROWN; STRYJEWSKI, 1997), podendo resultar em variações de comportamento e desenvolvimento de diferentes estratégias, dependendo do ambiente de cultivo em que são mantidas quando se leva em conta este componente da qualidade espectral da luz (SMITH, 1982).

O desempenho das plantas em relação à energia solar incidente tem sido investigado há muito tempo. Por essa razão, foram desenvolvidas estratégias, como a utilização de malhas que funcionam como filtros para os diferentes espectros da radiação solar (BRANT et al., 2009). A utilização de malhas coloridas constitui uma alternativa para a manipulação espectral da radiação natural em casas de vegetação, proporcionando aumento na quantidade de luz difusa em seu interior por meio de uma combinação de proteção física com a refração diferencial da radiação solar (HENRIQUE et al., 2011; OREN-SHAMIR et al., 2001).

As malhas coloridas modificam a radiação especificamente nas regiões do ultravioleta, do visível ou do vermelho-distante (OREN-SHAMIR et al., 2001). Elas são comercializadas no mundo todo e respostas variadas são obtidas conforme a espécie vegetal e o tipo de produto explorado (OLIVEIRA et al., 2008). A utilização dessa tecnologia de baixo custo propicia modificações morfológicas importantes nas plantas (CARVALHO; RODRIGUES; REIS, 2008). Segundo Martins et al. (2009), a anatomia foliar é muito influenciada pela qualidade e a intensidade de luz recebida durante o período de crescimento, já que a folha possui tecidos com grande capacidade de adaptação. Diversos

aspectos anatômicos da folha se relacionam com diferentes características fisiológicas, tais como quantidade de luz absorvida ou refletida, grau de hidrofobia do órgão, pressão de vapor do ar em contato com a folha, eficiência da folha em defender-se de parasitas e patógenos e taxa de transpiração cuticular (SANTIAGO et al., 2001).

Pesquisas com anatomia foliar podem auxiliar no entendimento de problemas relacionados à multiplicação, melhoramento e cultivo de plantas (GAVILANES, 1981). Diversas espécies já mostraram certa plasticidade na estrutura foliar, quando submetidas a ambientes com diferentes condições de luz, destacando-se orquídeas (ARAÚJO et al., 2009), pimentas (SCHUERGER et al., 1997; SANTIAGO et al., 2001), café (HENRIQUE et al., 2011), curauá (OLIVEIRA et al., 2008) e *Xylopia brasiliensis* (JUSTO et al., 2005).

A bananeira (*Musa* spp.) é propagada de forma assexuada, por meio de brotações laterais desenvolvidas a partir de gemas de seu rizoma. Devido à ineficiência desse método, existe alta demanda por mudas de qualidade e com boas condições fitossanitárias (ROELS et al., 2005). A micropropagação obteve sucesso, no que diz respeito à formação de grande número de mudas sadias. Porém, embora esse método seja amplamente utilizado e estabelecido, maiores informações sobre o ambiente ideal *ex vitro* para aclimatização são necessárias para a maximização da produção (COSTA et al., 2008). Dessa forma, estudos em ambientes com diferentes qualidades de luz podem auxiliar na obtenção de maiores informações acerca das modificações anatômicas da planta, visando melhor aclimatização das mudas.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da qualidade espectral da luz, por meio da utilização de malhas coloridas, sobre características da anatomia foliar de plantas jovens de diferentes genótipos de bananeira.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de campo, durante os meses de setembro a dezembro de 2010, no Setor de Cultura de Tecidos, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, Minas Gerais, a 918 m de altitude, latitude 21°14' S e longitude 45°00' W GRW.

Foram utilizados materiais vegetais de bananeira dos genótipos AAB (Maçã e Thap Maeo), AAAB (PA 42-44 e Princesa) e AAA (Caipira), cedidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), no estágio do segundo subcultivo. As mudas foram cultivadas em bandejas de polietileno de 24 células contendo mistura de Latossolo Vermelho e esterco bovino (1:1). Tal substrato recebeu todas as adubações conforme as Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999) e foi irrigado diariamente, durante 90 dias.

O experimento foi implantado quando as plantas tinham, aproximadamente, 15 cm de altura. As mudas foram acondicionadas no interior de estruturas cobertas, individualmente, no teto e nas laterais, com malhas ChromatiNet (Polysack Plastic Industries<sup>®</sup>), nas cores azul, branca, preta e vermelha, com 50% de sombreamento (Figura 2). De acordo com o fabricante, a malha vermelha tem a finalidade de alterar o espectro da luz, reduzindo as ondas azuis, verdes e amarelas e acrescentando as ondas na faixa espectral do vermelho e vermelho-distante. A malha azul modifica o espectro da luz, reduzindo as ondas na faixa do vermelho e vermelho distante e acrescentando as ondas azuis. Já a malha preta é considerada neutra, ou seja, apenas reduz a irradiância e não altera o espectro de luz. A malha branca não interfere no espectro da luz transmitida. Inicialmente, também foram dispostas plantas na condição a pleno sol, porém, as plantas não sobreviveram a esse ambiente, sendo

então descartadas das análises do ensaio. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 5x4, sendo cinco genótipos e quatro cores de telas, constituindo 20 tratamentos em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo cada repetição composta por 4 plantas.



Figura 2 Visão geral das plântulas mantidas sob malhas coloridas. UFLA, Lavras, MG 2010.

A coleta das folhas para as avaliações anatômicas foi realizada após 90 dias de aclimatização sob malhas. Para isso, foram coletadas folhas número 1 (folha mais nova totalmente expandida) de cinco plantas de cada genótipo. As amostras foram fixadas em F.A.A.<sub>70%</sub> (JOHANNSEN, 1940) e armazenadas, posteriormente, em etanol 70%.

Secções paradérmicas das faces abaxial e adaxial foram realizadas à mão livre, utilizando-se lâminas de aço inoxidável, enquanto as secções transversais foram realizadas em micrótomo de mesa tipo LPC. Todas as secções foram colocadas em placas de Petri contendo hipoclorito de sódio 1%, durante, aproximadamente, 10 minutos. Em seguida, foram transferidas para água destilada por 10 minutos e coradas com safranina 1,0% para as secções paradérmicas e solução de safrablau (safranina 1,0% e azul de astra 0,1% na

proporção de 7:3) para as secções transversais, sendo posteriormente montadas em lâminas semipermanentes com glicerol 50%. O material foi observado em microscópio Olympus CX41 acoplado a câmera digital Belcam DIV-3000, fotografado (20 campos para cada tratamento) e as medidas foram realizadas no *software* ImageTool 3.0 (UTHSCSA). As seguintes características foram avaliadas: relação diâmetro polar/diâmetro equatorial dos estômatos, densidade estomática e espessuras de epiderme, hipoderme, parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas da bananeira em secção transversal possuem mesofilo dorsiventral com o parênquima paliçádico voltado para a epiderme da face adaxial, encontrando-se logo abaixo da hipoderme da face adaxial e o parênquima esponjoso voltado para a epiderme da face abaxial (Figura 1). A espécie é classificada como anfi-hipoestomática por apresentar estômatos em ambas as faces, porém, com maior densidade na face abaxial.

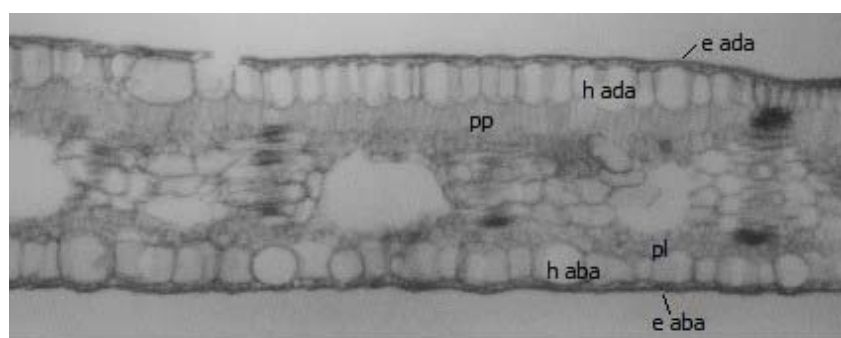


Figura 1 Secção transversal de folha de bananeira (*Musa* spp), ilustrando a organização dos tecidos. e ada = epiderme adaxial, e aba = epiderme abaxial, h ada = hipoderme adaxial, h aba = hipoderme abaxial, pp = parênquima paliçádico, pl = parênquima lacunoso. Barra = 50  $\mu$ m.

Houve diferenças significativas na interação genótipos x malhas coloridas para todas as características avaliadas. Para espessura da epiderme da face adaxial, verifica-se que todos os genótipos comportaram-se igualmente sob as malhas azul e preta, porém, os mesmos assumiram algumas diferenças de espessura quando se observa o ambiente sob as malhas branca e vermelha (Tabela 1). Os genótipos Maçã e Princesa apresentaram maior espessura de epiderme da face adaxial sob malha branca, enquanto, sob a malha vermelha, a maior espessura foi encontrada para o genótipo Caipira. Thap Maeo e PA 42-44 não apresentam diferença significativa em nenhuma das malhas. De modo geral,



todos os genótipos apresentaram maior desenvolvimento da espessura da epiderme adaxial quando submetidos ao cultivo sob malha branca, à exceção do genótipo Caipira, que apresentou melhores resultados sob malha vermelha. Costa et al. (2010) não encontraram diferença significativa para espessura da epiderme da face adaxial em *Ocimum selloi*, porém, os autores observaram maiores valores para epiderme da face adaxial sob malha azul, quando comparada à malha vermelha. O mesmo foi observado para a face abaxial. Esses resultados são similares aos encontrados no presente trabalho.

