



RAFAEL AZEVEDO ARRUDA DE ABREU

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA DE
BANANEIRA “OURO” COM AMIPROFÓS-
METIL E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO
CONTEÚDO DE DNA**

LAVRAS - MG

2015

RAFAEL AZEVEDO ARRUDA DE ABREU

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA DE BANANEIRA “OURO” COM
AMIPROFÓS-METIL E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO
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.

Orientadora

Dr^a. Leila Aparecida Salles Pio

Coorientadora

Dr^a. Gabrielen de Maria Gomes Dias

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Abreu, Rafael Azevedo Arruda de.

Duplicação cromossômica de bananeira “ouro” com amiprofós-
metil e avaliação da estabilidade do conteúdo de DNA / Rafael
Azevedo Arruda de Abreu. – Lavras : UFLA, 2015.

45 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientadora: Leila Aparecida Salles Pio.

Bibliografia.

1. *Musa acuminata* Colla. 2. Citometria de fluxo. 3.
Poliploidização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

RAFAEL AZEVEDO ARRUDA DE ABREU

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA DE BANANEIRA “OURO” COM
AMIPROFÓS-METIL E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO
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 07 de agosto de 2015.

Dr^a. Claudinéia Ferreira Nunes Incaper

Dr^a. Roselaine Cristina Pereira UFLA

Dr^a. Leila Aparecida Salles Pio
Orientadora

LAVRAS – MG

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo;

Aos meus pais, Nildo Antônio Arruda de Abreu e Marta de Bastos Azevedo Abreu, que sempre me incentivaram e me deram condições de avançar nos estudos;

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, instituição de excelência em Ciências Agrárias na qual me graduei em Agronomia, em destaque ao Departamento de Agricultura e Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o Mestrado;

À minha orientadora Dra. Leila Aparecida Salles Pio, pessoa de educação ímpar, sempre disponível e atenciosa, sou grato por ter tido a oportunidade de ser seu primeiro orientado de mestrado, espero ter correspondido às expectativas, assim como você superou todas as minhas;

À minha coorientadora Dra. Gabrielen de Maria Gomes Dias, pela amizade e contribuição dada para minha dissertação;

À Dra. Roselaine Cristina Pereira, pelos ensinamentos junto ao Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA, além da contribuição como parte da banca avaliadora;

À pesquisadora do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, Dra. Claudinéia Ferreira Nunes, pela disponibilidade e contribuição como parte da banca avaliadora;

A todos os meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, em especial Claret e Vantuil, profissionais altamente dedicados e capacitados, além de pessoas fantásticas, muito obrigado pelos ensinamentos, paciência e parceria;

À Marli, secretária de Pós-graduação/Fitotecnia-UFLA, pela paciência e presteza em todos os momentos;

A todos os funcionários do Pomar da UFLA, responsáveis pelo bom funcionamento do setor, em especial ao Arnaldo, pessoa de alegria contagiante;

Aos meus amigos e colegas do programa de pós-graduação da UFLA, em especial Douglas Correa e Douglas Goulart, pela amizade verdadeira nos bons momentos e também nos de dificuldade;

Aos amigos de longa data, que mesmo não participando da minha vida acadêmica, são de grande importância na minha vida pessoal;

À Talita Alvarenga, por todos os momentos vividos ao meu lado, pessoa de importância indescritível na minha vida;

A todos os meus tios e primos, que são de valor inestimável para mim;

À Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudo;

À EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical pela parceria realizada junto à Universidade Federal de Lavras.

RESUMO

Em programas de melhoramento genético de bananeira diversas estratégias são usadas, dentre elas a de duplicação cromossômica *in vitro* de diploides AA/BB para gerar tetraploides, que posteriormente serão cruzados com diploides melhorados permitindo a criação de triploides secundários AAA/AAB, que se beneficiam do efeito “gigas”. Assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito do Amiprofós-metil (APM) na indução de duplicação de cromossomos em explantes da bananeira “Ouro”, cultivar diploide (AA) que possui características importantes para o melhoramento genético, bem como a estabilidade no conteúdo de DNA das plantas ao longo de 30 dias. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, situado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA, utilizando como material vegetal explantes de bananeira “Ouro”, diploide (AA), cedidos pela EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Inicialmente os explantes foram estabelecidos *in vitro* em meio MS suplementado com 2,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,7g L⁻¹ de Phytigel e pH 5,8. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 20 tratamentos, que consistem nas 5 diferentes doses de APM e os 4 tempos de exposição do explante ao antimetabólito, sendo 13 plantas por parcela. Após estabelecimento *in vitro*, os explantes foram repicados e transferidos para um novo meio MS suplementado com o antimetabólito APM nas seguintes concentrações: 0, 25, 50, 75 e 100 µM, onde permaneceram por 2, 4, 6 e 8 dias. Após o tempo de exposição dos explantes ao APM, os mesmos foram transferidos para um novo meio MS e foram mantidos até o momento das análises de citometria de fluxo, realizadas 30 e 60 dias após a última transferência de meio para identificação das plantas com o conteúdo de DNA duplicado. Após a análise em citômetro de fluxo da primeira leitura, observaram-se 204 plantas diploides (78,5%), 30 mixoploides (11,5%), 5 tetraploides (1,9%) e 21 plantas mortas ou sem área foliar suficiente para análise (8,1%). Na segunda análise de citometria observaram-se 183 plantas diploides (70,4%), 23 mixoploides (8,9%), 4 tetraploides (1,5%) e 50 plantas mortas/sem folha (19,2%); percebe-se maior mortalidade no tempo de exposição de 4 dias e nas concentrações mais altas. O tratamento de concentração 75 µM por 6 dias gerou maior número de plantas com material genético duplicado, além de manter estável o conteúdo de DNA ao longo do tempo estudado.

Palavras-chave: *Musa acuminata* Colla. Citometria de fluxo. Melhoramento. Poliploidização. Antimetabólito.

ABSTRACT

In banana breeding programs several of strategies are used, among them the diploid *in vitro* chromosomic duplication AA/BB to generate tetraploid, which posteriorly they are crossed with improved diploid allowing the creation of secondary triploids AAA/AAB, that benefit from the "gigas" effect. Therefore, the present study aims to evaluate the effect of Amiprophos-methyl (APM) in the induction of chromosomes duplication in explants of banana "Ouro", diploid cultivar that has important features for genetic improvement, as well as the genetic stability of the DNA content of the plants over 30 days. The experiment was conducted at Tissue Culture Laboratory, located in the Department of Agriculture of the Federal University of Lavras – UFLA, utilizing explants of banana "ouro" as plant material, diploid (AA), donated by EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Initially, the explants were established *in vitro* on MS medium supplemented with 2,5 mg L⁻¹ of BAP (6-benzylaminopurine), 30 g L⁻¹ of sucrose, 1,7g L⁻¹ of Phytigel and pH 5,8. Completely randomized design was used with 20 treatments, consisting of the 5 different doses of APM and 4 times of exposure of explants to antimetabolic, with 13 plants per plot. After the *in vitro* establishment, the explants were cut and transferred to a new MS medium supplemented with antimetabolic APM in the following concentrations: 0, 25, 50, 75 and 100 µM, where they remained for 2, 4, 6 and 8 days. After the exposure time of the explants at APM, these were transferred to a new MS medium where they were kept until the moment of the flow cytometry analysis, performed 30 and 60 days after the last medium transfer for identifying plants with duplicated DNA content. After the flow cytometer analysis in the first reading, it was observed 204 diploids plants (78.5%), 30 mixoploids (11.5%), tetraploids 5 (1.9%) and 21 dead plants or no leaf area enough for analysis (8.1%). In analysis of second reading were observed 183 diploids plants (70.4%), 23 mixoploids (8.9%), tetraploids 4 (1.5%) and 50 dead plants or no leaf area enough for analysis (19.2%); realize a higher mortality in the exposure time of four days and at higher concentrations. Treatment of concentration 75 µM for 6 days afforded higher numbers of plants with genetic material duplicated, besides maintaining stable DNA content along the studied time.

