

Pré-seleção de poliploides por métodos foliares em acessos de bananeira

Manuela Ramos da Silva de Jesus⁽¹⁾, Sebastião de Oliveira e Silva⁽²⁾, Daniela Garcia Silveira⁽³⁾, Janay Almeida dos Santos-Serejo⁽²⁾, Antonio Hélder Rodrigues Sampaio⁽⁴⁾ e Adonai Calbo Gimenez⁽⁵⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: manuelaagronomia@yahoo.com.br ⁽²⁾Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/nº, Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: ssilva3000@gmail.com, janay.serejo@embrapa.br ⁽³⁾Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Campus Guanambi, Zona Rural, Distrito de Ceraíma, CEP 46430-000 Guanambi, BA, Brasil. E-mail: danielags@ig.com.br ⁽⁴⁾Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Rodovia PI 247, Km 07, Portal dos Cerrados, CEP 64860-000 Uruçuí, PI, Brasil. E-mail: helderagronomo@hotmail.com ⁽⁵⁾Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de Novembro, nº 1.452, Centro, Caixa Postal 741, CEP 13560-970 São Carlos, SP, Brasil. E-mail: adonai.calbo@embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar métodos foliares para pré-selecionar poliploides putativos de bananeira em trabalhos com poliploidização *in vitro*. A espessura foliar, estimada a partir da massa específica das matérias fresca e seca de discos foliares, e a turgescência foliar das plantas, medida diretamente nas plantas às 6h30 da manhã com o aparelho Wiltmeter, foram determinadas em mudas de bananeira diploides (Calcutta e Lidi), triploides (Grande Naine e Williams) e tetraploides (Bucanero e Calypso). A avaliação do conteúdo de DNA foi realizada por citometria de fluxo, tendo-se substituído o diploide Lidi pelo NBA, e o triploide Williams pelo Caipira. Os genótipos com maior ploidia apresentaram maior massa de matéria fresca do disco foliar. O potencial de turgescência foliar também se relacionou significativamente com a ploidia. Os genomas diploides apresentaram os menores conteúdos de DNA (0,96 pg); os triploides Grande Naine (1,48 pg) e Caipira (1,63 pg), conteúdos intermediários; e os tetraploides Calypso (1,90 pg) e Bucanero (2,26 pg), os maiores conteúdos. A massa de matéria fresca de discos foliares e a turgescência foliar das plantas, sob adequado manejo de irrigação, podem ser utilizadas para pré-selecionar tetraploides de bananeira em trabalhos de poliploidização *in vitro*.

Termos para indexação: *Musa*, citometria de fluxo, conteúdo de DNA, turgescência foliar, Wiltmeter.

Preselection of polyploids using leaf methods in banana accessions

Abstract – The objective of this work was to evaluate leaf methods to preselect banana putative polyploids in *in vitro* works with polyploidization. Leaf thickness, estimated from the specific masses of the fresh and dry matters of leaf disks, and leaf turgor, measured directly on the plants at 6:30 a.m. using the Wiltmeter equipment, were determined in diploid (Calcutta and Lidi), triploid (Grande Naine and Williams), and tetraploid (Bucanero and Calypso) banana. The evaluation of the DNA content was performed by flow cytometry, replacing the diploid Lidi by NBA, and the triploid Williams by Caipira. Genotypes with higher ploidy showed the highest fresh matter mass of the leaf disk. Leaf turgor potential was also significantly related to ploidy. Diploid genomes showed the lowest DNA contents (0.96 pg); the triploids Grande Naine (1.48 pg) and Caipira (1.63 pg), intermediate contents; and the tetraploids Calypso (1.90 pg) and Bucanero (2.26 pg), the highest contents. Fresh matter mass of leaf disks and leaf turgor, under proper irrigation management, can be used to preselect banana tetraploids in *in vitro* polyploidization studies.

Index terms: *Musa*, flow cytometry, DNA content, leaf turgor, Wiltmeter.

