

TÉCNICA DE PRÉ-SELEÇÃO EM DIPLÓIDES DE BANANEIRA SUBMETIDAS A DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

Leila Aparecida Salles Pio¹, Lucymeire Souza Morais Lino², Ana Catarina Lima Oliveira³, Sebastião de Oliveira e Silva⁴, Moacir Pasqual⁵, Simone Abreu Asmar⁶

¹ Pós-doutoranda Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras – MG, CP-3037, email: leilapio.ufla@gmail.com; ² Pós-doutoranda Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas – BA, email: smorais@yahoo.com.br; ³ Mestranda em Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras – e-mail: kata_lima@yahoo.com.br; ⁴ Pesquisador, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical – Cruz das Almas – BA, e-mail: ssilva@cnpmf.embrapa.br. ⁵ Professor, Universidade Federal de Lavras, mpasqual@ufla.br. ⁶ Doutoranda em Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras, e-mail: siasmar@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A determinação do nível de ploidia em plantas pode ser realizada por vários métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos são: contagem do número cromossômico e determinação do conteúdo de DNA. Já os métodos indiretos englobam a avaliação de características citoanatômicas e morfológica. Todas as técnicas apresentam vantagens e limitações.

A observação de características da planta, como a espessura da folha para a determinação da ploidia também é pode ser utilizado. Apesar de ser um método simples pode ocasionar uma classificação equivocada de determinados genótipos, uma vez que essas características podem ser influenciadas pelo ambiente. Porém quando se trata de um número muito grande de plantas, poderá ser utilizado como uma pré-seleção de prováveis poliplóides (Sari et al., 1999; Souza e Queiroz, 2004).

A determinação do nível de ploidia por meio da técnica de citometria de fluxo é obtida pela comparação do conteúdo de DNA de uma planta padrão com nível de ploidia conhecido com o conteúdo de DNA de uma planta que se deseja conhecer o nível de ploidia. Essa técnica mostra-se promissora, pois permite a análise de um grande número de indivíduos de modo rápido e prático (Pio, 2008).

O objetivo deste trabalho foi fazer uma pré-seleção em plantas de bananeira bananeira Lidi, NBA, Malbut, Thong Dok Mak e Ouro, com base na espessura da folha e em seguida analisá-las por citometria de fluxo para a confirmação da ploidia.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado conduzido na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e as análises de citometria de fluxo foram realizadas no laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras.

Diplóides de bananeira Lidi, NBA, Malbut, Thong Dok Mak e Ouro foram submetidos a tratamentos com antimitóticos para a duplicação cromossômica, visando melhoramento genético. Milhares de plantas foram obtidas, por esse motivo foi necessário fazer uma pré-seleção com base na textura da folha (plantas com folhas mais grossas eram consideradas como possíveis poliplóides). Foram selecionadas 400 plantas dos genótipos citados para serem submetidas a análise de citometria de fluxo para a confirmação da ploidia.

Para a análise de citometria, aproximadamente 70 mg de tecido foliar de plantas de bananeira e de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) foram triturados juntos, em placa de Petri, contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação dos núcleos (Dolezel et al., 1998). A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 µm. Todo esse processo foi realizado sobre um recipiente contendo gelo triturado. Em seguida as amostras foram coradas com 25 µml de Iodeto de Propídeo e armazenadas no escuro, dentro de um recipiente com gelo triturado e em seguida analisadas. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela tabela 1 é possível observar que a maioria das plantas pré-selecionadas foram classificadas como mixoplóides (plantas com nível de ploidia variável) pela análise de citometria de fluxo. O diplóide Lidi, foi o que apresentou maior porcentagem de plantas tetraplóides (26%), porém para o Malbut, nenhuma planta foi considerada poliplóide.

Tabela 1. Porcentagem de plantas tetraplóides, mixoplóides e diplóides em genótipos de bananeira submetidos a duplicação cromossômica.