Key words: *Musa acuminata* Colla. Flow cytometry. Breeding. Polyploidization. Antimetabolic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Preparo das amostras para análise do conteúdo de DNA em citometria de fluxo.....	23
Figura 2	Histogramas de amostras oriundas de bananeira “Ouro” cultivadas <i>in vitro</i> apresentando os diferentes níveis de ploidia obtidos na citometria de fluxo: A) Diploide (2x); B) Mixoploide (2x + 4x) e C) Tetraploide (4x)	31
Figura 3	Conteúdo de DNA (pg) em função da concentração de APM (μM) dos explantes submetidos a 2 dias de exposição.....	33
Figura 4	Conteúdo de DNA (pg) em função da concentração de APM (μM) dos explantes submetidos a 4 dias de exposição.....	34
Figura 5	Conteúdo de DNA (pg) em função da concentração de APM (μM) dos explantes submetidos a 6 dias de exposição.....	35
Figura 6	Conteúdo de DNA (pg) em função da concentração de APM (μM) dos explantes submetidos a 8 dias de exposição.....	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Análise de citometria das plantas submetidas a diferentes tratamentos de concentração de APM e tempo de exposição, apresentando o número de plantas em suas diferentes ploidias (Dip., Mix., Tet.) ou mortas/sem folhas (Mor.) nas duas análises26
- Tabela 2 Número e porcentagem de plantas com diferentes ploidias nas duas análises de citometria de fluxo.....28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	A cultura da bananeira	13
2.2	Melhoramento genético da bananeira	14
2.3	Duplicação cromossômica	16
2.4	Citometria de fluxo	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Local de condução do bioensaio	21
3.2	Multiplicação do material vegetal e tratamento com o agente antimitótico	21
3.3	Quantificação de DNA por citometria de fluxo	22
3.4	Análise estatística	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS	38
	APÊNDICE	45

1 INTRODUÇÃO

A bananicultura destaca-se como uma atividade de grande importância econômica e social, sendo praticada na maioria das vezes por pequenos agricultores. Com uma produção anual de cerca de 106 milhões de toneladas, a bananeira ocupa a segunda posição na produção mundial dentre as frutíferas, sendo que os frutos não são usados somente para consumo *in natura*, mas também são processados de diversas formas, tais como: passas, doces, chips, polpas, cerveja, vinho e álcool (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014). A bananeira, juntamente com o arroz, o trigo e o milho são considerados as fontes alimentares mais importantes do mundo.

No Brasil, a banana também ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas. Está entre as frutas mais consumidas nos domicílios das principais regiões metropolitanas do país, sendo superada apenas pela laranja. Presente nas mais diversas camadas da população, a banana aparece na mesa dos brasileiros não apenas como sobremesa, mas como alimento, com um consumo per capita em torno de 25 kg ano⁻¹. Isto demonstra a importância do melhoramento com o objetivo de aperfeiçoar e lançar novos materiais que supram as necessidades da cultura.

De maneira geral, o melhoramento genético visa obter genótipos com precocidade de produção, elevada produtividade, porte baixo, bom sistema radicular, eficiência no uso de água e nutrientes, frutos de qualidade (tamanho, forma, sabor e aroma) e resistência às principais pragas e doenças da cultura.

A bananeira apresenta peculiaridades que direcionam o melhorista na utilização de diferentes estratégias de melhoramento. Considerando os problemas de esterilidade, grandes progressos foram obtidos nestes últimos anos de pesquisas com essa cultura em nível mundial. Basicamente, duas estratégias são

priorizadas para desenvolver novas cultivares de bananeira; a primeira está associada com o desenvolvimento de tetraploides a partir da hibridação entre 3x e 2x; e a segunda envolve a geração de triploides secundários a partir do cruzamento entre 4x e 2x.

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

A poliploidização *in vitro* é baseada na aplicação de substâncias antimitóticas em explantes como ápices caulinares, meristemas, agregados de brotos ou suspensões de células embriogênicas sob condições assépticas, seguida de sucessivos subcultivos para regeneração das plantas, pré-seleção e identificação dos tetraploides estáveis. Para induzir a duplicação cromossômica, a colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$) é a substância mais amplamente utilizada, entretanto, devido a sua elevada toxicidade e mutagenicidade em humanos, bem como alta fitotoxicidade *in vitro*, outros compostos como o Amiprofós-metil (APM) estão sendo estudados como alternativa à colchicina para a duplicação cromossômica.

Assim, objetivou-se neste trabalho, avaliar a eficiência da duplicação de cromossomos de bananeira ouro, mediante a aplicação *in vitro* do antimitótico Amiprofós-metil adicionado diretamente em meio de cultura; bem como avaliar a estabilidade no conteúdo de DNA do material ao longo do tempo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da bananeira

A cultura da bananeira assume importância econômica e social em todo o mundo sendo cultivada em mais de 80 países tropicais, principalmente por pequenos agricultores (GONÇALVES et al., 2008).

O Brasil é o quarto produtor mundial da fruta, atrás apenas da Índia, China e Filipinas, tendo produzido aproximadamente 7,0 milhões de toneladas em 2013, em uma área aproximada de 481 mil hectares (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014), tendo exportado 95.699 toneladas nesse mesmo ano (AGRIANUAL, 2014).

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

Cruzamentos interespecíficos entre *Musa acuminata* Colla (genoma A, $2n=2x=22$) e *Musa balbisiana*, Colla (genoma B, $2n=2x=22$) deram origem à maioria dos genótipos de bananeiras atualmente consumidas, razão pela qual as plantas geradas destes cruzamentos apresentam características das duas espécies (SIMMONDS, 1973).

As cultivares mais exploradas no país são a Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D'Angola, grupo genômico (AAB), utilizadas unicamente para o mercado interno, e a Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo (AAA), usadas, principalmente, no mercado para exportação. As bananeiras Ouro (AA), Figo Cinza e Figo Vermelho (ABB), Caru Verde e Caru Roxa (AAA) também merecem destaque na bananicultura, apesar de serem plantadas em menor escala. As cultivares Prata, Prata Anã e Pacovan são responsáveis por quase 60% da área cultivada no Brasil (BORGES et al., 2009). No entanto, apesar da representatividade e importância de todos estes genótipos, eles são suscetíveis às principais pragas e doenças da bananeira, que podem ocasionar perdas na produção de até 100%, de acordo com as práticas culturais realizadas e as condições ambientais (SILVA; BOLIANI; CORRÊA, 2006).

A suscetibilidade dessas variedades a diversas doenças, entre as quais as Sigatokas-negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) e Amarela (*Mycosphaerella musicola*, Leach), destaca a importância do melhoramento genético na busca por cultivares resistentes (ROQUE et al., 2014).

2.2 Melhoramento genético da bananeira

Apesar da importância da bananicultura, poucas cultivares estão disponíveis para exploração comercial com potencial agrônomo, que apresentem frutos de boa qualidade e que sejam tolerantes a pragas e doenças (SILVA et al., 2013), havendo a necessidade de que os programas de melhoramento da cultura gerem novas cultivares mais adaptadas ao cenário atual.

As medidas de controle químico utilizadas no combate a pragas e doenças não são válidas ou são pouco aplicáveis para os pequenos agricultores, que representam a grande maioria dos produtores brasileiros de bananeira.

Assim o uso de cultivares resistentes torna-se a medida de controle considerada mais eficiente (AMORIM et al., 2011). A criação de novas variedades resistentes não depende da ação do produtor durante a fase de crescimento das plantas, não é prejudicial ao meio ambiente e, geralmente, é compatível com outras técnicas de manejo.

Embora no Banco de Germoplasma de Bananeira da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Mandioca e Fruticultura exista variabilidade genética suficiente (diploides AA), o melhoramento é dificultado pela esterilidade constatada em alguns diploides e triploides, além da falta de conhecimento do tipo de herança das resistências. As dificuldades resultantes da baixa produção de sementes ou em alguns casos, ausência das mesmas em cruzamentos, podem ser contornadas mediante a escolha adequada dos genitores e ou pelo uso de tecnologias não convencionais de melhoramento. Vale ressaltar que, por meio de hibridações, uma série de cultivares já foi desenvolvida e recomendada pela Embrapa (SILVA, et al., 2011; SILVA; MORAIS-LINO; SEREJO, 2011).