Tabela 1 Espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial dos cinco genótipos de bananeira quando cultivados sob diferentes qualidades de radiação. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>MALHA</b>				
<b>GENÓTIPO</b>	Epiderme adaxial ( $\mu\text{m}$ )			
	A	B	P	V
Maçã	16,32 aB	18,79 aA	16,90 aB	14,57 cC
Thap Maeo	15,76 aA	13,92 bA	14,42 aA	14,51 cA
Caipira	16,70 aB	17,27 aB	16,30 aB	19,08 aA
PA 42-44	17,26 aA	15,80 bA	16,69 aA	16,70 bA
Princesa	16,43 aB	17,97 aA	15,39 aB	15,05 cB
CV (%)	19,57			
	Epiderme abaxial ( $\mu\text{m}$ )			
	A	B	P	V
Maçã	14,32 bB	16,65 aA	15,02 aB	13,83 aB
Thap Maeo	12,65 cA	12,26 cA	13,18 bA	13,34 aA
Caipira	14,54 bB	16,73 aA	15,93 aA	14,45 aB
PA 42-44	17,12 aA	14,70 bB	15,74 aB	15,48 aB
Princesa	15,79 aA	14,00 bB	13,06 bB	14,30 aB
CV (%)	18,38			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. A- azul, B- branca, P- preta e V- vermelha.

No caso da epiderme da face abaxial, todas as variedades comportaram-se igualmente, quando cultivadas sob tela vermelha. Para as demais malhas, diferentes valores foram observados. Os genótipos PA 42-44 e Princesa apresentaram maiores espessuras na tela azul, enquanto Maçã e Caipira se destacaram sob malha branca. Thap Maeo não apresentou diferença significativa em nenhuma das malhas. Os genótipos PA 42-44 e Princesa pertencem ao mesmo grupo genômico (AAAB), o que pode ter contribuído para o comportamento similar exibido por elas.

De modo geral, as malhas branca e azul foram as que favoreceram um maior desenvolvimento da epiderme da face abaxial. Em todos os tratamentos, a epiderme da face adaxial apresentou-se mais espessa que a epiderme abaxial, o que também foi relatado por Martins et al. (2009), em ensaio com alfavaca-cravo sob malhas coloridas.

Costa et al. (2010), em trabalho realizado com a espécie *Ocimum selloi* (Lamiaceae), observaram que as malhas azul e vermelha não alteraram a espessura da epiderme da face adaxial. No presente trabalho, foi possível observar que as referidas malhas influenciaram a espessura da epiderme. Quase todos os genótipos de bananeira cultivados sob malha branca apresentaram maior espessura, tanto da epiderme da face adaxial como da abaxial.

Para espessura da hipoderme das faces adaxial e abaxial também ocorreram diferentes comportamentos dos genótipos sob as malhas (Tabela 2). Todos os genótipos apresentaram maior espessura da hipoderme da face adaxial sob malha branca, à exceção de PA 42-44, que apresentou melhores resultados sob malha azul.

Tabela 2 Espessuras da hipoderme das faces adaxial e abaxial dos cinco genótipos de bananeira, quando cultivados sob diferentes qualidades de radiação. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>MALHA</b>				
<b>GENÓTIPO</b>	Hipoderme adaxial ( $\mu\text{m}$ )			
	A	B	P	V
Maçã	58,65 bB	71,98 aA	53,67 bC	60,82 bB
Thap Maeo	53,01 cB	61,00 bA	55,75 bB	51,94 cB
Caipira	63,23 bB	75,77 aA	54,91 bC	53,60 cC
PA 42-44	83,68 aA	70,75 aC	67,59 aC	76,58 aB
Princesa	59,32 bB	66,15 bA	49,47 bC	54,66 cC
CV (%)	13,90			
Hipoderme abaxial ( $\mu\text{m}$ )				
	A	B	P	V
Maçã	58,41 aA	48,99 bB	54,82 aA	56,24 aA
Thap Maeo	43,18 cA	42,23 cA	44,30 bA	46,33 bA
Caipira	50,79 bB	57,36 aA	52,98 aA	46,39 bB
PA 42-44	62,80 aA	50,83 bB	53,93 aB	53,84 aB
Princesa	50,80bA	43,48 cB	43,48 bB	46,92 bA
CV (%)	16,46			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. A- azul, B-branca, P- preta e V- vermelha.

A hipoderme tem importância na proteção do parênquima paliádico do excesso de radiação solar, principalmente nos períodos de maior incidência de luz sobre a folha (BOEGER; PIL; BELÉM FILHO, 2007). Tal fato pode explicar a maior espessura da hipoderme sob malha branca neste trabalho. Especula-se que a malha branca proporcione um ambiente mais fresco e de maior umidade, devido à reflectância de todos os comprimentos de onda. Já na face abaxial observou-se que Princesa e PA 42-44 apresentaram hipoderme maior, quando cultivadas sob tela azul, enquanto Caipira teve maior destaque sob malhas branca e preta. Thap Maeo não apresentou diferenças na espessura sob as diferentes malhas. De modo geral, as malhas branca e azul

proporcionaram melhores respostas em relação ao aumento da hipoderme. Segundo Castro et al. (2009), a hipoderme não tem atividade fotossintética relevante, porém, pode atuar acumulando água e, dessa forma, disponibilizá-la nos processos fotossintéticos.

As malhas coloridas também influenciaram o desenvolvimento dos parênquimas paliçádico e esponjoso (Tabela 3).

Tabela 3 Espessuras dos parênquimas paliçádico e esponjoso dos cinco genótipos de bananeira, quando cultivados sob diferentes qualidades de radiação. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>MALHA</b>				
<b>GENÓTIPO</b>	<b>Parênquima paliçádico (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>V</b>
Maçã	56,10 bB	64,17 cA	58,30 bB	59,99 cB
Thap Maeo	63,49 aB	73,60 bA	60,95 bB	65,61 bB
Caipira	57,37 bC	64,19 cB	69,01 aA	60,36 cC
PA 42-44	67,63 aB	78,29 aA	71,93 aB	71,79 aB
Princesa	63,54 aB	72,40 bA	66,80 aB	73,47 aA
CV (%)	10,57			
	<b>Parênquima esponjoso (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>V</b>
Maçã	40,92 cA	40,72 cA	43,01 cA	36,40 cB
Thap Maeo	38,90 cB	37,96 cB	44,60 cA	45,19 aA
Caipira	41,94 cB	43,79 bB	59,30 aA	42,04 bB
PA 42-44	50,66 aA	48,92 aA	53,71 bA	49,79 aA
Princesa	45,34bA	43,78 bA	47,51 cA	47,69 aA
CV (%)	15,11			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. A- azul, B- branca, P- preta e V- vermelha.

Todos os genótipos, à exceção de Caipira, apresentaram maior espessura do parênquima paliçádico quando cultivados sob tela branca. O genótipo Princesa também se comportou igualmente sob malha vermelha.

Quanto à espessura do parênquima esponjoso, também se observou que os genótipos apresentaram respostas diferenciadas quanto às malhas utilizadas. Os genótipos PA 42-44 e Princesa não apresentaram diferenças significativas em relação à espessura. Caipira apresentou melhor desenvolvimento do parênquima esponjoso, quando cultivado sob tela preta. O genótipo Maçã comportou-se igualmente nas telas azul, branca e preta e Thap Maeo obteve melhores respostas quanto à espessura do parênquima esponjoso sob malhas preta e vermelha. Esse parênquima é rico em espaços intercelulares, que são importantes para o armazenamento de gases. Uma quantidade considerável de gases pode entrar no mesofilo e ficar retida nos espaços intercelulares, podendo ser fixado posteriormente o CO<sub>2</sub>, pelo parênquima paliçádico (CASTRO et al., 2009). O aumento do parênquima esponjoso, portanto, contribui para um aumento da área disponível para absorção de CO<sub>2</sub> (com posterior assimilação), a qual é, muitas vezes, maior do que a superfície externa da folha.

De acordo com Alquini et al. (2006), os parênquimas paliçádico e esponjoso são parênquimas clorofilianos ou assimiladores que têm a capacidade de serem fotossintetizantes. Isso se deve à presença de cloroplastos que, por sua vez, convertem energia luminosa em química, armazenando-a na forma de carboidratos. Desta forma, um maior desenvolvimento desses tecidos pode resultar em maior eficiência fotossintética, o que pode colaborar para o crescimento rápido da planta durante a fase de aclimatização. É esperado que quanto mais espesso o parênquima paliçádico, maiores sejam também as taxas fotossintéticas (BOLHAR-VORDENKAMPF; DRAXLER, 1993), processo esse fundamental ao crescimento e ao desenvolvimento vegetal. Normalmente, o parênquima paliçádico é mais desenvolvido que o parênquima esponjoso. Esse fato otimiza a fotossíntese e diminui os espaços intercelulares do parênquima esponjoso, reduzindo a disponibilidade de vapor de água sujeito à transpiração (CASTRO et al., 2009).

Martins et al. (2009) observaram que, em folhas de alfavaca-cravo, o parênquima esponjoso foi mais espesso que o parênquima paliçádico em todas as malhas, o que não foi observado neste trabalho, no qual o parênquima paliçádico apresentou maior espessura.