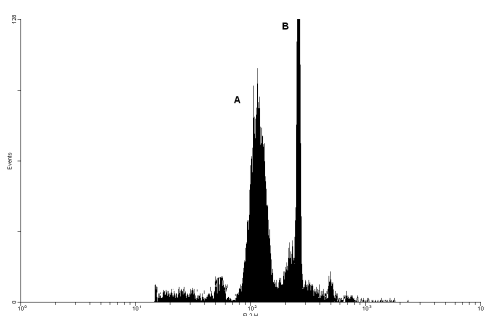
Genótipo	Análise de Citometria de Fluxo		
	%de plantas Tetraplóides	%de plantas Mixoplóides	%de plantas Diplóides
Lidi	26,2	55,7	18,18
NBA	7,61	70,01	22,33
Malbut	0	56,09	43,9
Thong Dok Mak	12,2	67,3	20,4
Ouro	8,3	50	41,7

As substâncias antimitóticas, usadas para a duplicação de cromossomos, agem de forma eficiente somente em células que estão em divisão, portanto a duplicação pode não

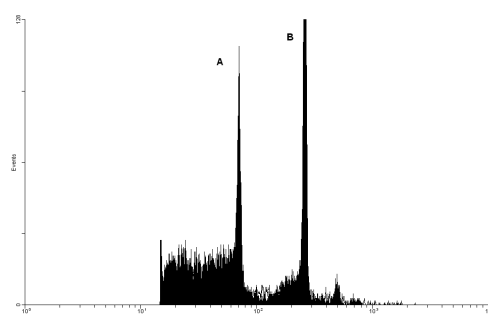
ocorrer em todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides (Carvalho et al., 2005; Pio, 2008).

Segundo Pio (2008), plantas mixoplóides e tetraplóides de bananeira possuem maior espessura do limbo foliar, maior área e comprimento de células do parênquima paliçádico e lacunoso em relação às diplóides. Neste contexto foi possível fazer uma pré-seleção com base na espessura de folhas de plantas submetidas a duplicação de cromossomos de forma eficiente. Em média, a taxa de obtenção de poliplóides é 10% em trabalhos de duplicação cromossômica. Neste trabalho a porcentagem de mixoplóides e tetraplóides chegou a 80% para os genótipos Lidi, NBA e Thong Dok Mak e mais de 50% para Malbut e Ouro.

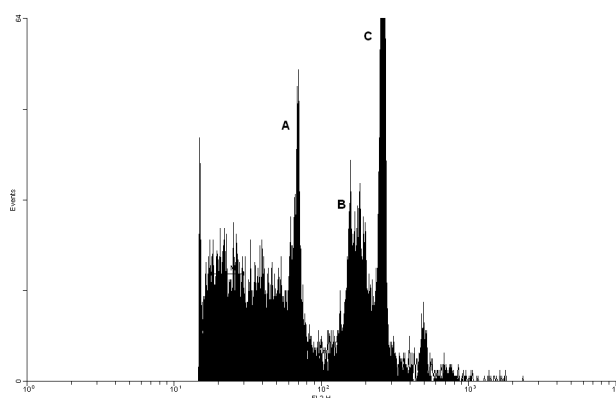
Pela Figura 1 é possível observar os histogramas obtidos nas análises de citometria de fluxo de plantas tetraplóide, diplóide e mixoplóides do genótipo Lidi.



Genótipo Lidi tetraplóide. Pico A – bananeira, Pico B – padrão de referência



Genótipo Lidi diplóide. Pico A – bananeira, Pico B – padrão de referência



Genótipo Lidi mixoploide. Pico A e B – bananeira, Pico C – padrão de referência

Figura 1. Histogramas de citometria de fluxo de plantas tetraplóide, mixoplóide e diplóide do genótipo Lidi submetido a duplicação cromossômica.

CONCLUSÕES

A pré-seleção com base na espessura foliar é eficiente para separar plantas diplóides de poliplóides.

AGRADECIMENTOS

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, a Universidade Federal de Lavras e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, J.F.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v80, n.1, p.69-75, 2005.

PIO, L.A.S. **Indução e identificação de poliploidia em bananeira (*Musa acuminata*, Colla)**. 2008. 72 tese(Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras – Lavras.

SARI, N; ABAK, K; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.82, n.3/4. p 265-277, 1999

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