Um método bastante promissor para o desenvolvimento de triploides secundários passa pela indução da duplicação de cromossomos de diploides por meio de agentes mutagênicos, tais como a colchicina e orizalina (COSTA et al., 2011), além do APM e trifluralina (KHOSRAVI et al., 2008). A duplicação de cromossomos permite a criação de triploides secundários AAA/AAB promissores. Para isso, inicialmente é feita a duplicação cromossômica de diploides “elites” AA/BB gerando-se tetraploides, que posteriormente serão cruzados com diploides melhorados (BAKRY et al., 2007).

A duplicação de cromossomos tem como vantagens principais: 1) combinação genética selecionada em nível diploide mantida em sua totalidade ou parcialmente nos híbridos triploides secundários; 2) obtenção de híbridos estéreis; 3) possibilidade de utilizar diploides selvagens como parentais masculinos para a obtenção de um grande número de sementes; 4) introdução de

resistência a doença por meio do cruzamento com diploide melhorado e, conseqüentemente, a avaliação de uma progênie triploide numerosa. O grande benefício dessa metodologia está no fato de permitir a associação entre as características agrônômicas dos parentais diploides, assim como de permitir a maximização da heterose na progênie triploide (SILVA et al., 2013).

Vale ressaltar que a ploidia influencia diretamente no fenótipo e parâmetros de produção, sendo que diploides apresentam porte menor, frutos pequenos e baixo rendimento de polpa, além de frequentemente apresentarem sementes, enquanto materiais triploides e tetraploides, que correspondem à maioria das cultivares comerciais disponíveis, apresentam porte mais elevado, frutos maiores e sem sementes (OSELEBE; TENKOUANO, 2009).

Portanto, uma variedade melhorada pode induzir um aumento de produtividade e um menor custo de produção, em função do reduzido emprego de defensivos agrícolas e redução de gastos com o manejo da cultura, aumentando, conseqüentemente, a renda líquida do produtor (SILVA et al., 2013).

2.3 Duplicação cromossômica

A indução da duplicação cromossômica ou poliploidização é de interesse para os programas de melhoramento genético de plantas, tendo distintas finalidades para várias espécies. Metodologias eficientes de duplicação cromossômica podem contribuir para acelerar etapas dos programas de melhoramento e viabilizar o emprego de estratégias que não são possíveis naturalmente (PEREIRA et al., 2012).

A utilização de antimitóticos na agricultura tem sido feita principalmente em programas de melhoramento genético para a geração de

plantas poliploides. Geralmente, a poliploidização é induzida para restaurar a fertilidade de híbridos interespecíficos (RODRIGUES, 2010).

O maior grupo de agentes antimitóticos são os inibidores que agem na metáfase. Durante a metáfase, um fuso de microtúbulos surge do Centro Organizador dos Microtúbulos (MTOC), fuso esse que combina dímeros de α - e β -tubulina (proteínas no fuso mitótico), e que é essencial para a correta migração polar dos cromossomos durante a anáfase (DEWITTE; MURRAY, 2003). Com isso, a inibição da separação dos cromossomos irá resultar em células com o número de cromossomos duplicados (DHOOGUE et al., 2011).

A colchicina é o antimitótico mais usado para a indução da poliploidia, embora forneça resultados satisfatórios, a colchicina é um alcaloide altamente tóxico e mutagênico, fato que tem estimulado a busca por agentes antimitóticos alternativos com eficácia similar ou superior a ela (PEREIRA et al., 2012), tais como, amiprofós-metil, cafeína (SCAGLIUS et al. 2009), trifluralina e orizalina (QUESENBERRY et al. 2010), que apresentam toxicidade menor que a colchicina (PAULA, 2014). Eles atuam de maneira similar à colchicina, embora sejam menos tóxicos que essa substância (MOREJOHN; FOSKET, 1984). A eficiência do APM e trifluralina é variável, mas a maioria dos resultados tem sido promissores (KHOSRAVI et al., 2008).

O herbicida do grupo organofosforado amiprofós-metil (APM) atua diretamente na dinâmica de polimerização dos microtúbulos, por meio de um mecanismo envolvendo alterações dos níveis intracelulares de cálcio. Dessa forma, esse herbicida interage com a tubulina de maneira similar à inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina (MOREJOHN; FOSKET, 1984), são utilizados na agricultura em todo mundo, pois são rapidamente degradados e apresentam pouco resíduo ao meio ambiente (BRAHMA; UMESH, 1985) e, mesmo em baixas concentrações impedem a polimerização

dos microtúbulos inibindo a formação das fibras dos fusos que induzem a separação dos cromossomos.

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

Os protocolos de duplicação de cromossomos variam de acordo com o tipo de antimitótico a ser utilizado, tipo de explante, tempo de exposição, concentração, método de aplicação e técnica de confirmação (DHOOGUE et al., 2011).

A duplicação cromossômica *in vitro* é frequentemente induzida por uma breve aplicação do antimitótico em meio líquido, com agitador, seguido pela cultura de novos explantes poliploides em meio de regeneração (DHOOGUE et al., 2011). Diversos trabalhos são realizados com essa metodologia de aplicação (AMARAL et al., 2015; COSTA et al., 2011; PIO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013).

O sucesso da poliploidização depende do tipo de explante, no sentido da permeabilidade do tecido e da capacidade de transporte do agente antimitótico para o meristema. Concentração em interação com o tempo de exposição são parâmetros importantes, tendo em vista que, concentrações baixas não são bem sucedidas, enquanto concentrações excessivamente altas são letais; além disso, concentrações e tempos de exposição elevados podem resultar em redobramento, o que conduz a célula a níveis de ploidia mais elevados do que os desejados (ALLUM et al., 2007). O antimitótico pode ser utilizado em meio líquido por um curto período de tempo, com posterior estabelecimento em meio sólido, ou aplicado diretamente em meio sólido, integrado no protocolo *in vitro* (DHOOGUE et al., 2011).

A eficiência do processo de duplicação cromossômica pode ser verificada por alguns métodos que determinam a ploidia do material: citometria de fluxo, contagem de cromossomos, avaliação dos parâmetros morfológicos e anatomia vegetal.

2.4 Citometria de fluxo

O método de detecção de poliploides mais utilizado é a citometria de fluxo (DHOOGUE et al., 2011), portanto, uma técnica comum de análise de ploidia (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007; EECKHAUT; LEUS; VAN HUYLENBROECK, 2005).

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve dispersão da luz, fluorescência, radiação, laser, fluxo hidrodinâmico e substâncias fluorescentes (fluorocromos) na determinação de algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas (células, núcleos, cromossomos, organelas), para isso é necessário utilizar um equipamento denominado citômetro de fluxo (SILVA, 2012). O citômetro de fluxo típico consiste de recursos fluídicos, ópticos, eletrônicos, mecânicos e computacionais (SKLAR, 2005).

São muitas as aplicações da citometria de fluxo em plantas como, por exemplo, expressão gênica, detecção de metabólitos secundários, identificação de híbridos somáticos e de transferência de DNA, detecção de aneuploidia, identificação do sexo em plantas dioicas, estudo do ciclo celular e endopoliploidia, composição da cromatina, conteúdo de bases, estudo e detecção de patógenos em plantas, entre outros. Porém, a maior aplicação dessa ferramenta em plantas, atualmente, é para análises de ploidia e estimativas do conteúdo de DNA nuclear (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

A determinação do nível de ploidia, por técnica de citometria de fluxo, é obtida pela comparação do conteúdo entre o DNA de uma planta padrão com

nível de ploidia conhecido e o conteúdo de DNA de uma planta de que se deseja conhecer o nível de ploidia. Essa técnica é promissora, pois permite a análise de grande número de indivíduos de modo rápido e prático (PIO, 2008).