Trabalhando com *Ocimum selloi*, Costa et al. (2010) observaram que a espessura do parênquima paliçádico não se alterou devido ao sombreamento com malhas azul e vermelha, porém, o parênquima esponjoso tornou-se mais espesso nessas condições. No presente trabalho, o parênquima esponjoso apresentou respostas diferenciadas, dependendo do genótipo analisado. Maior espessura desse tecido pode favorecer o armazenamento de CO<sub>2</sub> nos espaços intercelulares (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Dimassi-Theriou e Bosabalidis (1997) observaram que a espessura do parênquima paliçádico aumentou quando plantas de kiwi foram submetidas à alta radiação solar. No presente trabalho, o parênquima paliçádico foi mais espesso sob malha branca, para a maioria dos genótipos. A malha branca não interfere no espectro da luz irradiada, ou seja, não há modificação na qualidade da radiação, mas sim na quantidade. Em ambientes mais frescos, o espessamento do parênquima paliçádico é favorecido, de forma que essas modificações podem viabilizar a atividade fotossintética (BOEGER; PIL; BELÉM FILHO, 2007; HABERLANDT, 1990). A redução na espessura do parênquima ocorre para que a luz chegue às camadas mais internas da folha, pois, com o sombreamento, a intensidade da radiação diminui. Ao mesmo tempo, a folha aumenta sua área para otimizar a captação de luz (EVANS, 1999).

Em relação às características estomáticas, também foi possível encontrar efeitos significativos na interação genótipos x telas coloridas (Tabela 4).

Tabela 4 Densidades estomáticas das faces adaxial e abaxial dos cinco genótipos, quando cultivados sob diferentes qualidades de radiação. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>MALHA</b>				
<b>GENÓTIPO</b>	<b>Densidade estomática adaxial (est./mm<sup>2</sup>)</b>			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>V</b>
Maçã	10 aA	12 cA	8 cB	8 aB
Thap Maeo	9 aC	15 aA	11 aB	10 aB
Caipira	7 bB	10 cA	6 dB	9 aA
PA 42-44	7 bC	15 aA	10 bB	9 aB
Princesa	6 bC	13 bA	9 bB	8 aB
CV (%)	30,76			
	<b>Densidade estomática abaxial (est./mm<sup>2</sup>)</b>			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>V</b>
Maçã	45 bB	58 aA	47 aB	44 dB
Thap Maeo	51 aB	49 bB	47 aB	109 aA
Caipira	35 cD	60 aB	53 aC	83 cA
PA 42-44	43 bB	49 bA	49 aA	43 dB
Princesa	46 bC	53 bB	44 aC	97 bA
CV (%)	16,81			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. A- azul, B-branca, P- preta e V- vermelha.

O genótipo Maçã apresentou maior densidade estomática da face adaxial sob as malhas azul e branca, enquanto Caipira mostrou valores maiores para essa característica sob malhas branca e vermelha. Os demais genótipos apresentaram melhores respostas sob malha branca (Figura 2). Para a face abaxial, os genótipos Thap Maeo, Caipira e Princesa apresentaram maiores valores de densidade estomática sob malha vermelha (Figura 3). Braga et al. (2009) relatam que a densidade estomática da face abaxial de plantas de *Dendranthema grandiflorum* foi maior sob malha vermelha, quando comparadas à azul e à preta. Em folhas de alfavaca-cravo, as maiores densidades da face abaxial foram verificadas sob malhas vermelha e preta (MARTINS et al., 2009).

Costa et al. (2010) relataram que, na espécie *Ocimum selloi*, não houve diferença significativa quanto à densidade estomática da face abaxial, quando as plantas foram submetidas às malhas azul e vermelha, porém, leve superioridade da densidade estomática da face adaxial foi encontrada nas plantas mantidas sob malha vermelha. A malha branca, provavelmente, proporciona um ambiente favorável, em termos de umidade e temperatura, que influencia a maior densidade estomática observada neste trabalho.

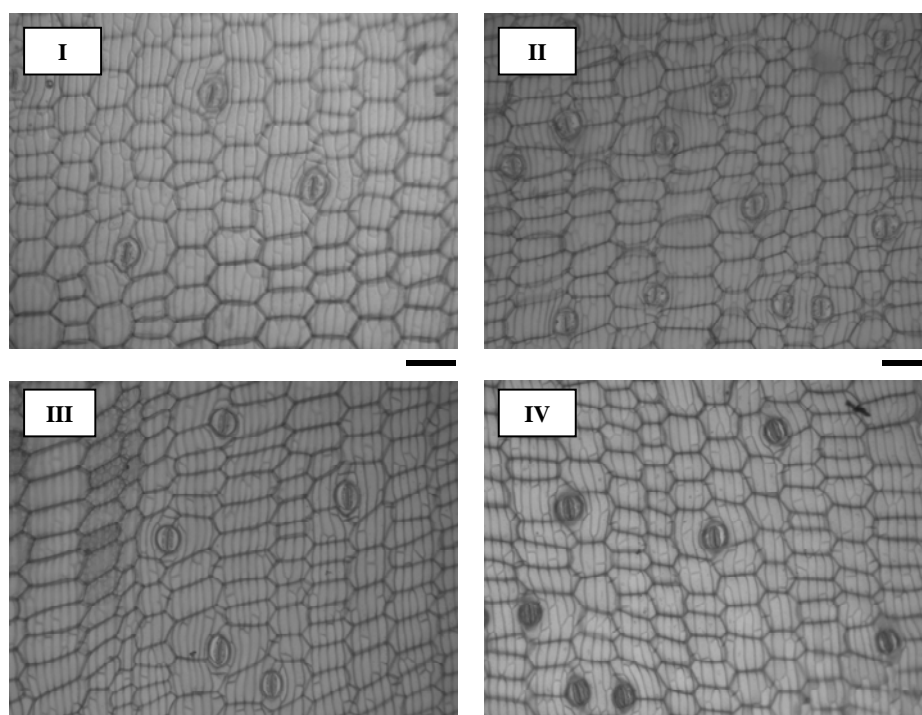


Figura 3 Seções paradérmicas da superfície adaxial de folhas do genótipo PA 42-44 sob as diferentes malhas. I. malha azul, II. malha branca, III. malha preta, IV. malha vermelha. Barra = 100  $\mu$ m.



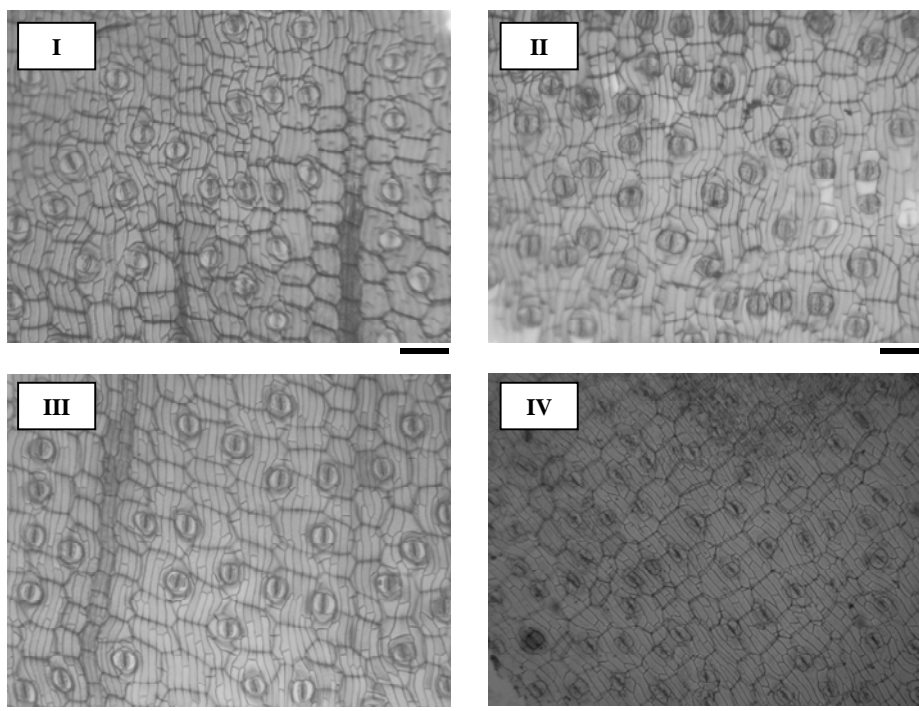


Figura 4 Seções paradermicas da superfície abaxial de folhas do genótipo Caipira, sob as diferentes malhas. I. malha azul, II. malha branca, III. malha preta, IV. malha vermelha. Barra = 100 µm.

As variações das densidades estomáticas em ambas as faces da epiderme mostram a plasticidade anatômica dos genótipos de bananeira, em função do ambiente de cultivo. Geralmente, o aumento da densidade estomática apresenta relação com uma maior condutância estomática, minimizando, assim, efeitos prejudiciais à fotossíntese, em diferentes condições de cultivo (LIMA JÚNIOR et al., 2006), além de aumentar a captação de CO<sub>2</sub>, possibilitando maior taxa fotossintética (NIINEMETS; TENHUNEN, 1997).

A relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE) pode indicar a funcionalidade dos estômatos (CASTRO et al., 2009). A relação DP/DE da face adaxial foi maior que os respectivos valores para a face abaxial, tendo, nesta

última, essa relação tido os maiores valores nas malhas azul, branca e vermelha (Tabela 5).

Tabela 5 Relação DP/DE das faces adaxial e abaxial dos cinco genótipos, quando cultivados sob diferentes qualidades de radiação. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>MALHA</b>				
<b>GENÓTIPO</b>	DP/DE adaxial			
	A	B	P	V
Maçã	1,83 dC	2,52 aA	2,06 bB	2,17 aB
Thap Maeo	2,28 bA	2,17 bA	2,36 aA	2,23 aA
Caipira	2,08 cB	2,49 aA	2,29 aB	2,19 aB
PA 42-44	2,63 aA	2,51 aA	1,98 bB	2,17 aB
Princesa	2,25 bA	2,28 bA	2,20 aA	2,40 aA
CV (%)	17,34			
	DP/DE abaxial			
	A	B	P	V
Maçã	1,95 bB	2,31 aA	1,90 aB	2,27 bA
Thap Maeo	1,93 bC	2,22 aB	2,00 aC	2,70 aA
Caipira	1,89 bA	2,19 aB	1,91 aA	2,17 bB
PA 42-44	2,17 aA	2,31 aA	1,93 aB	1,94 cB
Princesa	1,77 bB	2,03 aB	1,88 aB	2,50 aA
CV (%)	17,46			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. A- azul, B- branca, P- preta e V- vermelha.