Introdução

A maioria dos genótipos de bananeira atualmente em uso pela agricultura foi obtida de cruzamentos interespecíficos entre *Musa acuminata* Colla (genoma A, $2n=2x=22$) e *M. balbisiana* Colla (genoma B, $2n=2x=22$). Essas bananeiras são partenocárpicas e

estéreis, características que dificultam o melhoramento genético convencional e que, portanto, têm estimulado o desenvolvimento e o emprego de novas técnicas, tais como: indução de mutação, duplicação de cromossomos (poliploidização) e transformação genética (Silva et al., 2011a, 2013).

A poliploidização *in vitro* baseia-se na aplicação de substâncias antimitóticas (colchicina e orizalina) em explantes, como ápices caulinares e suspensões de células embriogênicas, sob condições assépticas (Bakry et al., 2007; Costa et al., 2011; Rodrigues et al., 2011; Pio et al., 2014), e na posterior identificação e seleção dos autotetraploides estáveis.

No passado, a determinação do nível de ploidia das plantas era realizada exclusivamente por meio de avaliações cariotípicas, com a contagem do número de cromossomos metafásicos. Contudo, esta técnica é morosa e demanda operadores qualificados, além de reduzir o número de amostras e não fornecer imagens representativas de uma população heterogênea de células (Dolezel et al., 2007; Ochatt et al., 2011). Neste contexto, o desenvolvimento da citometria de fluxo fez com que o teste de ploidia pudesse ser realizado de forma muito mais rápida, o que permitiu a realização de estudos com análise de grande número de plantas, com diferentes tipos de camadas de tecido e de células analisados (Leus et al., 2009).

Na poliploidização *in vitro* da bananeira, um grande número de plantas com diferentes ploidias é gerado, a partir do qual devem ser identificadas as plantas tetraploides. Para otimizar o uso de tempo e recursos, a quantidade de plantas a ser avaliada, para confirmação da ploidia, deve ser diminuída pelo desenvolvimento de técnicas práticas e seguras para pré-seleção e identificação dos poliploides putativos (Silva et al., 2011b). Essas técnicas normalmente baseiam-se em características morfológicas e/ou estruturais das plantas. Métodos que se baseiam na morfologia das plantas são considerados mais simples para identificar poliploides putativos, uma vez que esses materiais apresentam células e órgãos maiores (Schifino-Wittmann, 2004). Entretanto, nem sempre é possível distinguir os diferentes níveis de ploidia somente a partir de características morfológicas, principalmente em razão da expressão de fatores ambientais no fenótipo. Desse modo, a confirmação da ploidia, mediante citometria de fluxo ou contagem de cromossomos, é necessária.

Souza & Queiróz (2004) enfatizam a influência dos fatores ambientais sobre os métodos indiretos e que a análise individual de algumas variáveis pode levar a erros na classificação da ploidia dos indivíduos. Mesmo assim, a aplicação desses métodos ainda é importante no melhoramento da bananeira, já que,

segundo Souza & Queiróz (2004), eles possibilitam um considerável descarte de plantas diploides e reduzem, conseqüentemente, o número de indivíduos a serem submetidos à análise citogenética e à citometria de fluxo.

Uma estratégia promissora na identificação rápida dos poliploides putativos consiste na estimação da espessura das folhas a partir de sua massa específica. Os resultados obtidos por Costa et al. (2011), com ápices caulinares de bananeira, sugerem que os poliploides estejam entre os indivíduos com folhas mais espessas. No entanto, a técnica ainda precisa ser adequada para ser empregada com êxito na pré-seleção de plantas duplicadas com antimitóticos.

Além desse método indireto, a diferenciação de diploides de poliploides também poderia ser obtida a partir da determinação da turgescência das células foliares, uma vez que os indivíduos com maior ploidia normalmente apresentam células mais túrgidas (Bakry et al., 2009). A turgescência celular de folhas pode ser facilmente obtida com um aparelho denominado Wiltmeter (Calbo et al., 2010). Este aparelho é um equipamento simples, portátil e de fácil manuseio, que executa medidas objetivas de turgescência, de forma não destrutiva, durante o desenvolvimento das plantas (Calbo et al., 2008). Ele já foi utilizado para determinação da turgescência em folhas de couve, alface, chicória e crisântemos (Calbo et al., 2008, 2010; Spricigo et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar métodos foliares para pré-selecionar poliploides putativos de bananeira em trabalhos com poliploidização *in vitro*.