A citometria de fluxo além de ser um método rápido, não requer células exclusivamente em processo de divisão, vantagens em relação à contagem de cromossomos, sendo então capaz de detectar pequenas variações no conteúdo de DNA (DOLEZEL et al., 1998). A metodologia se baseia na medida de conteúdo de DNA (2C) dos núcleos no ciclo celular da mitose como meio de inferência da ploidia. No ciclo celular a célula apresenta quatro fases distintas: G1, S, G2 e mitose. Na fase G1, a célula diploide apresenta conteúdo de DNA igual a 2C, onde o C denota o conteúdo de DNA em uma célula haplóide, assim nessa fase o conteúdo de DNA possui duas cópias de cada gene. Na fase seguinte (S), há a síntese de DNA (duplicação de cromossomos) e a célula passa para a fase G2, onde o conteúdo de DNA passa a 4C. Na fase final da mitose são formadas as células-filha, cujo conteúdo de DNA passa novamente a 2C (LOUREIRO; SANTOS, 2004; LOUREIRO, 2007).

No campo da biotecnologia de plantas, a citometria é utilizada para triagem da ploidia de plantas regeneradas *in vitro* (PINTO et al., 2004; LOUREIRO et al., 2005; GHIMIRE et al., 2012), detecção de poliploidia, mixoploidia e aneuploidia (ELMAGHRABI; OCHATT, 2006; TANG et al., 2010), avaliação do grau de polissomatia (IANTCHEVA et al., 2001), ocorrência de endoreduplicação (LEMA-RUMINSKA, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de condução do bioensaio

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, situado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA, utilizando como material vegetal explantes de bananeira “Ouro”, diploide (AA), cedidas pela EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.

Os explantes foram inicialmente estabelecidos *in vitro* em meio Murashige & Skoog (1962) suplementado com 2,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,7 g L⁻¹ de Phytigel™ e pH 5,8. Posteriormente foram repicados e transferidos para o meio MS contendo o antimetabólito APM.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 20 tratamentos, constituídos por 5 diferentes concentrações de Amiprofós-metil (APM) e 4 tempos de exposição do explante ao antimetabólito, sendo 13 plantas por parcela.

3.2 Multiplicação do material vegetal e tratamento com o agente antimetabólito

Após estabelecimento *in vitro* dos explantes, os mesmos foram repicados e transferidos para um meio MS suplementado com antimetabólito APM nas seguintes concentrações: 0, 25, 50, 75, 100 µM, onde permaneceram por 2, 4, 6 e 8 dias, formando então os diferentes tratamentos.

Terminado o tempo de exposição dos explantes ao APM, eles foram novamente transferidos para meio MS, porém sem o antimetabólito, onde foram

mantidos até o momento das posteriores análises de citometria de fluxo, que foram realizadas 30 e 60 dias após a última transferência de meio.

3.3 Quantificação de DNA por citometria de fluxo

Com o uso de pinça e bisturi, o tecido foliar foi retirado em câmara de fluxo laminar, a fim de se evitar a contaminação dos explantes para posteriores análises; logo após, os tubos de ensaio contendo os explantes foram lacrados novamente com filme plástico.

Para a determinação do conteúdo de DNA, 20-30 mg de tecido foliar dos explantes, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar do padrão interno *Pisum sativum* (9,09 pg de DNA) foram triturados com bisturi em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie gelado para a liberação dos núcleos (DOLEZEL et al., 1998). A suspensão de núcleos foi aspirada com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 μm (Figura 1). Os núcleos foram corados pela adição de 25 μL de uma solução de 1 mg mL^{-1} de iodeto de propídeo para cada amostra. Em cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada utilizando o citômetro modelo Facscalibur (Becton Dickinson), mantido no Laboratório de Cultura de Tecidos do DAG-UFLA. Os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente pelo software WinMDI 2.8.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*P. sativum*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg). Foram utilizadas 6 repetições, uma planta por repetição.

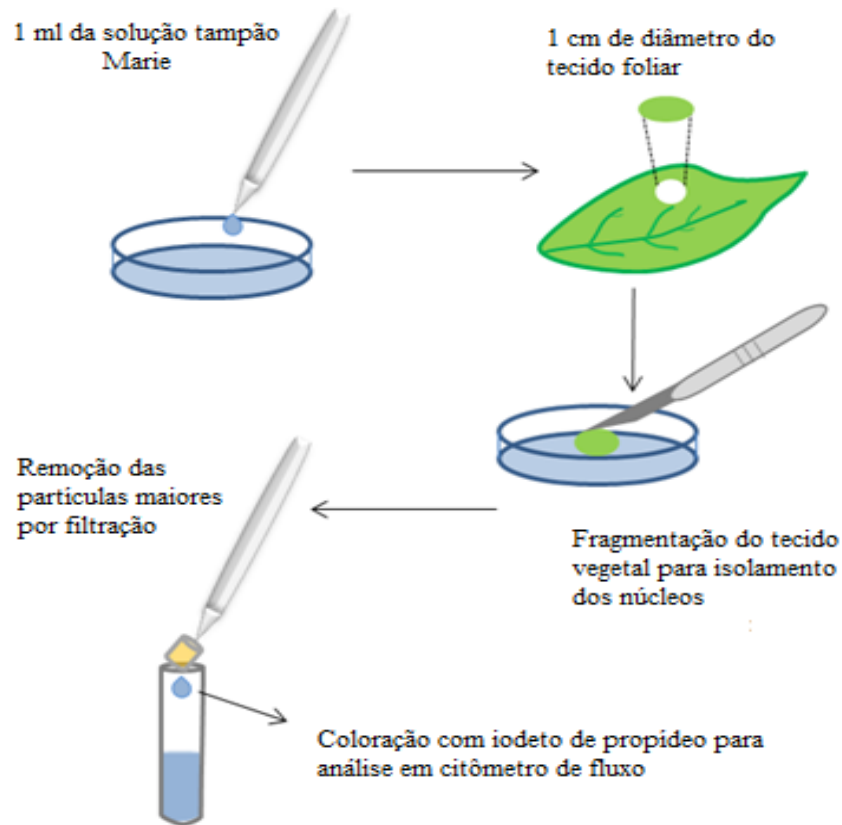


Figura 1 Preparo das amostras para análise do conteúdo de DNA em citometria de fluxo

3.4 Análise estatística

Para análise dos dados gerados pelo software WinMDI 2.8, foi utilizado o programa R, também chamado de GNU S.

Foi utilizado um modelo linear misto com dados desbalanceados. Nesse caso, para os efeitos aleatórios, utilizou-se o teste da razão de verossimilhança (LTR), e para os efeitos fixos, um teste F aproximado. Um quadro similar ao quadro de análise de variância pode ser elaborado. Os resultados foram

submetidos à análise de deviance (Anadev) estabelecida segundo Resende (2007):

- a) Obtenção do logaritmo do ponto de máximo da função de verossimilhança residual (L) para modelos com e sem o efeito a ser testado;
- b) Obtenção da deviance $D = -2\text{Log } L$ para modelos com e sem o efeito a ser testado;
- c) Fazer a diferença entre as deviances para os modelos sem e com o efeito a ser testado, obtendo a razão de verossimilhança (LR);
- d) Testar, via LTR, a significância dessa diferença usando o teste qui-quadrado com 1 grau de liberdade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, pretendeu-se obter uma metodologia diferente da tradicional, em que concentrações de APM foram adicionadas em meio de cultura por diferentes períodos de exposição, para tentar reduzir a mortalidade dos explantes e obter maior número de plantas tetraploides com esse antimetabólico. Adicionalmente realizaram-se duas análises de citometria de fluxo; a primeira, 30 dias após a instalação do experimento, já a segunda, 30 dias após a primeira a fim de se avaliar a estabilidade do DNA ao longo do tempo.

De acordo com a tabela 1, dos 260 explantes estabelecidos, obtivemos na primeira análise de citometria, 204 diploides, 5 tetraploides, 30 mixoploides e 21 explantes mortos ou sem folha para análise; na segunda análise obtivemos 183 diploides, 4 tetraploides, 23 mixoploides e 50 explantes mortos ou sem folha para análise.