Os genótipos Thap Maeo e Princesa não apresentaram diferença significativa para relação DP/DE da face adaxial em nenhuma das malhas, enquanto Maçã, Caipira e PA 42-44 tiveram maiores valores sob a malha branca. Os resultados foram mais diversificados quanto à relação DP/DE da face abaxial, em que se observa que os genótipos Thap Maeo e Princesa apresentaram melhores respostas sob malha vermelha, Caipira e PA 42-44 sob

malha azul e Maçã sob malhas branca e vermelha. Sob as malhas branca e preta, os genótipos se comportaram de forma igual.

Martins et al. (2009) observaram que plantas submetidas ao sombreamento com malha azul apresentaram estômatos com maior relação DP/DE da face adaxial que as plantas cultivadas sob malha preta.

Khan et al. (2002) afirmam que a relação diâmetro polar e diâmetro equatorial (DP/DE) está associada ao formato das células-guarda, constituindo importante particularidade do funcionamento dos estômatos, visto que a forma elíptica (maior DP/DE) é característica de estômatos funcionais em relação à forma arredondada (menor DP/DE), que está associada a estômatos que não apresentam funcionalidade normal. No presente trabalho, verificou-se que os estômatos da face adaxial mostraram maior funcionalidade que os da face abaxial.

Costa et al. (2010) observaram que o diâmetro polar dos estômatos, em ambas as epidermes, não foi influenciado pelos tratamentos, enquanto o diâmetro equatorial variou de acordo com as telas, de forma que a tela vermelha aumentou o diâmetro dos estômatos da face abaxial, enquanto a tela azul aumentou o diâmetro dos estômatos da face adaxial.

#### **4 CONCLUSÕES**

A utilização de malhas coloridas durante a fase de aclimatização promove alterações anatômicas em plantas de bananeira dos genótipos Maçã, Thap Maeo, Caipira, PA 42-44 e Princesa.

Plantas do mesmo grupo genômico podem apresentar comportamento semelhante em determinadas características avaliadas.

Todas as malhas, exceto a preta, favorecem o desenvolvimento das características anatômicas, com destaque para a malha branca.

## REFERÊNCIAS

- ALQUINI, Y. et al. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 87-108.
- ARAÚJO, A. G. et al. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigesii* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2506-2511, set. 2009.
- BOEGER, M. R. T.; PIL, M. W. B. O.; BELÉM FILHO, N. Arquitetura foliar comparativa de *Hedychium coronarium* J. Koenig (Zingiberaceae) e de *Typha domingensis* Pers (Typhaceae). **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 62, n. 1/2, p. 113-120, 2007.
- BOLHAR-VORDENKAMPF, H. R.; DRAXLER, G. **Funcional leaf anatomy photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. 464 p.
- BRAGA, F. T. et al. Qualidade de luz no cultivo in vitro de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr. 2009.
- BRANT, R. S. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1401-1407, maio 2009.
- CARVALHO, M. A.; RODRIGUES, L. E.; REIS, M. M. Cultivos agrícolas utilizando telas coloridas e termorefletoras. In: JORNADA CIENTÍFICA, 1., 2008, Bambuí. **Anais...** Bambuí: CEFET, 2008. 1 CD-ROM.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- COSTA, F. H. S. et al. Modificações na anatomia foliar de bananeiras durante o processo de micropropagação. **Interciência**, Caracas, v. 33, n. 9, p. 663-667, 2008.
- COSTA, L. C. B. et al. Effects of coloured shade netting on the vegetative development and leaf structure of *Ocimum selloi*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 2, p. 349-359, 2010.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 127-134, Feb. 1997.

EVANS, J. R. Leaf anatomy enables more equal access to light and CO<sub>2</sub> between chloroplast. **New Phytologist**, Lancaster, v. 143, n. 1, p. 93-104, Apr. 1999.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GAVILANES, M. L. **Anatomia e nervação foliar de espécies nativas do gênero *Gomphera* L. (Amaranthaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 1981. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1981.

HABERLANDT, G. **Physiological plant anatomy**. New Delhi: Today & Tomorrow's, 1990. 777 p.

HENRIQUE, P. C. et al. Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de mudas de café cultivadas sob telas de diferentes colorações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 5, p. 458-465, maio 2011.

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

JUSTO, C. F. et al. Plasticidade anatômica das folhas de *Xylopia brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 111-123, 2005.

KHAN, P. S. S. V. et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 141-146, Nov. 2002.

LIMA JÚNIOR, E. C. et al. Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 1, p. 33-41, jan./fev. 2006.

MARTINS, J. R. et al. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 82-87, jan. 2009.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 3-35.

NIINEMETS, U.; TENHUNEN, J. D. A model separating leaf structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. **Plant, Cell and Environment**, Amsterdam, v. 20, n. 7, p. 845-866, July 1997.

OLIVEIRA, J. R. et al. Cultivos agrícolas utilizando telas coloridas e termofletoras. In: JORNADA CIENTÍFICA, 1., 2008, Bambuí. **Anais...** Bambuí: CEFET, 2008. 1 CD-ROM.

OREN-SHAMIR, M. et al. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Dundee, v. 76, n. 3, p. 353-361, June 2001.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. 359 p.

ROELS, S. et al. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 57-66, Jan. 2005.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1035-1042, set./out. 2001.

SCHUERGER, A. C.; BROWN, C. S.; STRYJEWSKI, E. C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 3, p. 273-282, Mar. 1997.

SMITH, H. Light quality, photo perception and plant strategy. **Annual Reviews of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 33, p. 481-518, June 1982.

### **CAPÍTULO 3**

#### **ESTABILIDADE GENÉTICA DE BANANEIRA ‘Ouro’ SUBMETIDA A TRATAMENTO PARA FORMAÇÃO DE MÚLTIPLOS BROTOS**



## RESUMO

As citocininas, a exemplo do 6-benzilaminopurina (BAP), desempenham papel de grande importância na indução e na formação *in vitro* de múltiplas brotações. Porém, doses muito elevadas deste regulador podem levar a problemas de variação somaclonal nos explantes. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a formação de múltiplas brotações a partir de ápices caulinares de bananeira 'Ouro' em meio suplementado com elevada concentração de benzilaminopurina (BAP), bem como verificar a estabilidade do conteúdo de DNA nos explantes submetidos aos tratamentos. Os explantes foram inoculados em meio MS, no qual se variaram as concentrações de BAP (0,0; 2,5 e 22,5 mg L<sup>-1</sup>). Em todos os meios, foram acrescentados 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 1,8 g L<sup>-1</sup> de phytigel. O pH foi ajustado para 6,2(±0,1). O delineamento foi inteiramente casualizado, com 15 repetições. Após 45 dias, foram realizadas a contagem do número de brotações e a análise de citometria de fluxo das plantas. As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância e os valores de número de brotações e de índices de DNA foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5%. Os resultados mostram que o maior número de brotações (2,2) é obtido quando se utiliza a concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> e que a maior concentração utilizada (22,5 mg L<sup>-1</sup>) não é eficiente para a indução de brotações múltiplas, no entanto, proporciona a redução no conteúdo de DNA dos explantes, podendo ser um indicio de variação somaclonal.

Palavras-chave: 6-benzilaminopurina. Múltiplas brotações. Citometria de fluxo.

## ABSTRACT

The cytokinins, such as BAP (6-benzylaminopurine), play a major role in the *in vitro* induction and formation of multiple shoots. However, concentrations too much high of this substance can lead to problems of somaclonal variation in explants. This study aimed at evaluating the formation of multiple shoots from shoot tips of banana 'Ouro' in medium supplemented with high concentration of BAP, and at verifying the stability of DNA content in the explants of treatments. The explants were inoculated in MS medium with various concentrations of BAP (0.0, 2.5 and 22.5 mg L<sup>-1</sup>). In all media were added 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 0.1 mg L<sup>-1</sup> indole acetic acid (IAA), 10 mg L<sup>-1</sup> of ascorbic acid and 1.8 g L<sup>-1</sup> phytigel. The pH was adjusted to 6.2 ( $\pm$  0.1). The design was completely randomized with 15 repetitions. After 45 days the number of shoots was counted in and flow cytometric analysis of plants was made. The treatment means were submitted to ANOVA and values of the number of shoots and DNA indices were compared by Scott-Knott test at 5%. The results show that the greatest number of shoots (2.2) was obtained when we used a concentration of 2.5 mg L<sup>-1</sup> and the highest concentration used (22.5 mg L<sup>-1</sup>) is not effective for inducing multiple shoots, however, it provides DNA content reduction of explants, which may be an indication of somaclonal variation.

Keywords: 6-benzylaminopurine. Multiple shoots. Flow cytometry.

## 1 INTRODUÇÃO

As citocininas desempenham papel de grande importância em diversos processos do desenvolvimento vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009). A formação e a regeneração de brotos são altamente dependentes da ação desses reguladores, a exemplo de 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina, zeatina e Thidiazuron (TDZ) (GRAÇA et al., 2001; YANG et al., 2010). Dentre essas substâncias, o BAP tem sido o mais utilizado em experimentos com diferentes espécies (CARVALHO et al., 1997).