Material e Métodos

Para verificar a ploidia de genótipos de bananeira (*M. acuminata*), foram instalados três experimentos: dois, por meio de métodos foliares indiretos, pela determinação da espessura foliar de discos foliares e da turgescência foliar de acordo com leitura no aparelho Wiltmeter; e um, por meio de método direto, com uso da citometria de fluxo. Os genótipos avaliados nos dois primeiros experimentos foram os diploides AA (Lidi e Calcutta), os triploides AAA (Williams e Grande Naine) e os tetraploides AAAA (Bucanero e Calypso). Já a estimativa do conteúdo de DNA por citometria de fluxo foi realizada em plantas dos genótipos NBA e Calcutta (AA), nos triploides Caipira

e Grande Naine (AAA) e nos tetraploides Bucanero e Calypso (AAAA).

No experimento para determinação da espessura foliar, quatro mudas do tipo chifrinho, de cada material, foram plantadas em vasos de plástico com 5 L de substrato vegetal e esterco de gado, em telado. A irrigação foi realizada manualmente, uma vez por dia. Após cinco meses, três discos foram retirados em cada lado do limbo foliar, nas posições apical, mediana e basal da primeira, da segunda e da terceira folha expandida das mudas. Para tanto, utilizou-se um vazador de 3,5 cm de diâmetro. A coleta dos discos foi realizada no intervalo entre de 7:00 e 8:00 horas da manhã. Imediatamente após a excisão, as amostras foram inseridas em sacos de plástico, os quais foram fechados e colocados em caixa de isopor para evitar perda excessiva de água por transpiração.

A avaliação das massas de matéria fresca e seca de cada disco foi feita em balança de precisão, tendo-se obtido a matéria seca após secagem em estufa, a 60°C, por 48 horas. A massa específica de cada disco, em mg cm⁻², foi determinada pela divisão de sua massa pela área do vazador (9,616 cm²).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 6x3x3 (genótipos x número de folhas x posição do furo na folha), com quatro repetições por tratamento.

No experimento para determinação da turgescência foliar, a pressão de turgescência foi obtida por leitura direta nas plantas, em casa de vegetação, com uso do aparelho Wiltmeter, de acordo com a metodologia de Calbo et al. (2010). As medições foram realizadas na segunda folha, em quatro plantas de cada genótipo, e as análises foram realizadas em três horários: 6:30, 12:00 e 16:30 horas, por cinco dias consecutivos.

Para evitar variação nas análises da turgescência, em decorrência de irrigação irregular, a determinação da capacidade de campo dos substratos foi realizada em experimento prévio, no qual foi constatado que a irrigação diária com 200 mL de água por vaso foi suficiente para manter as plantas nessa condição. Assim, dez dias antes das avaliações, iniciou-se a irrigação sempre às 17h00; este procedimento continuou a ser realizado durante todo o período do estudo.

A calibração do aparelho Wiltmeter foi feita de acordo com Calbo et al. (2010), antes e durante os

dias de leitura, nos três horários, com a finalidade de corrigir possíveis desvios do fator Wiltmeter (w).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 6x3 (genótipos x horários), com cinco repetições e quatro plantas por unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias dos genótipos e dos horários foram comparadas pelos testes de Scott-Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Para a determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo, o material vegetal foi triturado em placas de Petri, juntamente com o padrão de referência – ervilha (*Pisum sativum* L.), 9,09 pg de DNA – e 1 mL de tampão de extração de núcleos LB01. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e tela de 50 µm, e, posteriormente, corada com 25 µL de iodeto de propídeo. Todo esse processo foi realizado sobre recipiente com gelo triturado. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur 4 cores (Becton, Dickinson, and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA). Os valores de conteúdo de DNA e os coeficientes de variação dos tratamentos (seis genótipos com quatro repetições) foram submetidos à análise de variância, tendo-se comparado os coeficientes de variação e os índices de DNA ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os dados dos três experimentos foram submetidos à análise de variância, com uso do programa Sisvar (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG).