Em relação à mortalidade, observa-se um aumento da primeira para a segunda análise, com destaque para o tempo de exposição de 4 dias, que gerou mais mortes de explantes que os demais, e para o de 8 dias na segunda análise, parte desse acréscimo entre as análises se deve à contaminação dos explantes no momento da retirada da folha para a primeira citometria; porém o restante presume-se que seja efeito da fitotoxicidade do APM aliada ao tempo de exposição.

Tabela 1 Análise de citometria das plantas submetidas a diferentes tratamentos de concentração de APM e tempo de exposição, apresentando o número de plantas em suas diferentes ploidias (Dip., Mix., Tet.) ou mortas/sem folhas (Mor.) nas duas análises

Trat. (Tempo x Concentração)	1ª análise (30 dias)				2ª análise (60 dias)			
	Dip.	Mix.	Tet.	Mor.	Dip.	Mix.	Tet.	Mor.
T1 (T2xC0)	13	-	-	-	13	-	-	-
T2 (T2xC25)	13	-	-	-	13	-	-	-
T3 (T2xC50)	10	2	1	-	11	2	-	-
T4 (T2xC75)	9	4	-	-	7	5	1	-
T5 (T2xC100)	7	3	1	2	7	3	-	3
T6 (T4xC0)	11	-	-	2	10	-	-	3
T7 (T4xC25)	12	-	-	1	11	-	-	2
T8 (T4xC50)	8	4	-	1	11	1	-	1
T9 (T4xC75)	11	1	-	1	8	2	-	3
T10 (T4xC100)	8	1	-	4	3	2	-	8
T11 (T6xC0)	13	-	-	-	11	-	-	2
T12 (T6xC25)	13	-	-	-	12	-	-	1
T13 (T6xC50)	11	1	-	1	11	1	-	1
T14 (T6xC75)	9	2	2	-	9	-	3	1
T15 (T6xC100)	4	3	-	6	4	2	-	7
T16 (T8xC0)	13	-	-	-	13	-	-	-
T17 (T8xC25)	13	-	-	-	13	-	-	-
T18 (T8xC50)	10	3	-	-	9	3	-	1
T19 (T8xC75)	12	-	-	1	4	1	-	8
T20 (T8xC100)	4	6	1	2	3	1	-	9
Total	204	30	5	21	183	23	4	50

Os valores de taxa de mortalidade foram bem mais baixos que os encontrados por Rodrigues et al. (2011), em que obtiveram 14,6% de mortalidade no período de exposição ao APM de 48 horas, tempo similar ao mínimo utilizado no presente trabalho. Isso significa que a metodologia pode ter sido eficiente para diminuir a mortalidade das plantas tratadas.

A utilização de citometria de fluxo para identificar a duplicação dos cromossomos ou para determinar o conteúdo de DNA nuclear foi descrita em vários estudos (COSTICH et al., 2010; GRZEBELUS; ADAMUS, 2004; HOFER; MEISTER, 2010; NEMORIN et al., 2013; PINTO et al., 2004; VUJOVIC; CEROVIC; RUZIC, 2012; XING et al., 2011). O fenômeno da mixoploidia é comumente encontrado em trabalho de indução de duplicação, e a citometria de fluxo é eficiente na detecção e confirmação desses casos (PIO et al., 2014).

Ainda na tabela 1, no tratamento 3 (2 dias de exposição do explante à concentração de 50 μM do APM) foram obtidas 1 planta tetraploide, 2 mixoploides e 10 diploides na primeira análise de citometria de fluxo; porém na segunda análise essa planta tetraploide não foi detectada, as mixoploides se mantiveram em 2 e as diploides aumentaram para 11, o que nos indica que a planta tetraploide não se manteve estável ao longo do tempo e mudou para mixoploide, enquanto uma das 2 mixoploides também não se manteve estável e retornou à condição diploide.

No tratamento 4 (2 dias de exposição do explante à concentração de 75 μM do APM) foram obtidas 4 plantas mixoploides e 9 diploides na primeira análise de citometria de fluxo; já na segunda análise surgiu 1 planta tetraploide, provavelmente a partir de uma mixoploide que enfim se estabilizou na ploidia de $4x=44$ cromossomos.

Observou-se no tratamento 5 (2 dias de exposição do explante à concentração de 100 μM do APM) a mortalidade da planta tetraploide detectada na primeira análise de citometria de fluxo, tendo em vista que na segunda análise ela não apareceu e a frequência das demais ploidias se manteve, morte essa podendo ser resultado da concentração mais elevada do antimitótico ou devido à contaminação do material.

Já no tratamento 14 (6 dias de exposição do explante à concentração de 75 μM do APM) foram obtidas 2 plantas tetraploides, 2 mixoploides e 9 diploides na primeira análise de citometria de fluxo; na segunda análise uma planta mixoploide se estabilizou na condição tetraploide e a outra morreu, portanto esse tratamento resultou em 3 plantas tetraploides, ou seja, 23,08% de duplicação cromossômica, valor próximo aos obtidos por Rodrigues et al. (2011), que na concentração de 80 μM de APM obteve 18,18% de tetraploides para o genótipo de bananeira 1304-04 e 21,43% para o genótipo 8694-15.

No que diz respeito à porcentagem geral de plantas tetraploides (Tabela 2), os valores encontrados foram muito próximos aos encontrados por Paula (2014), que obteve 1,3% de tetraploides, porém utilizando colchicina como antimetabólito no meio. Utilizando o APM, Rodrigues et al. (2011) obtiveram valores mais altos, 66,67% de plantas tetraploides no diploide 1304-04, com a utilização de 40 μM por 24 horas e 18,18% em 80 μM por 48 horas e no diploide 8694-15, e usando 40 e 80 μM por 48 horas, foram observados, respectivamente, 27,27 e 21,43% de plantas tetraploides, porém a aplicação foi em solução líquida sob agitação.

Tabela 2 Número e porcentagem de plantas com diferentes ploidias nas duas análises de citometria de fluxo

Análise	Diploides	Tetraploides	Mixoploides	Mortas/sem folha
1 (30 dias)	204 (78,5%)	5 (1,9%)	30 (11,5%)	21 (8,1%)
2 (60 dias)	183 (70,4%)	4 (1,5%)	23 (8,9%)	50 (19,5%)

Também na tentativa de estabelecer um protocolo simples e eficiente para duplicação cromossômica em cebola (*Allium cepa* L.), Grzebelus e Adamus (2004) obtiveram 30,2% e 34,8% de duplicação em 24 e 72h de exposição ao APM respectivamente, utilizando a concentração de 50 μM , considerando

também o fato de que o APM proporcionou menores taxas de vitrificação conclui ser a melhor opção dentre os demais agentes antimitóticos.

As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando como padrão de referência a ervilha (*Pisum sativum*), nos experimentos de Jesus (2010) e Madail (2011), também foram utilizados este padrão, que possui um conteúdo de 2 C de DNA de 9,09 pg. Este padrão foi escolhido por possuir um conteúdo de DNA de valor médio para a maioria dos conteúdos de DNA vegetal, podendo então ser utilizado para avaliar tanto plantas com um pequeno genoma quanto aquelas com um genoma grande. Além disso, o genoma nuclear das ervilhas é estável e o preparo de suspensões de núcleos a partir das suas folhas não libera composto que interfere na coloração pelo iodeto de propídeo (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

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

Na figura 2 estão representados os histogramas obtidos pelas análises de citometria de fluxo, caracterizando os três diferentes níveis de ploidias encontrados nas amostras. No histograma que caracteriza uma amostra diploide (Figura 2A), os núcleos analisados concentram-se na fase G1 da interfase, formando um pico de menor valor de intensidade de fluorescência, que está diretamente relacionada à quantidade de DNA da amostra, ou seja, não houve a duplicação do DNA.

Na Figura 2B observa-se um histograma de uma amostra mixoploide, com picos nas fases G1 e G2 da interfase com um vale entre eles representando a fase S, portanto trata-se de um material com diferentes níveis de ploidia (células diploides e tetraploides) na mesma amostra, o que não é interessante em um programa de melhoramento genético devido ao fato de que as células diploides se multiplicam em taxa superiores às células tetraploides.