Brotações múltiplas ou meristemas múltiplos são inúmeros pequenos meristemas gerados a partir de um único explante em meio de cultura com altíssimas concentrações de citocininas, potencializando, com isso, a cultura de brotos e também de calos a partir destes. Porém, a concentração e o tipo de citocinina, bem como o tipo e estado do explante, são fatores que contribuem para o sucesso da formação de múltiplas brotações (MORALES et al., 1999). Além desses fatores, outro ponto importante a ser considerado é a existência de um equilíbrio adequado entre as concentrações de citocininas e auxinas (SEN; GUHA-MUKHERJEE, 1998), uma vez que maior concentração de citocinina favorece a formação de brotações e a situação contrária contribui para o processo de enraizamento (KRIKORIAN, 1995).

O que se tem buscado são protocolos de obtenção de múltiplas brotações que aperfeiçoem o processo de micropropagação, de modo que a estabilidade genética seja mantida (CHRISTENSEN et al., 2008; YANG et al., 2010).

As citocininas atuam na quebra da dominância apical dos brotos (ERIG; SCHUCH, 2006) e no controle das divisões celulares (TAIZ; ZEIGER, 2009), resultando no aumento da taxa de multiplicação. Porém, esses reguladores, assim como os demais hormônios vegetais pertencentes a outras classes, se aplicados ao meio de cultura em concentrações muito elevadas, podem levar à instabilidade genética da planta (KARP, 1995; MARTIN et al., 2006). Essas

possíveis modificações no conteúdo de DNA podem ser estimadas pela técnica de citometria de fluxo (YANG et al., 2010).

A técnica de citometria de fluxo consiste em submeter a suspensão de núcleos da amostra a um foco de luz intensa (laser (s) e/ou lâmpada de vapor de mercúrio) (DOLEZEL, 1997). Os fluorocromos presentes nas partículas são excitados e emitem luz de acordo com suas características fluorescentes. Os pulsos de luz e de fluorescência gerados são colhidos por um sistema de detecção ótica, separados por filtro e convertidos em pulsos elétricos, Estes sinais elétricos são amplificados e convertidos em pulsos analógico-digitais. Os sinais de cada partícula se acumulam em tempo real na forma de histogramas, que são visualizados no monitor de um computador (CÔRTE-REAL et al., 2002).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a formação de múltiplas brotações a partir de ápices caulinares de bananeira ‘Ouro’ em meio suplementado com elevada concentração de BAP, bem como verificar a estabilidade do conteúdo de DNA nos explantes submetidos aos tratamentos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de bananeira da cultivar 'Ouro' (AA), de 6 meses de idade, cedidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, foram estabelecidas, *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras.

Os ápices meristemáticos obtidos das mudas foram submetidos ao processo de assepsia da seguinte maneira: imersão, por 5 minutos, em solução de álcool 70% e, em seguida, em hipoclorito de sódio 2%, durante 30 minutos. Após esse processo, o material foi lavado três vezes em água destilada e autoclavada. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Os explantes foram estabelecidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 1,8 g L<sup>-1</sup> de phytigel e o pH foi ajustado para 6,2(±0,1). Os tubos foram levados para sala de crescimento, onde permaneceram por 15 dias no escuro e mais 15 sob irradiância padrão do laboratório de cultura de tecidos (5000 lux) (Figura 1).

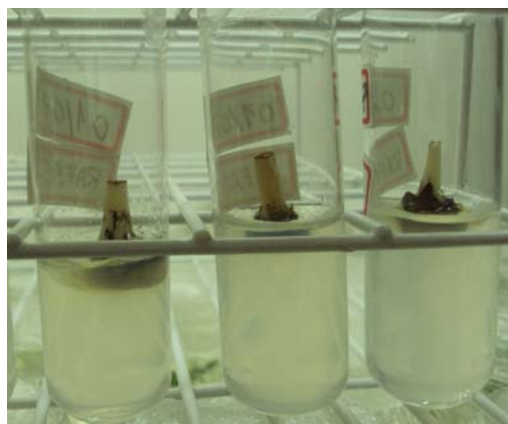


Figura 1 Explantes em meio de estabelecimento em sala de crescimento. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Após esse período, os ápices meristemáticos foram submetidos aos tratamentos em duas diferentes concentrações de BAP (2,5 e 22,5 mg L<sup>-1</sup>) em meio MS, mantendo-se todas as suplementações do meio de cultura anterior. A testemunha constou de mesmo meio sem adição do regulador. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 15 repetições. A escolha da elevada concentração de BAP foi baseada em testes realizados pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, onde pesquisas com outras cultivares de bananeira têm sido promissoras na geração de brotações múltiplas.

Após 45 dias, foram realizadas a contagem do número de brotações e a análise de citometria de fluxo das plantas.

Para a análise de citometria de fluxo, as amostras foram trituradas, juntamente com o padrão de referência (*Pisum sativum*, que apresenta 9,09 pg de DNA), em placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos LB01. A suspensão obtida foi filtrada em malha de 50 µm e, posteriormente, corada com o fluorocromo iodeto de propídeo (Figura 2). Todo esse processo foi realizado sobre gelo triturado. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur 4 cores (Becton Dickinson – BD) e os histogramas foram obtidos no software CellQuest™ e analisados no software WinMDI™. A estimativa da quantidade de DNA foi feita pela posição relativa do pico G1 da planta analisada em relação à posição do pico G1 do padrão de referência. Os valores de conteúdo de DNA e os coeficientes de variação dos tratamentos foram submetidos à análise de variância e os valores de número de brotações e de índices de DNA foram comparados, pelo teste de Scott-Knott, a 5%, pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

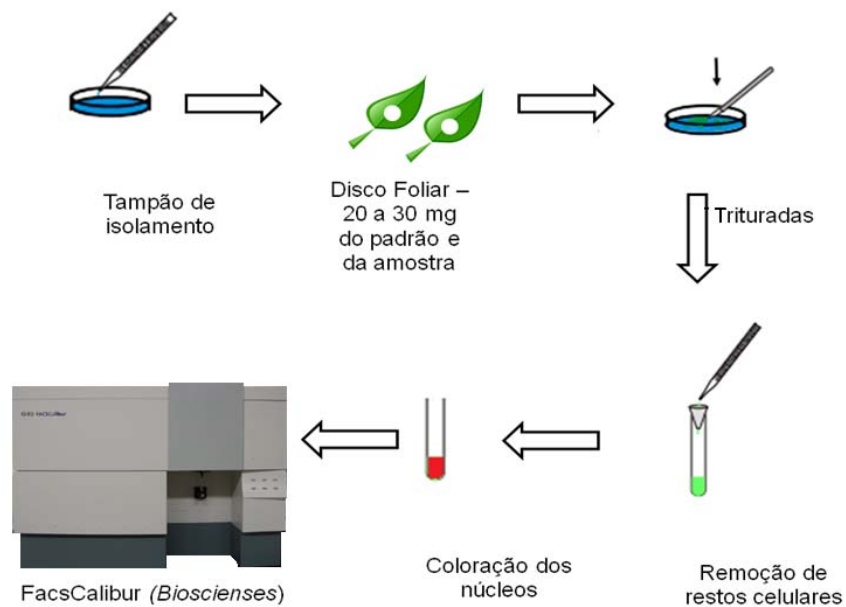


Figura 2 Diagrama da metodologia utilizada na análise do conteúdo de DNA nuclear. Adaptado de Loureiro e Santos (2004)

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 Valores médios de índice de DNA (pg), número de brotações e coeficiente de variação (%). UFLA, Lavras, MG, 2012.

Meios de cultura	Índice de DNA	Nº brotações	CV
MS + 22,5 mg.L <sup>-1</sup> BAP	1,08 b	0,8 b	1,4 <sup>ns</sup>
MS + 2,5 mg.L <sup>-1</sup> BAP	1,28 a	2,2 a	0,9
MS	1,31 a	0,0 b	1,8

\*<sup>ns</sup> = não significativo.

A suplementação com elevada concentração de BAP (22,5 mg L<sup>-1</sup>) não favoreceu a formação de brotações múltiplas, mostrando-se ineficiente para a multiplicação *in vitro* de bananeira ‘Ouro’. Os melhores resultados para essa característica foram encontrados utilizando-se o meio MS apenas ou o meio MS suplementado com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Esses resultados se aproximam daqueles encontrados por Kalimuthu, Saravanakumar e Senthilkumar (2007), que observaram que os melhores resultados para multiplicação de brotos foram obtidos em meio MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, para *Musa sapientum*.

Wirakarnain, Hossain e Chandran (2008), contrariamente ao que ocorreu neste trabalho, obtiveram significativa formação de meristemas múltiplos de bananeira ‘Pisang Mas’ (AA) derivados de inflorescências masculinas, quando a concentração de 100 µM de BAP (equivalente a 22,5 mg L<sup>-1</sup>) foi aplicada ao meio.

Jafari, Othman e Khalid (2011) testaram três concentrações de BAP (11, 22 e 33 µM) para indução de brotações em explantes em bananeira ‘Berangan’. Os autores relatam que a maior concentração utilizada (equivalente a 7,5 mg L<sup>-1</sup>)



foi a que proporcionou maior número de brotações, porém, o número de plantas anormais (plantas alongadas ou mal formadas, por exemplo) nessas condições também foi maior. A concentração de 22  $\mu\text{M}$  (2,5  $\text{mg L}^{-1}$ ) foi a mais adequada, pois o número de brotações normais foi superior.