Resultados e Discussão

As massas específicas (ME) estiveram sujeitas às interações entre genótipos e posição de retirada dos discos, para matéria fresca (MEMF), e entre genótipos e número da folha, para matéria seca (MEMS).

Para MEMF, em discos retirados da posição apical da folha, os tetraploides Calypso e Bucanero e o triploide Grande Naine apresentaram as maiores médias, e não diferiram significativamente entre si (Tabela 1). A massa específica da cultivar Grande Naine também não diferiu significativamente da observada para a Williams. Os diploides Lidi e Calcutta apresentaram as menores médias. Nas posições mediana e basal, os resultados seguiram o mesmo comportamento, com a exceção de que a cultivar Grande Naine diferiu estatisticamente da Williams.

As maiores médias da MEMS, na folha 1, foram observadas no triploide Grande Naine, mas sem diferenças significativas em relação às observadas nos tetraploides e na cultivar Williams (Tabela 2). Na folha 2, entretanto, a MEMS da cultivar Grande Naine foi significativamente maior do que nos demais acessos, com exceção do diploide Lidi. Na folha 3, o diploide Calcutta foi o único que diferiu significativamente dos demais, com as menores médias. As médias de MEMS não diferiram entre as folhas avaliadas, no diploide Calcutta, no triploide Williams e nos tetraploides Bucanero e Calypso. No diploide Lidi e no triploide Grande Naine, as maiores médias foram observadas nas folhas 2 e 3.

Esses resultados são indicativos de que, para a pré-seleção da ploidia dos genótipos estudados, devem-se utilizar somente os resultados de ME obtidos da matéria fresca, uma vez que, para MEMS, os

genótipos poliploides não diferiram estatisticamente dos diploides. Já os resultados de MEMF foram eficazes em distinguir os triploides e os tetraploides dos diploides de bananeira, e os discos retirados da parte apical da folha apresentaram a melhor capacidade discriminatória. A resposta distinta entre os resultados de ME da matéria fresca e seca pode ser explicada pela maior turgidez observada nos acessos com maior ploidia (Bakry, 2009). Esse efeito, no entanto, é eliminado com o uso dos resultados da matéria seca. Além disso, vale destacar que, segundo o autor, a turgidez dos tetraploides é consistentemente maior do que a dos diploides, independentemente do ambiente avaliado.

Scalon et al. (2001) relataram que a relação entre massa e área foliar possibilita a identificação de indivíduos com maior espessura de folha. Costa et al. (2011), por sua vez, sugeriram que essa estimativa

Tabela 1. Massa de matéria fresca e massa específica estimada a partir da massa de matéria fresca (MEMF) dos discos foliares de bananeiras (*Musa acuminata*) com diferentes ploidias, retirados em três posições nas folhas⁽¹⁾.

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

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Massa de matéria seca e massa específica estimada a partir da massa de matéria seca (MEMS) dos discos foliares de bananeiras (*Musa acuminata*) com diferentes ploidias, retirados de diferentes folhas⁽¹⁾.

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

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

indireta da espessura da folha podia ser usada como método rápido de determinação da ploidia em bananeiras.

Na avaliação dos genótipos em três horários, a interação entre genótipos e horário de medição do potencial de turgescência das folhas não foi significativa. Contudo, houve significância na avaliação dos fatores isolados (Figura 1).

Entre os genótipos, as maiores médias da pressão de turgescência (Figura 1) foram obtidas no triploide Williams (153,06 kPa), que foi alocado no mesmo agrupamento que o do tetraploide Bucanero (137,91 kPa). Os acessos Grande Naine e Calypso, no segundo agrupamento, apresentaram valores intermediários, de 118,97 e 109,54 kPa, respectivamente. No último agrupamento, foram alocados os diploides Lidi (75,87 kPa) e Calcutta (83,99 kPa). O método, portanto, não diferenciou triploides de tetraploides, mas permitiu diferenciar os diploides dos poliploides, o que viabiliza a pré-seleção destes.