Por fim na figura 2C, observa-se um histograma de uma amostra tetraploide, os núcleos estão concentrados na fase G2 da interfase, formando um pico de maior intensidade de fluorescência, com o dobro de DNA nuclear em relação ao pico G1, caracterizando então que houve a duplicação cromossômica da amostra.

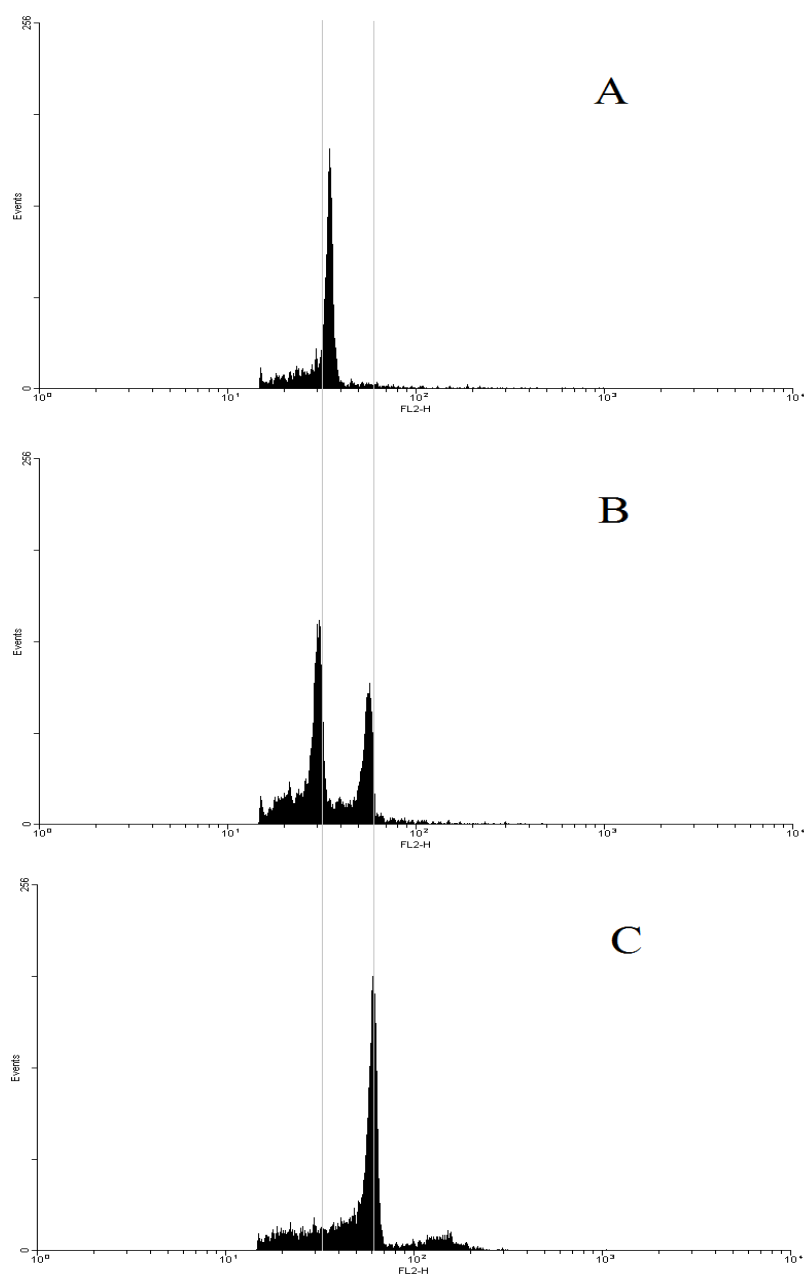


Figura 2 Histogramas de amostras oriundas de bananeira “Ouro” cultivadas *in vitro* apresentando os diferentes níveis de ploidia obtidos na citometria de fluxo: A) Diploide (2x); B) Mixoploide (2x + 4x) e C) Tetraploide (4x)

Um dos problemas geralmente encontrados no processo de duplicação cromossômica é o surgimento de plantas mixoploides, ou seja, plantas que apresentam células com variações no número cromossômico ou na ploidia em um mesmo tecido ou entre órgãos de uma mesma planta; esse fenômeno ocorre porque o tratamento com o agente antimitótico age sobre as células dos explantes que estão em diferentes estágios do ciclo celular, resultando na desuniformidade do tecido. Essa variação no número cromossômico compromete a fertilidade e a estabilidade das plantas no campo, sendo indesejável sob o ponto de vista comercial ou de melhoramento genético (PEREIRA et al., 2012).

Portanto, a escolha de cultivares a serem utilizadas, variação da concentração, tempo de exposição e formas de aplicação desses antimitóticos tornam-se requisitos indispensáveis em qualquer programa de melhoramento genético visando à duplicação cromossômica (RODRIGUES et al., 2011).

Os coeficientes de variação (CV) encontrados para os picos variaram de 0,42 a 2,83 % para a primeira análise e 0,31 a 4,94% para a segunda, caracterizando um resultado satisfatório; como é possível observar pela espessura dos histogramas, que são relativamente finos. Em grande parte das amostras foram obtidos CV inferior ao encontrado em trabalhos com bananeira, como o de Dolezel, Dolezelova e Novák (1994), cujos coeficientes ficaram entre 2,5 % e 4,5%. Segundo Galbraith et al. (2002) coeficientes de variação de até 5% são aceitáveis e com confiabilidade dos dados.

A sobreposição das linhas da primeira e segunda leituras (Figuras 3, 4, 5 e 6) denotam estabilidade entre elas, ou seja, pouca mudança no conteúdo de DNA das amostras ao longo dos 30 dias de diferença.

De acordo com a figura 3, existe relativa estabilidade entre as análises para as diferentes concentrações, exceto para a concentração de 50 μM de APM, que obteve plantas com conteúdo de DNA maiores na primeira análise, mas com

queda de conteúdo de DNA ao longo do tempo. Isso significa que as células dessas amostras expostas durante 2 dias ao antimitótico tiveram uma tendência em retornar à condição diploide e se estabilizarem nessa condição.

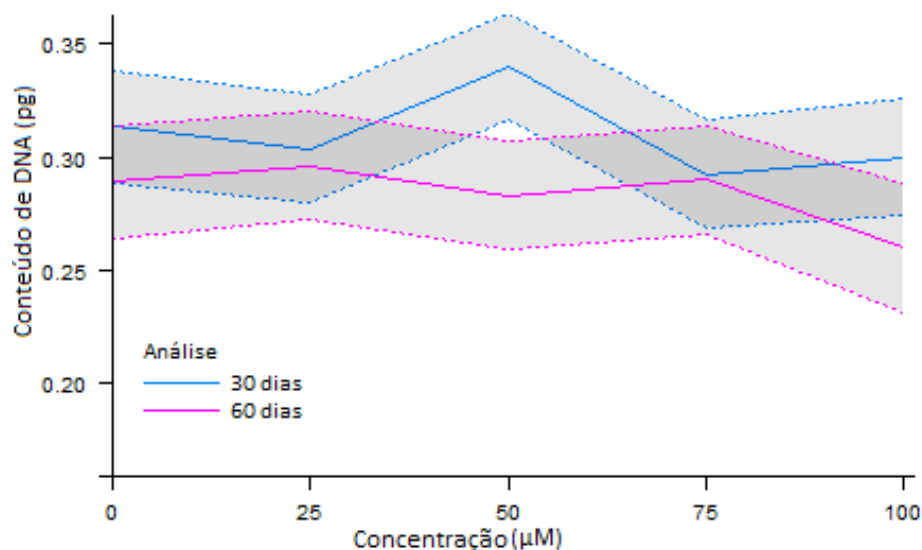


Figura 3 Conteúdo de DNA (pg) em função da concentração de APM (μM) dos explantes submetidos a 2 dias de exposição

De acordo com a figura 4, observam-se muitas diferenças entre as análises, exceto para a testemunha. Observa-se uma considerável queda no conteúdo de DNA da primeira para a segunda análise, porém ambas não atingiram a quantidade de DNA de tetraploide. Mas ainda assim os tratamentos a partir da concentração de $50 \mu\text{M}$ de APM na primeira análise apresentaram aumento no conteúdo de DNA e na segunda análise, as células ficaram com conteúdo de DNA abaixo do nível diploide (testemunha), evidenciando assim que essas plantas perderam DNA e estão apresentando características de aneuploides. Esses materiais não apresentam estabilidade genética, por isso, o

tempo de exposição de 4 dias se mostrou ineficiente na duplicação cromossômica para todas as concentrações estudadas.