Em ápices caulinares de bananeira ‘Maçã’ cultivadas em meio M1 suplementado com diferentes concentrações de BAP variando de 0,0 a 17,5  $\text{mg L}^{-1}$ , observou-se que o maior número de brotações foi obtido na concentração de 5,0  $\text{mg L}^{-1}$  (DOMINGUES; TULMANN NETO; MENDES, 1995). Venkatachalan, Sreedhar e Bhagyalakshimi (2007) relatam que, para determinado genótipo AAB, a adição de BAP em concentrações de até 6  $\text{mg L}^{-1}$  proporcionou aumento na multiplicação de brotações, enquanto maiores concentrações (7-10  $\text{mg L}^{-1}$ ) ocasionaram redução na formação de brotações. Os mesmos autores afirmam que tal fato pode ter ocorrido devido à exsudação de compostos fenólicos no meio de cultura. Isso também pode ter colaborado para a diminuição no número de brotações observado no presente trabalho. Possivelmente, a elevada concentração de BAP também deve ter interferido em alguma fase do processo inerente à divisão celular.

A aplicação de citocininas ao meio de cultura torna-se obrigatória quando se deseja obter múltiplas brotações, de maneira que o fornecimento exógeno de, pelo menos, um regulador pertencente a esse grupo seja realizado (VENKATACHALAM; SREEDHAR; BHAGYALAKSHIMI, 2007). Altas taxas de multiplicação requerem alto nível de citocininas, bem como uma combinação precisa delas (quando necessário), uma vez que cada uma delas participa de uma rota metabólica diferente (BLACKESLEY; LENTON, 1987).

Não há qualquer publicação que relate a análise de citometria de fluxo em múltiplas brotações de espécies vegetais. No presente trabalho, observou-se que os explantes submetidos ao tratamento com concentração máxima de BAP apresentaram conteúdo de DNA reduzido (1,08 pg), enquanto nos demais

tratamentos não ocorreram diferenças significativas. Acredita-se que tal redução possa estar relacionada a eliminações de partes cromossômicas ocorridas durante o processo de divisão celular. Algumas alterações na mitose são características de eliminação cromossômica, tais como não orientação de cromossomos na metáfase, segregação tardia na anáfase, degradação de cromatina ou fragmentação de cromossomos e formação de micronúcleos (SINGH, 2002). Isso pode resultar em plantas com diferentes anormalidades, sendo denominadas de variantes somaclonais.

Os histogramas obtidos pela citometria de fluxo podem ser observados na Figura 3. A Figura 3B corresponde ao meio de cultura com a concentração de 22,5 mg L<sup>-1</sup> BAP. É possível observar que este pico é mais espesso que os demais, podendo levar a crer que a qualidade da amostra foi comprometida. Vários fatores podem interferir na qualidade das amostras e, conseqüentemente, na confiabilidade das estimativas do conteúdo de DNA obtida pela citometria de fluxo, tais como tampão de extração, padrão de referência, fluorocromo, tipo de tecido vegetal empregado (composição química como presença de antocianina e compostos fenólicos que possam inibir a coloração do DNA), qualidade da amostra (idade da planta, presença de injúrias, doenças), tempo de armazenamento do tecido vegetal, cuidados no preparo e análise da amostra, bem como a interação destes fatores (TIMBÓ, 2010). No entanto, as amostras foram realizadas da mesma forma e os picos correspondentes aos demais tratamentos ficaram bons, indicando que essa diferença está mesmo relacionada com diferenças no conteúdo de DNA do material analisado.

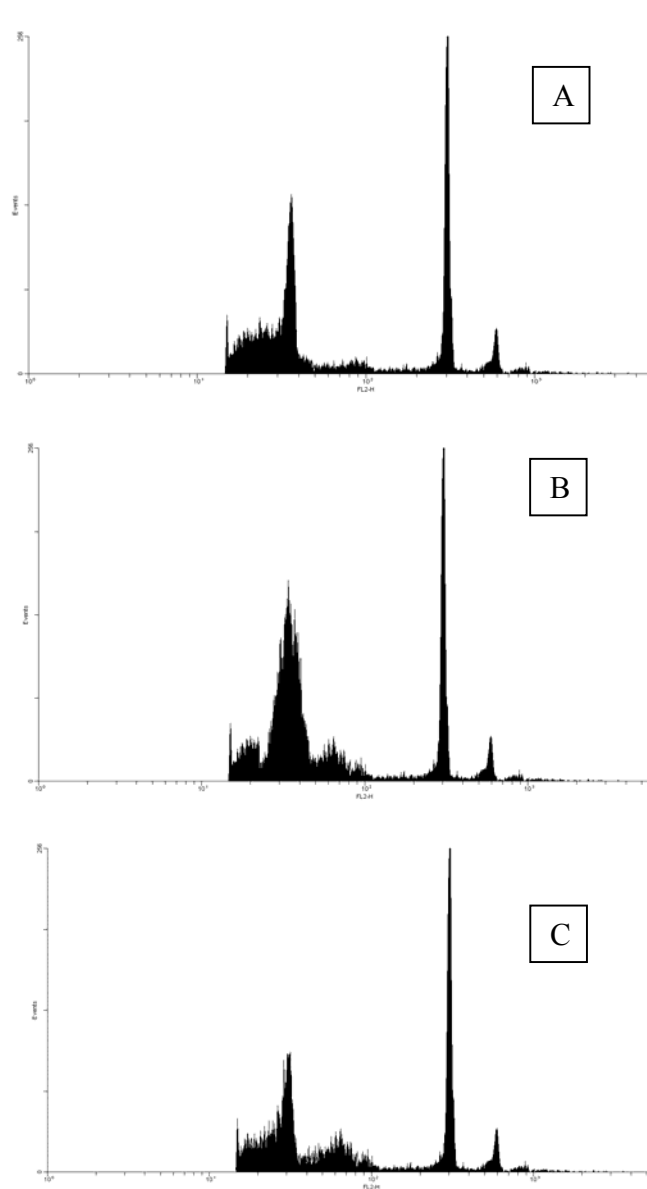


Figura 3 Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo. O primeiro pico de cada histograma corresponde ao G1 da amostra e o segundo, ao padrão de referência (*Pisum sativum*). A. Testemunha (meio MS apenas); B. 22,5 mg L<sup>-1</sup> BAP; C. 2,5 mg L<sup>-1</sup> BAP.

A citometria de fluxo pode e deve ser utilizada para análises de materiais micropropagados, pois apresenta as vantagens de não ser destrutiva, utiliza apenas uma pequena porção da folha da planta desejada e é rápida e simples de ser realizada. Da preparação da amostra à obtenção do histograma, gasta-se, em média, menos de 10 minutos. A desvantagem é que o citômetro de fluxo é um equipamento caro e necessita de profissional habilitado para operá-lo.

É muito importante a detecção de variação somaclonal ainda na fase *in vitro*, pois plantas mutantes, aparentemente normais, deixarão de ir para o campo, evitando problemas que seriam detectados somente na fase produtiva, como bananeira que não produz cacho, por exemplo (tipo bem comum de mutação em bananeira). Existem relatos que mostram que a utilização de altos níveis de citocininas pode levar à ocorrência de plantas anormais e com a estabilidade genética afetada (SHIRANI; MAHDAVI; MAZIAH, 2009).

Pelos resultados obtidos na análise de citometria de fluxo, foi detectado que houve perda de DNA, porém, não é possível afirmar se houve variação somaclonal nas plantas submetidas a altas concentrações de BAP. Para isso, análises citogenéticas e moleculares devem ser realizadas, com o objetivo de confirmar essa hipótese.

#### **4 CONCLUSÃO**

Explantos cultivados *in vitro* em meio de cultura suplementado com 22,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP não são eficientes na formação de múltiplas brotações em bananeira ‘Ouro’.

Altas concentrações de BAP promovem perda de DNA nos explantes.

## REFERÊNCIAS

- BLACKESLEY, D.; LENTON, J. R. Cytokinin uptake and metabolism in relation to shoot multiplication *in vitro*. **British Plant Growth Regulator Group Monograph**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 87-99, 1987.
- CARVALHO, G. R. et al. Efeito do triadimenol e benzilaminopurina no desenvolvimento de brotos *in vitro* do cafeeiro cv. 'Catuaí'. **Revista Unimar**, Marília, v. 19, n. 3, p. 767-775, 1997.
- CHRISTENSEN, B. et al. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 151-161, Jan. 2008.
- CÔRTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, v. 71, n. 1, p. 19-33, 2002.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 38, n. 3, p. 258-302, June 1997.
- DOMINGUES, E. T.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J. Cultura de ápices caulinares de *Musa* sp, var. Maçã: estabelecimento, micropropagação e enraizamento *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 387-394, 1995.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 151-155, 2006.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- GRAÇA, M. E. C. et al. Efeitos das citocininas benzilaminopurina e thidiazuron na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 43, n. 1, p. 107-112, 2001.
- JAFARI, N.; OTHMAN, R. Y.; KHALID, N. Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 13, p. 2446-2450, 2011.

KALIMUTHU, K.; SARAVANAKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, R. *In vitro* micro propagation of *Musa sapientum* L. (Cavendish Dwarf). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 9, p. 1106-1109, May 2007.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 295-302, Feb. 1995.

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones**. 2<sup>nd</sup> ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 774-796.

LOUREIRO, J. C. M.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 18-29, 2004.

MARTIN, K. P. et al. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, New York, v. 4, n. 2, p. 188-192, Feb. 2006.

MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 25, n. 3, p. 473-497, 1962.

SEN, J.; GUHA-MUKHERJEE, S. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in *Vigna*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, Columbia, v. 34, n. 4, p. 276-280, Oct. 1998.

SHIRANI, S.; MAHDAVI, F.; MAZIAH, M. Morphological abnormality among regenerated shootsof banana and plantain (*Musa* spp.) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 21, p. 5755-5761, 2009.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, 2002. 463 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TIMBÓ, A. L. O. **Determinação de protocolo para duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* spp.** 2010. 100 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHIMI, N. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 51, n. 2, p. 193-205, Apr. 2007.