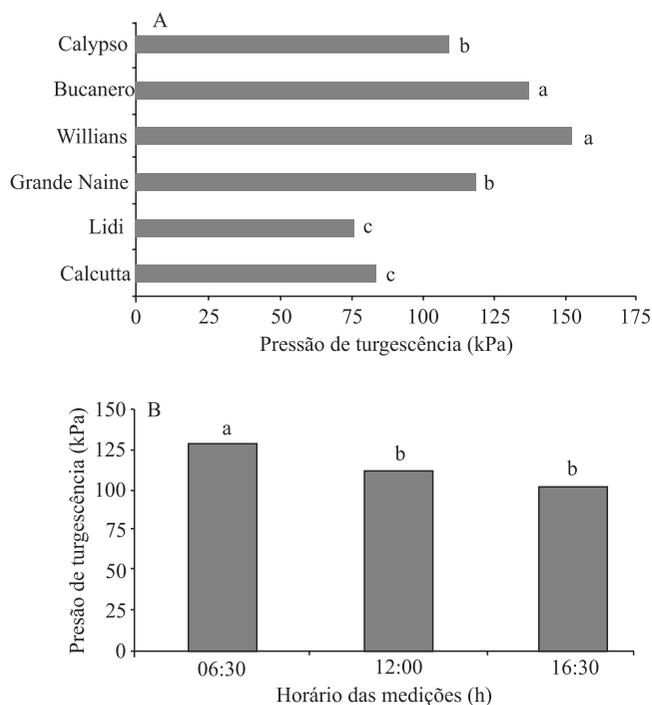


Figura 1. Média do potencial de turgor (kPa) obtido diretamente em plantas de bananeira (*Musa acuminata*), com uso do aparelho Wiltmeter, em diferentes genótipos (A) e horários (B). Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott, em A, e, pelo teste de Tukey, em B, a 5% de probabilidade.

As leituras de turgescência foliar foram realizadas nos seguintes horários: 6h30, 12h00 e 16h30, escolhidos com base nos fatores fisiológicos (temperatura, luminosidade e irradiância solar) que afetam a abertura e o fechamento estomático. A média da pressão de turgescência nas folhas obtida às 6h30 da manhã (127,38 kPa) foi estatisticamente superior às registradas nos demais horários (Figura 1). Isso porque, pela manhã, os tecidos estão mais túrgidos, particularmente no parênquima clorofiliano, no clorênquima e nas células epidérmicas que são mensuradas com o Wiltmeter (Calbo et al., 2010).

Sob a luz do sol, as células-guarda de folhas túrgidas abrem-se e facilitam a transpiração. Ao longo do dia, com os estômatos abertos, ocorre a transpiração e o potencial ou a pressão de turgescência das folhas diminui (Pimenta, 2004). Assim, o Wiltmeter é um aparelho interessante para acompanhamento da variação da pressão de turgescência das folhas e é particularmente útil para as avaliações em bananeiras, uma vez que a pressão de turgescência no início da manhã foi significativamente menor nos genótipos diploides do que nos poliploides.

Cabe destacar que o Wiltmeter ainda não havia sido usado com intuito de pré-selecionar poliploides em culturas. Na literatura, o aparelho foi utilizado com êxito na determinação de potencial de turgescência em folhas de alface e de flores (Calbo et al., 2008, 2010; Spricigo et al., 2012). No trabalho de Dutra et al. (2011), com a variedade de mamoeiro Sunrise, o Wiltmeter foi usado para estimar o conteúdo relativo de água a partir de medições de potencial de turgor. Os autores verificaram valores de turgescência entre 80 e 160 kPa, semelhantes aos observados no presente estudo.

Esses resultados são indicativos de que o Wiltmeter pode ser utilizado em futuros trabalhos de poliploidização *in vitro*, na pré-seleção de poliploides putativos, em que haja a necessidade de avaliar rapidamente a ploidia de um grande número de indivíduos.