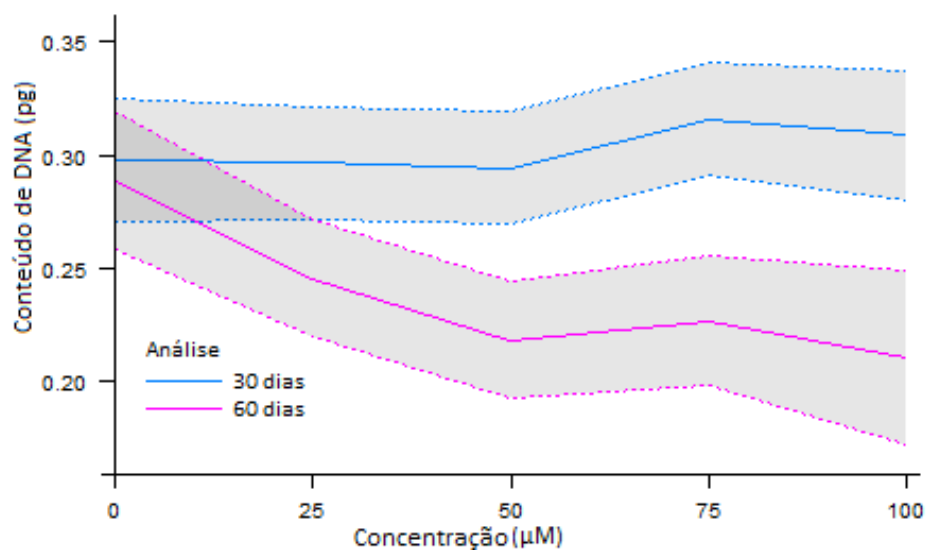


Figura 4 Conteúdo de DNA (pg) em função da concentração de APM (µM) dos explantes submetidos a 4 dias de exposição

Para o tempo de exposição de 6 dias (Figura 5), há uma tendência de estabilidade entre as análises, exceto para a testemunha e para a concentração de 25 µM de APM. No entanto, estes tratamentos estão no limiar da margem de erro, representado pelas linhas pontilhadas, ou seja, não estão tão distantes. Destaca-se a concentração de 75 µM que, além de estável, também proporcionou a maior quantidade de DNA dentre todos os tratamentos estudados, sendo então, o tratamento mais eficiente para duplicação cromossômica.

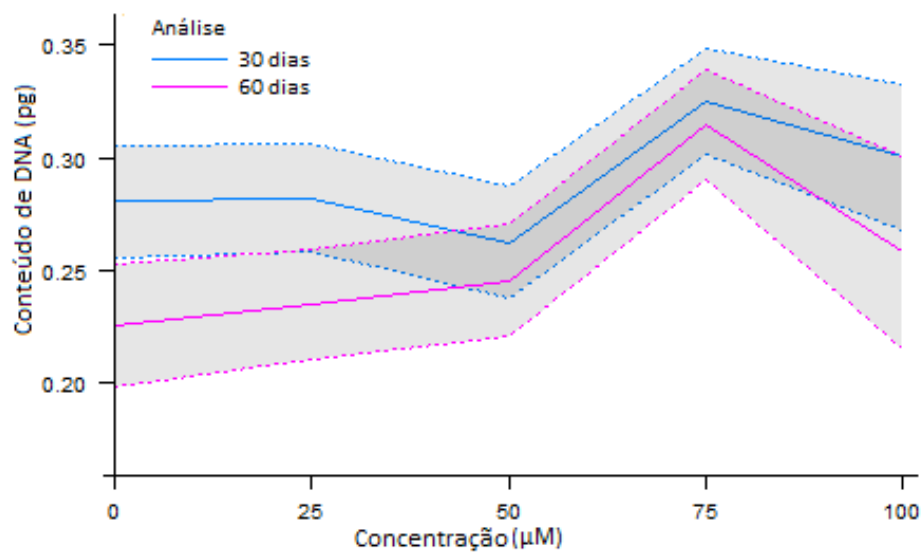


Figura 5 Conteúdo de DNA (pg) em função da concentração de APM (µM) dos explantes submetidos a 6 dias de exposição

Com 8 dias de exposição ao antimetabólico (Figura 6), há uma tendência geral de estabilidade entre as duas análises, porém elas são estáveis em nível diploide, o que torna a interação dos tratamentos ineficiente para duplicação cromossômica.

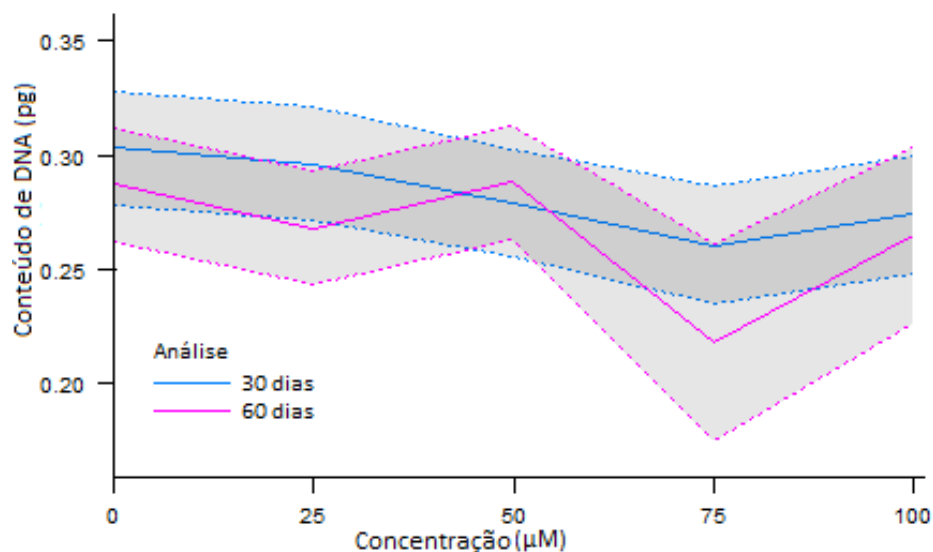


Figura 6 Conteúdo de DNA (pg) em função da concentração de APM (μM) dos explantes submetidos a 8 dias de exposição

Este experimento trouxe resultados bastante importantes, visto que a metodologia de duplicação de cromossomos, com aplicação do antimetabólito APM no meio de cultura foi bastante eficiente para diminuir a mortalidade de plantas. Houve a geração de 4 plantas tetraploides estáveis ao final do experimento e observou-se ainda que a maioria das plantas permaneceu estável geneticamente, no entanto algumas apresentaram uma tendência à volta da condição diploide.

5 CONCLUSÕES

Tratamento com aplicação Amiprofós-metil diretamente em meio de cultura é uma metodologia promissora para a duplicação de cromossomos de bananeira “Ouro”, principalmente em relação à mortalidade, sendo necessários novos experimentos com concentrações e tempos de exposição próximos ao T14 (75 μ M de APM em 6 dias de exposição), tratamento mais eficiente na indução de tetraploides. A maior parte das plantas tratadas com APM tem conteúdo de DNA estável.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2014.

ALLUM, J. F.; BRINGLOE, D. H.; ROBERTS, A. V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. **Plant Cell**, Berlin, v. 26, n. 11, p. 1977-1984, Nov. 2007.

AMARAL, C. M. et al. Agronomic characterization of autotetraploid banana plants derived from 'Pisang Lilin' (AA) obtained through chromosome doubling. **Euphytica**, Wageningen, v. 202, n. 3, p.435-443, Apr. 2015.