WIRAKARNAIN, S.; HOSSAIN, A. B. M. S.; CHANDRAN, S. Plantlet production through development of competent multiple meristem cultures from male inflorescence of banana, *Musa acuminata* cv. 'Pisang Mas' (AA). **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, Lund, v. 4, n. 4, p. 325-328, Aug. 2008.

YANG, X. Y. et al. Multiple shoots induction in wild cotton (*Gossypium bickii*) through organogenesis and the analysis of genetic homogeneity. **Biologia**, Lahore, v. 63, n. 3, p. 496-503, June 2010.



## **CAPÍTULO 4**

### **DESEMPENHO DE SOFTWARES NAS ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO EM BANANEIRA**

## RESUMO

A citometria de fluxo é uma técnica que apresenta resultados com extrema rapidez acerca de diversos atributos celulares. Estão disponíveis no mercado vários modelos de citômetro de fluxo, bem como de programas computacionais que possibilitam a análise de inúmeras características do material vegetal em estudo. Diversos fatores interferem nos resultados finais das análises, tais como preparo da amostra, tampão de extração, fluorocromos e softwares. Algumas diferenças nos resultados podem ser observadas quando diferentes programas são utilizados. O coeficiente de variação (CV) é uma medida de precisão muito importante para a validação de qualquer experimento e acaba por sofrer mudanças a depender do software utilizado. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o desempenho de quatro programas computacionais comumente utilizados em análises de citometria de fluxo, por meio da análise do conteúdo de DNA e do coeficiente de variação gerados por todos eles. Foram realizadas leituras de 25 amostras foliares de bananeira 'NBA' (AA) em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (BD), sendo analisados, posteriormente, 25 histogramas em cada um dos softwares (CellQuest™, WinMDI™, FlowJo™ e FCS Express™), obtendo-se os dados de conteúdo de DNA e coeficiente de variação. Os resultados mostram que não há diferença entre os programas quanto aos valores de conteúdo de DNA, porém, as análises do CV indicam que o software WinMDI™ apresenta baixa precisão por subestimar os valores de CV, enquanto os demais softwares apresentaram valores de CV mais condizentes com a literatura. O software CellQuest™ é recomendado neste caso, por ser desenvolvido pela própria empresa fabricante do citômetro de fluxo utilizado nas análises do presente trabalho.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. Coeficiente de variação. *Software*.

## ABSTRACT

Flow cytometry is a technique that presents the results very quickly about various cellular attributes. Several models of flow cytometer are available on the market as well as softwares that enable the analysis of many features of plant material under study. Several factors affect the final results of the analysis, such as sample preparation, extraction buffer, fluorochrome and softwares. Some differences in results may be observed when different programs are used. The coefficient of variation (CV) is a very important measure of accuracy for the validation of any experiment, and it can be changed depending on the software used. This study aimed at evaluating the performance of four softwares commonly used in flow cytometry analysis, by analysis of DNA content and coefficient of variation generated by all of them. Readings were taken of 25 leaf samples of banana cv. 'NBA' (AA) in FACSCalibur (BD) flow cytometer and after 25 histograms were analyzed in each software (CellQuest<sup>™</sup>, WinMDI<sup>™</sup>, FlowJo<sup>™</sup> and FCS Express<sup>™</sup>). The data of DNA content and coefficient of variation were obtained. The results show no difference between the programs for the values of DNA content, but the analysis show that software WinMDI<sup>™</sup> provides low accuracy by underestimating the values of CV, while other softwares show CV values more consistent with the literature. Software CellQuest<sup>™</sup> is recommended in this case to be developed by the company manufacturer of flow cytometer used in the analysis of this work.

Keywords: Flow cytometry. Coefficient of variation. Software.

## 1 INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo é uma poderosa ferramenta na análise do fenótipo e das características das células (MACEY, 2007), constituindo um método para se proceder a uma rápida análise de grande número de células individualmente, usando medidas de fluorescência, absorvância e dispersão da luz (RIESEBERG et al., 2001). A intensidade de dispersão da luz ou da emissão de fluorescência está relacionada com as propriedades das partículas que estão sendo analisadas. Existem, atualmente, diversos modelos de citômetro de fluxo que diferem, geralmente, no número de sensores e de cores do *laser*. Os principais fabricantes são Becton Dickinson (BD), Beckman Coulter, DAKO Diagnostics (Cytomation) e Partec (MACEY, 2007).

A estimativa do conteúdo de DNA nuclear foi a primeira e continua sendo a principal aplicação da citometria de fluxo em plantas. Nos últimos anos, essa metodologia tem sido considerada a mais rápida e conveniente, comparada a outras técnicas. Entretanto, os histogramas com as distribuições obtidas apresentam sempre variações, já que as medições do conteúdo de DNA não são perfeitas (LOUREIRO; SANTOS, 2006). Tais variações estão relacionadas, possivelmente, com as metodologias de isolamento dos núcleos, com a coloração com fluorocromos mais específicos para o DNA e com a leitura no citômetro de fluxo (MARIE; BROWN, 1993). Qualquer problema com a amostra em fluxo, a intensidade ou o alinhamento do *laser*, o foco do feixe e a detecção pode resultar na variação dos pulsos associados a uma dada partícula, levando à variação no histograma obtido (MACEY, 2007).

As variações observadas são expressas em um coeficiente de variação (CV = desvio padrão/média) que, geralmente, varia entre 1% e 10%, em células vegetais. De acordo com Marie e Brown (1993), o CV é um critério elementar

na validação de métodos citológicos e definem uma gama de valores entre 1% e 2%, para análises de alta qualidade e 3%, como valor de rotina.

Trabalhos que visam maior precisão das informações de distribuições de conteúdo de DNA e de CVs mais apropriados já vêm sendo executados. Existem, na literatura, inúmeros estudos nos quais são testados tampões de isolamento (LOUREIRO, 2006), tecidos vegetais, ausência e presença de RNAse (GREILHUBER et al., 2007; LOUREIRO, 2007) e fluorocromos (tipo, tempo de exposição e quantidade) (BARRE et al., 1996; LOUREIRO et al., 2006). Porém, ainda são escassas informações quanto ao real desempenho dos programas computacionais comumente utilizados nessas análises.

Os citômetros de fluxo normalmente incluem um software para coleta e análise de informações. Entretanto, muitas empresas também desenvolvem pacotes de softwares para serem vendidos separadamente da instrumentação (BONETTA, 2005). Um dos mais populares é o software FlowJo™ (Tree Star) que consegue analisar dados gerados por qualquer citômetro de fluxo e pode ser utilizado nos sistemas operacionais Windows e MacIntosh, contrariamente ao CellQuest™ (BD Biosciences), que só opera no sistema MacIntosh. O FCS Express™ (De Novo) é outro software que realiza análises muito avançadas, ao contrário do WinMDI™, que possui ferramentas para análises mais básicas (BONETTA, 2005).

Possivelmente, tais softwares podem apresentar diferenças quanto aos valores de conteúdo de DNA da amostra em questão e quanto ao coeficiente de variação obtido na análise (CHI, 2010). Por isso, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o desempenho de programas computacionais comumente utilizados em análises de citometria de fluxo, no que diz respeito à obtenção de valores mais confiáveis de conteúdo de DNA e coeficiente de variação, de modo a inferir acerca da rigorosidade de cada um, visando auxiliar na melhoria das análises realizadas por meio dessa técnica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Foi avaliado um total de 25 amostras recém-coletadas de bananeira 'NBA'. Para a liberação dos núcleos, fragmentos foliares de, aproximadamente, 20-30 mg foram triturados, com auxílio de bisturi, em placa de Petri contendo 1 mL do tampão de extração LB01 gelado (DOLEZEL; BINAROVÁ; LUCRETTI, 1989). A suspensão de núcleos foi então aspirada por meio de duas camadas de gaze e, posteriormente, filtrada em filtros com malha de 50 µm. Essa suspensão foi mantida em um recipiente com gelo triturado para que não ocorresse deterioração do material. Em seguida, os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de iodeto de propídeo, sendo adicionados, ainda, 5 µL de RNase a cada amostra. Foram analisados 5 mil núcleos/amostra em citômetro de fluxo FACSCalibur Becton Dickinson 4 cores e os histogramas foram obtidos pelo programa CellQuest™, que acompanha o referido citômetro.

Com objetivo de estimar o conteúdo de DNA e o coeficiente de variação, todas as 25 amostras foram analisadas em quatro softwares (CellQuest™, WinMDI™, FlowJo™ e FCS Express™). Por meio desses programas, foram obtidos, automaticamente, os valores de média geométrica e de coeficiente de variação. Com os dados de média geométrica ( $G_{\text{mean}}$ ) das amostras e utilizando-se os dados do padrão de referência (*Pisum sativum* L.), foi possível estimar o conteúdo de DNA das amostras em questão, por meio da equação seguinte:

$$DNA_{\text{amostra}} = \left( \frac{G_{\text{amostra}}}{G_{\text{padrão}}} \right) \cdot DNA_{\text{padrão}}$$

em que o  $G1_{amostra}$  refere-se à posição do pico G1 da amostra em questão, o  $G1_{padrão}$  corresponde à posição do pico G1 da espécie padrão de referência e o  $DNA_{padrão}$  refere-se à quantidade de DNA nuclear da espécie utilizada como padrão de referência (*Pisum sativum* = 9,09 pg).