Na estimativa do conteúdo de DNA por citometria de fluxo, o presente trabalho, a exemplo de Madail et al. (2015), utilizou como padrão interno o DNA da ervilha, que apresenta conteúdo 2C de 9,09 pg. Alguns autores consideram essa espécie uma excelente alternativa de padrão interno por apresentar um conteúdo de DNA que se situa, mais ou menos, no valor médio para a maioria dos conteúdos de DNA vegetal. Dessa forma,

ele pode ser utilizado para avaliar plantas tanto com pequeno genoma quanto com grande genoma (Dolezel & Bartos, 2005). Além disso, o genoma nuclear da ervilha é estável, e o preparo de suspensões de núcleos a partir de suas folhas não libera compostos que interferem na coloração pelo iodeto de propídeo.

Os acessos avaliados diferiram significativamente quanto aos conteúdos 2C de DNA nuclear, que foram de 0,96 pg, nos genótipos diploides; de 1,48 a 1,63 pg, nos triploides; e de 1,90 a 2,26 pg, nos tetraploides (Tabela 3). Os resultados para diploides foram inferiores aos obtidos por Madail et al., (2015), mas próximos aos para triploides e tetraploides. Contudo, os resultados foram inferiores aos relatados por Jesus et al. (2013), para todas as ploidias.

Os coeficientes de variação encontrados para conteúdo de DNA variaram de 0,61 a 1,15% (Tabela 3), o que caracteriza excelente precisão, com valores inferiores aos obtidos em trabalhos com bananeira bastante citados, como o de Dolezel et al. (1994), cujos coeficientes ficaram entre 2,5 e 4,5%. Conforme Galbraith et al. (1997), coeficientes de variação (CVs) de até 5% são aceitáveis. Houve diferença entre os CVs dos genótipos com diferentes ploidias; porém, todos foram inferiores ao máximo aceitável.

Como era esperado, os índices de DNA dos diploides foram os menores; os dos triploides, intermediários; e os dos tetraploides, os maiores. A diferença na quantidade de DNA observada entre indivíduos de mesma ploidia, como em Grande Naine e Caipira, pode ter sido decorrente da diferente origem dos acessos, como apontado por Dolezel et al. (1994).

Os resultados do presente trabalho revelam que tanto a MEMF, obtida de discos foliares da parte apical

Tabela 3. Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para acessos de bananeira (*Musa acuminata*) com diferentes níveis de ploidia⁽¹⁾.

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

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

da folha de bananeira, quanto a leitura da turgescência foliar com Wiltmeter, às 6h30 da manhã, podem servir para pré-seleção de triploides e tetraploides em estudos de ploidização em bananeira, uma vez que estão de acordo com os conteúdos de DNA obtidos com a citometria de fluxo. Entretanto, como Sari et al. (1999) e Souza & Queiróz (2004) afirmam, nem sempre é possível distinguir os diferentes níveis de ploidia com métodos indiretos; assim, dada a influência que o ambiente pode ter em seus resultados, a ploidia deve ser confirmada em etapas posteriores mediante citometria de fluxo ou contagem de cromossomos.

Conclusão

A espessura foliar, estimada a partir da massa específica foliar, e a turgescência foliar, medida com o aparelho Wiltmeter, são eficientes em pré-selecionar tetraploides putativos de bananeira (*Musa acuminata*) em trabalhos de poliploidização in vitro.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa.

Referências

- BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HORRY, J.-P. Genetic improvement of banana. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P.M. (Ed.). **Breeding plantation tree crops: tropical species**. New York: Springer, 2009. p.3-50. DOI: 10.1007/978-0-387-71201-7_1.
- BAKRY, F.; REBERDIERE, N.P. de la; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicine treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, v.62, p.3-12, 2007. DOI: 10.1051/fruits:2006043.
- CALBO, A.G.; FERREIRA, M.D.; PESSOA, J.D.C. A leaf lamina compression method for estimating turgor pressure. **HortScience**, v.45, p.418-423, 2010.
- CALBO, A.G.; FERREIRA, M.D.; PESSOA, J.D.C. Medida da firmeza de folhas com Wiltmeter®: fundamento e método. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.S4154-S4159. 2008.
- COSTA, F.H. da S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. e; SILVA NETO, H.P. da; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.805-813, 2011. DOI: 10.1590/S0100-204X2011000800004.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v.95, p.99-110, 2005. DOI: 10.1093/aob/mci005.

- DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVÁK, F.J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *Musa balbisiana*). **Biologia Plantarum**, v.36, p.351-357, 1994. DOI: 10.1007/BF02920930.
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v.2, p.2233-2244, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.310.
- DUTRA, A.D.; SAMPAIO, A.H.; GUIMARÃES, M.J.M.; SILVA, R.O.; CALBO, A.G.; COELHO FILHO, M.A. Relação entre conteúdo relativo de água e potencial de turgor obtido com Wiltmeter em folhas de mamoeiro. In: SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO, 5.; 2011, Porto Seguro. **Inovação e sustentabilidade: anais**. Porto Seguro: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 1 CD-ROM.
- GALBRAITH, D.W.; LAMBERT, G.M.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J.; DARZYNKIEWICZ, Z.; DEAN, P.; DRESSLER, L.; RABINOVITCH, P.; STEWART, C.; TANKE, H.; WHEELLESS, L. (Ed.). **Current protocols in cytometry**. New York: J. Wiley & Sons, 1997. p.1-22. DOI: 10.1002/0471142956.cy0706s02.
- JESUS, O.N. de; SILVA, S. de O. e; AMORIM, E.P.; FERREIRA, C.F.; CAMPOS, J.M.S. de; SILVA, G. de G.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in *ex situ* conservation. **BMC Plant Biology**, v.13, p.1-22, 2013. DOI: 10.1186/1471-2229-13-41.
- LEUS, L.; VAN LAERE, K.; DEWITTE, A.; VAN HUYLENBROECK, J. Flow cytometry for plant breeding. **Acta Horticulturae**, v.836, p.221-226, 2009. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.836.31.
- MADAIL, R.H.; PIO, L.A.S.; SILVA, S. de O. e; PASQUAL, M. Estimativa do conteúdo de DNA de diferentes acessos de bananeira: relações entre nível de ploidia e grupos genômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, p.977-983, 2015. DOI: 10.1590/0100-2945-195/14.
- OCHATT, S.J.; PATAT-OCHATT, E.M.; MOESSNER, A. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.329-341, 2011. DOI: 10.1007/s11240-011-9918-6.
- PIMENTA, J.A. Relações hídricas. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. p.1-39.
- PIO, L.A.S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. e; ROCHA, H.S.; MAGALHÃES, H.M.; SANTOS-SEREJO, J. de A. Inducing and identifying artificially-induced polyploidy in bananas. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p.3748-3758, 2014.
- RODRIGUES, F.A.; SOARES, J.D.R.; SANTOS, R.R. dos; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. e. Colchicine and amiprophos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.13476-13481, 2011.
- SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Scientia Horticulturae**, v.82, p.265-277, 1999.
- SCALON, S. de P.Q.; SCALON FILHO, H.; RIGONI, M.R.; VERALDO, F. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.652-655, 2001. DOI: 10.1590/S0100-29452001000300042.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, p.151-157, 2004.
- SILVA, S. de O. e; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos; FERREIRA, C.F.; DITA RODRIGUEZ, M.A. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.919-931, 2013. DOI: 10.1590/S0100-29452013000300032.
- SILVA, S. de O. e; MATOS, A.P. de; CORDEIRO, Z.J.M.; LIMA, M.J.C.; AMORIM, E.P. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do mal-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.137-143, 2011a. DOI: 10.1590/S0100-29452011005000029.
- 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. e. (Ed.). **Recomendações técnicas sobre a Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011b. p.61-70.
- SOUZA, F. de F.; QUEIRÓZ, M.A. de. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.516-520, 2004. DOI: 10.1590/S0102-05362004000300002.
- SPRICIGO, P.C.; FERREIRA, M.D.; CALBO, A.G. Turgescência de crisântemos após a colheita utilizando o equipamento Wiltmeter. **Ciência Rural**, v.42, p.255-260, 2012.

Recebido em 18 de junho de 2015 e aprovado em 5 de agosto de 2016