AMORIM, E. P. et al. Quality improvement of cultivated Musa. In: PILLAY, M.; TENKOUANO, A. (Org.). **Banana breeding: progress and challenges**. New York: CRC, 2011. p. 252-280.

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

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

BORGES, A. N. et al. **Sistema de produção de bananeira irrigada**. Petrolina: EMBRAPA Semiárido, 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/index.htm>>. Acesso em: 24 jun, 2015.

BRAHMA, B. P.; UMESH, K. S. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide Fensulfothion. **Cytobios**, Cambridge, v. 42, n. 167/168, p. 147-155, Jan. 1985.

CHAMPION, J. **Les bananiers et leur culture: botanique et genetique**. Paris: IFAC, 1967. v. 1.

COSTA, F. H. S. et al. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 805-813, ago. 2011.

COSTICH, D. E. et al. Genome-size variation in switchgrass (*Panicum virgatum*): flow cytometry and cytology reveal rampant aneuploidy. **The Plant Genome**, Madison, v. 3, n. 3, p. 130-141, Nov. 2010.

DEWITTE, W; MURRAY, J. A. H. The plant cell cycle. **Annual Review Of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 235-264, June 2003.

DHOOGHE, E. et al. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 3, p. 359-373, Mar. 2011.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 3, p. 99-110, Feb. 2005.

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

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: DOLEZEL J., GREILHUBER J., SUDA J. (Ed.) **Flow cytometry with plant cells**. Weinheim: Wiley, 2007. p. 41-65.

DOLEZEL, J. et al. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 17-26, July 1998.

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

ELMAGHRABI, A.; OCHATT, S. Isoenzymes and flow cytometry for the assessment of true-to-typeness of calluses and cell suspensions of barrel medic prior to regeneration. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n. 1, p. 31-43, Apr. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**: Food and Agriculture Organization Corporate

Statistical Database. 2014. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>.

Acesso em: 7 jan. 2015.

FALCONER, M. M.; SEAGULL, R. W. Amiprophos-methyl (APM): a rapid reversible, anti-microtubule agent for plant cell cultures. **Protoplasma**, New York, v. 136, n. 2/3, p. 124-145, June 1987.

FAYOS, O. et al. Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 6, p. 384, May 2015.

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. 1-22.

GHIMIRE, B. K.; YU, C. Y.; CHUNG, I. M. Direct shoot organogenesis and assessment of genetic stability in regenerants of *Solanum aculeatissimum* Jacq. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 108, n. 3, p. 455-464, Mar. 2012.

GONÇALVES, V. D. et al. Avaliação das cultivares de bananeira Prata-Anã, Thap Maeo e Caipira em diferentes sistemas de plantio no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 371-376, jun. 2008.

GRZEBELUS, E.; ADAMUS, A. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 3, p. 569-574, Sept. 2004.

HANTZSCHEL, K. R.; WEBER, G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. **Protoplasma**, [S. l.], v. 241, n. 1, p. 99-104, May 2010.

HANSEN, A. L. et al. Chromosome doubling in vitro with amiprophos-methyl in *Beta vulgaris* ovule culture. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B – Soil & Plant Science**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 89-95, June 2000.

HOFER, M.; MEISTER, A. Genome size variation in *Malus* species. **Journal of Botany**, [S. l.], v. 2010, n.1, p. 1-8, Jan. 2010.

IANTCHEVA, A. et al. Assessment of polysomaty, embryo formation and regeneration in liquid media for various species of diploid *Medicago*. **Plant Science**, Shannon, v. 160, n. 4, p. 621-627, Apr. 2001.

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

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

LEMA-RUMINSKA, J. Flow cytometric analysis of somatic embryos, shoots, and calli of the cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. *forma monstruosa*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n. 3, p. 531-535, Sep. 2011.

LOUREIRO, J. C. **Aplicação de citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal**. 2007. 268 p. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

LOUREIRO, J. et al. Assesment of ploidy stability in the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. **Planta**, Berlin, v. 221, n.6, p. 815-822, Apr. 2005.

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

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

MOREJOHN, L. C. et al. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. **Planta**, Berlin, v. 172, n. 2, p. 242-264, Oct. 1987.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEMORIN, A. J. et al. Microsatellite and flow cytometry analysis to help understand the origin of *Dioscorea alata* polyploids. **Annals of Botany**, London, v. 112, n. 5, p. 811-819, Nov. 2013.

OSELEBE, H. O.; TENKOUANO, A. Ploidy versus gender effects on inheritance of quantitative traits in *Musa* species. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 3, n. 6, p. 367-373, Dec. 2009.

PAULA Y. C. M. **Duplicação cromossômica e conservação de cultivares de bananeira in vitro**. 2014. 120 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PEREIRA, R. C. et al. O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1278-1285, jul. 2012.

PINTO, G. et al. Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 3, p. 580-587, Aug. 2004.

PIO, L. A. S. **Indução e identificação de poliploidia em bananeira (*Musa acuminata*, Colla)**. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PIO, L. A. S. et al. Inducing and identifying artificially-induced polyploidy in bananas. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v. 13, n. 37, p. 3748-3758, Sep. 2014.

QUESENBERRY, K. H. et al. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 17, n. 1, p. 43-50, Sep. 2010.

RESENDE, M. D. V. de. **SELEGEN-REML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

RODRIGUES, F. A. **Antimitóticos na indução de tetraploides em bananeira**. 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RODRIGUES, F. A. et al. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v. 10, n. 62, p. 13476-13481, Oct. 2011.

RODRIGUES, F. A. et al. The effects of colchicine on banana stem apex. **Revista de Ciência Agrária - Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Belém, v. 56, n. 2, p. 129-133, 2013.

ROQUE, R. L. et al. Desempenho agrônômico de genótipos de bananeira no Recôncavo da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 598-609, Sep. 2014.

SANTOS-SEREJO, J. A. et al. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. p. 10-23, v. 1.

SCAGLIUS, S. M. et al. **Estudos preliminares sobre o efeito da cafeína na duplicação cromossômica em plantas haplóides de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do109.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2015.

SHEPHERD, K.; ALVES, E. J.; FERREIRA, R. Classificação dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Banana (BAG) do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1984, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBF/EMPASC, 1984, p. 213-219.

SILVA, M. R. **Caracterização física e anatômica de folhas de acessos de bananeira com diferentes ploidias**. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.

SILVA, S. O.; BOLIANI, A. C.; CORRÊA, L. S. Avaliação de cultivares de bananeira (*Musa* spp.) na Região de Selvíria-MS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 101-103, abr. 2006.

SILVA, S. O. et al. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do mal-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 137-143, mar. 2011.

SILVA S. O. et al. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 3, p. 919-931, set. 2013.

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

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P. Pré-melhoramento da banana. In: LOPES, M. A. et al. (Org.). **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 317-350.

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

SKLAR, L. The future of flow cytometry in biotechnology: the response to diversity and complexity. In: SKLAR, L. (Ed.) **Flow cytometry for biotechnology**. New York: Oxford University, 2005. p. 3-11.

TANG, Z. Q. et al. In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 213-220, Aug. 2010.

VUJOVIC, T. I.; CEROVIC, R.; RUZIC, D. Ploidy level stability of adventitious shoots of sour cherry 'Cacanski Rubin' and Gisela 5 cherry rootstock. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, n. 3, p. 323-333, Dec. 2012.

WANG, K. et al. Induction of tetraploidy with antimicrotubule agents in oriental melon (*Cucumis melo* var. *Makuwa*). **Israel Journal of Plant Sciences**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 198, Aug. 2015.

XING, S. H. et al. Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1-10, May 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A Análise de deviance (Anadev) a partir do programa R

FV	GL	χ^2	Valor P
Dose	4	5.7639	0.2174838
Tempo de exposição	3	26.8904	6.207e-06 ***
Leitura	1	62.2307	3.055e-15 ***
D:T	12	58.2976	4.604e-08 ***
D:L	4	1.8905	0.7558880
T:L	3	17.0196	0.0007002 ***
D:T:L	12	24.7028	0.0162960 *