O coeficiente de variação se refere à largura do pico G1 da amostra, portanto, quanto mais fino for o pico, menor será o coeficiente de variação e mais precisa será a análise. Dessa forma, em análises de citometria de fluxo, é muito importante a obtenção de picos finos. O local do pico em que se mede o coeficiente de variação está respresentado na Figura 1. Deve-se fazer a medida no local que mais represente a média da população de núcleos, isto é, aproximadamente na metade do pico G1 da amostra.

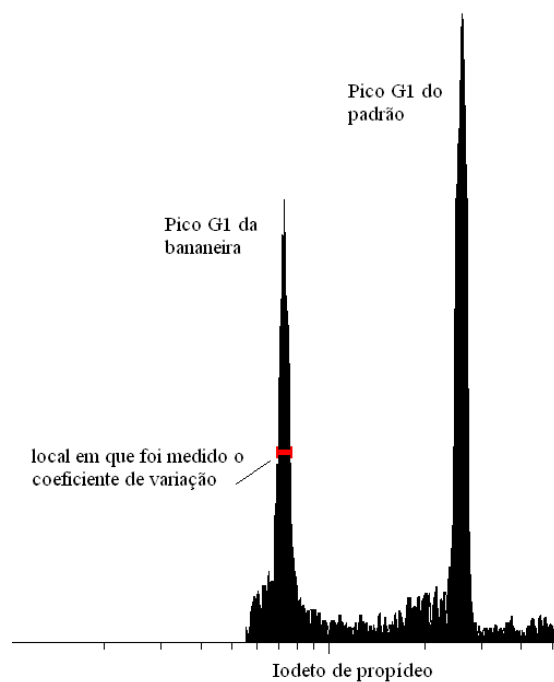


Figura 1 Detalhe de um histograma de citometria de fluxo, indicando o local onde foram medidos os coeficientes de variação. UFLA, Lavras, MG, 2012.

Os coeficientes de variação (CV) e conteúdos de DNA (pg) obtidos foram submetidos a análises de variância pelo teste F e, quando significativas, as médias dos CVs e dos conteúdos de DNA foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) no programa SISVAR (FERREIRA, 2011).



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo de DNA nuclear não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos e as estimativas obtidas revelaram que o conteúdo de DNA variou de 1,77 a 1,87 pg (Tabela 1). Este resultado é muito importante e, realmente, já era esperado que o resultado final das análises, que neste trabalho é o conteúdo de DNA nuclear das células, não se alterasse com o uso de diferentes programas. Isso evidencia que os softwares apresentaram uniformidade para essa função, podendo ser utilizado qualquer um dos quatro programas para análises de amostras de bananeira, uma vez que não será alterado o resultado do experimento.

Tabela 1 Valores médios de conteúdo de DNA nuclear (pg) e coeficiente de variação (%) obtidos por quatro softwares utilizados em citometria de fluxo. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Software</b>	<b>Conteúdo de DNA nuclear 2C (pg)</b>	<b>CV (%)</b>
CellQuest™	1,77 <sup>ns</sup>	3,20 b
WinMDI™	1,87	0,71 a
FlowJo™	1,84	4,70 c
FCS Express™	1,80	5,40 c
<b>CV (%)</b>	<b>20,5</b>	<b>30,0</b>

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

\*<sup>ns</sup> = não significativo.

No entanto, quando se observam os valores do coeficiente de variação, verifica-se que a precisão das análises não foi a mesma em todos os programas.

O WinMDI™ apresentou o menor valor médio para o CV. Em um primeiro momento, poderia se pensar que este seria o programa ideal, uma vez que o CV obtido foi mais baixo que os demais. No entanto, usuários afirmam

que este software subestima os valores de CV, de forma a fazer com que se pense que esse programa seja o que confere maior precisão das análises. Além disso, por algumas vezes, nas análises do padrão de referência, a média geométrica aparece com o valor zero, evidenciando, assim, um erro do programa.

O CellQuest™ é um software que acompanha os citômetros de fluxo da empresa BD Biosciences. Portanto, é de se esperar que esse software proceda a uma análise mais precisa dos dados, já que foi desenvolvido pelo próprio fabricante do equipamento. Além disso, tem custo elevado e só funciona em computadores com sistema operacional MacIntosh conectados a uma chave de segurança do programa. O valor médio do CV obtido pelo software é de 3,20%, sendo considerado aceitável para análises em citometria de fluxo. Valores próximos ou abaixo de 3% são considerados bons, enquanto CVs maiores que 5% não são considerados aceitáveis (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007). Segundo Weber et al. (2010), os CVs obtidos para culturas *in vitro* situam-se na faixa de 5% a 10%.

O CellQuest™, apesar de não ser gratuito, é um software bem completo, que realiza inúmeras análises celulares, ao contrário do WinMDI™ que, mesmo sendo gratuito, é considerado inferior, devido às ferramentas que oferece, sendo considerado um software com funções básicas (CHI, 2010).

Os softwares FlowJo™ e FCS Express™ também são pagos e possuem muitos recursos para análises avançadas, sendo considerados ótimos programas. Eles não diferiram significativamente entre si, apresentando valores aproximados de CV de 5%, os quais corroboram aqueles encontrados por Obae e West (2010), que obtiveram CV de 4,9%, em análises realizadas pelo *software* FCS Express™ para avaliação do conteúdo de DNA nuclear de *Hydrastis canadensis*. De forma similar, Chung, Weber e Hipp (2011) encontraram valores médios de CV na faixa de 4,3%, em análises realizadas no *software* FlowJo™

para a mesma característica na espécie *Carex scoparia* var. *scoparia* (Cyperaceae).

Para esses programas, os coeficientes de variação foram considerados muito elevados, no entanto, segundo Dolezel, Greilhuber e Suda (2007), esses valores ainda são aceitáveis quando a espécie em estudo apresenta alguma particularidade que interfira na qualidade das análises. A espécie *Musa acuminata* apresenta um teor significativo de compostos fenólicos que prejudica a qualidade final das análises de plantas *in vitro* (CAMOLESI et al., 2007), uma vez que, no momento do preparo das amostras, esses compostos precipitam, dificultando a leitura no citômetro.

Dolezel, Greilhuber e Suda (2007) alegam que a utilização de um software apropriado para avaliar a qualidade das análises é de suma importância. A vantagem de se utilizar um software mais rigoroso é que se exige do operador um maior cuidado no preparo das amostras, no intuito de conseguir obter sempre picos mais finos e, conseqüentemente, com CVs que não ultrapassem o limite de 5%.

Diante dos resultados, é possível recomendar o programa CellQuest™ para as análises de citometria de fluxo, quando o citômetro for da marca FACSCalibur ou outro similar da empresa BD Biosciences, pois o mesmo já vem instalado no equipamento, possui muitos recursos para análise e não altera os resultados finais, além de possuir boa precisão, como foi verificado pelas análises do coeficiente de variação. Os programas FlowJo™ e FCS Express™ também são considerados muito bons, porém, os valores obtidos para coeficiente de variação em ambos foram mais elevados. Além disso, possuem custo de aquisição significativo e, para quem já tem o CellQuest™ instalado no computador do citômetro, não é aconselhável adquiri-los. No entanto, funcionam em qualquer sistema operacional, ao contrário do CellQuest™. O WinMDI™ é o

menos confiável, no entanto, tem a vantagem de ser gratuito e, assim como todos os outros, não alterou o resultado de conteúdo de DNA das amostras.

#### **4 CONCLUSÃO**

Devido ao seu bom desempenho, recomenda-se a utilização do software CellQuest™ para usuários que possuam computadores acoplados a citômetros de fluxo Becton Dickinson (BD). FlowJo™ e FCS Express™ também podem ser utilizados nas situações em que o CellQuest™ não se aplica.

## REFERÊNCIAS

- BARRE, P. et al. Reliable flow cytometric estimation of nuclear DNA content in coffee trees. **Cytometry**, New York, v. 24, n. 1, p. 32-38, Feb. 1996.
- BONETTA, L. Flow cytometry smaller and better. **Nature Methods**, New York, v. 2, n. 10, p. 785-795, Oct. 2005.
- CAMOLESI, M. R. et al. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, jul./ago. 2007.
- CHI, K. R. Let the data flow: rethink your data analysis tools for flow cytometry. **The Scientist**, Ontario, v. 24, n. 6, p. 63-64, June 2010.
- CHUNG, K. S.; WEBER, J. A.; HIPPEL, A. L. Dynamics of chromosome number and genome size variation in a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia* var. *scoparia*, Cyperaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 98, n. 1, p. 122-129, Jan. 2011.
- DOLEZEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 1, p. 113-120, Feb. 1989.
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, 2007.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- GREILHUBER, J. et al. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 99 p.
- LOUREIRO, J. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 515-527, Mar. 2006.
- LOUREIRO, J. C. M. **Flow cytometric approaches to plant genomes**. 2007. 246 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Aveiro, Coimbra, 2007.

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

LOUREIRO, J. et al. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 679-689, June 2006.

\_\_\_\_\_. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 4, p. 875-888, Oct. 2007.

MACEY, M. G. **Flow cytometry: principles and applications**. Totowa: Humana, 2007. 289 p.

MARIE, D.; BROWN, S. C. Acytometric exercise in plant DNA histograms, with 2c values for seventy species. **Biology of the Cell**, London, v. 78, n. 1, p. 41-51, 1993.

OBAE, S. G.; WEST, T. P. Nuclear DNA content of *Hydrastis Canadensis* L. and genome size stability of *in vitro* regenerated plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 259-263, Aug. 2010.

RIESEBERG, M. et al. Flow cytometry in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3/4, p. 350-360, Aug. 2001.

WEBER, J. et al. Ploidy levels in *Beta vulgaris* (red beet) plant organs and *in vitro* systems. **Engineering in Life Sciences**, New York, v. 10, n. 2, p. 139-147, Feb. 2010.