

Efeito da Colchicina e da Escarificação de Sementes na Obtenção de Plantas Tetraploides de Melancia

Effect of the Colchicine and Seed Scarification on Obtaining of Tetraploid Watermelon Plants

Carla Maria de Jesus Silva¹; Nataniel Franklin de Melo²; Rita de Cássia Souza Dias³; Joice Simone dos Santos⁴; Flávio França de Souza⁵

Abstract

The effect of colchicine, under different dosages and seed scarification, was evaluated in the production of tetraploid plants in watermelon, cv. Crimson Sweet. Two methods of seed mechanical scarification (absence and presence), three colchicine concentrations (0.0, 0.1 and 0.2%) and two immersion times (24 h and 48 h) were evaluated. The seeds were submitted to different treatments and placed to germinate in plastic vase (0.5 L), filled with commercial substrate and kept in a greenhouse. After the emission of the cotyledons, the roots were collected, which were pre-treated with 8HQ, fixed and stored for later mitotic analysis. Higher frequency of tetraploid watermelon plants in seed immersion for obtained in 0.2% colchicine for 48 hours, without scarification. In spite of obtaining

¹Bióloga, doutoranda do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, bolsista Capes, Feira de Santana. BA.

²Biólogo, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁴Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitotecnia, bolsista DCR Facepe/CNPq, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁵Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE

tetraploid plants ($2n = 44$), other parameters need to be studied to verify if duplication occurred in part or in every plant.

Palavras-chave: duplicação cromossômica, colchicina, *Citrullus lanatus* var. *lanatus*, citogenética.

Keywords: chromosome duplication, colchicine, *Citrullus lanatus* var. *lanatus*, cytogenetic.

Introdução

O desenvolvimento de melancia triploide ($3x = 33$) envolve a obtenção de plantas tetraploides ($2n = 4x = 44$) e a hibridação destas com plantas diploides (SOUZA et al., 1999). Métodos de duplicação do número de cromossomos são utilizados para a obtenção de linhas tetraploides que precisam ser estabelecidas (BRASSET, 1986). Para isso, é utilizado a aplicação do antimitótico colchicina, que impede a formação das fibras do fuso acromático durante a divisão celular (mitose). Assim, os cromossomos, após duplicação, não se movimentam para os polos da célula e com a formação da membrana nuclear, a célula se constitui com o dobro do número cromossômico que possuía no início do ciclo (ALLARD, 1971).

A identificação do número cromossômico em plantas submetidas ao tratamento para a duplicação cromossômica, pode ser realizada por meio da citogenética (GUERRA; SOUZA, 2002), citometria de fluxo (JASKANI et al., 2005; NOH et al., 2012; SHEIKH et al., 2013), caracteres morfológicos das plantas como o tamanho do grão de pólen, número de cloroplastos por células-guarda, tamanho e densidade dos estômatos foliares (KIHARA, 1951; NOH et al., 2012; SOUZA; QUEIROZ, 2004).

O primeiro trabalho desenvolvido para a obtenção de melancia sem semente foi realizado no Japão, por Kihara (1951). No Brasil, Medina et al. (1958) e Souza et al. (1999) relataram programas que tinham como objetivo a obtenção de plantas tetraploides, utilizando a solução de colchicina a 0,1% (8-12 horas) e 0,2% (24 horas), respectivamente.

Em trabalhos mais recentes, a colchicina foi utilizada in vitro (RAZA et al., 2003), em meristemas de plântulas (JASKANI et al., 2005), direto na semente, hipocótilo invertido e no ápice (NOH et al., 2012; SHEIKH et al., 2013). Embora esses trabalhos já tenham

sido realizados, ainda é necessário obter genitores tetraploides adaptados às condições climáticas brasileiras, que tenham o número cromossômico efetivamente estabilizado, bem como identificar métodos que sejam mais eficientes na indução da tetraploidia.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de doses de colchicina e da escarificação de sementes na obtenção de plantas tetraploides de melancia.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e na Casa de Vegetação de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas da Embrapa Semiárido, em Petrolina, PE, de dezembro de 2016 a março de 2017. Utilizou-se a melancia diploide cv. Crimson Sweet.

Foram analisados por comparação: dois métodos de escarificação mecânica da semente (ausência e presença), três concentrações de colchicina (0,0%; 0,1% e 0,2%) e dois tempos de imersão (24 horas e 48 horas), totalizando 12 tratamentos e 16 repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma planta.

Para a escarificação das sementes, utilizou-se uma lixa de gramatura 150 para a abertura de um pequeno orifício na região superior do tegumento (local de emissão dos cotilédones). As sementes foram submetidas às diferentes concentrações de colchicina, por 24 horas e 48 horas, onde permaneceram no escuro, em temperatura ambiente. Posteriormente, as mesmas foram lavadas por três vezes consecutivas e colocadas para germinar em vasos plásticos (0,5 L) perfurados na base inferior, contendo substrato comercial para hortaliças. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o início da floração (35 dias).

Quando as plântulas apresentaram os cotilédones expandidos, coletou-se as extremidades das raízes principais e secundárias para a análise mitótica (contagem de cromossomos). Estas foram pré-tratadas com a solução de 8- hidroxiquinoleína (8-HQ) a 0,002 M durante 24 horas, a 8 °C. Em seguida, foram fixadas na solução de Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v) e mantidas à temperatura ambiente por 2-24 horas. Posteriormente, foram estocadas a -20 °C até a sua utilização.

O preparo das lâminas para a determinação do número cromossômico foi realizado segundo o protocolo de Guerra e Souza (2002). Realizou-se a identificação da ploidia em cinco células em metáfase, por planta, com o uso de microscópio óptico, obtendo-se as imagens por DinoCapture 2.0.

Os dados foram analisados por estatística descritiva, avaliando-se a frequência do número de plantas tetraploides que foram induzidas com os diferentes tratamentos.

Resultados e Discussão

Observou-se que houve variação no número cromossômico no conjunto de plantas que foram tratadas com a solução de colchicina a 0,1% e 0,2%, nos dois tempos de imersão, bem como, para os tratamentos em que as sementes foram escarificadas e não submetidas à escarificação (Tabela 1).

A determinação do número cromossômico foi realizada em, aproximadamente, 94% das plantas em função da nitidez e condensação dos cromossomos nas lâminas. Verificou-se que todas as plantas dos tratamentos controle (0% -24 horas e 0% - 48 horas) foram diploides, enquanto aquelas tratadas com substância antimitótica apresentaram células diploide, tetraploide e mixoploides.

Constatou-se que, a maior frequência de tetraploides (29,4%) foi observada em plantas provenientes de sementes tratadas com 0,2% de colchicina por 48 horas e sem escarificação (Tabela 1). No tratamento por 24 horas nesta mesma dose de colchicina, independentemente da presença ou ausência da escarificação, observou-se a formação de tetraploides variando de 5,9% (com escarificação) a 6,6% (sem escarificação). Dados aproximados de plantas de melancia tetraploides (2,7%), foram observados por Souza et al. (2001), quando analisaram um conjunto de dados morfológicos de plantas, cujas as sementes foram submetidas à colchicina a 0,2% por 24 horas.

Tabela 1. Frequência (%) das diferentes ploidias obtidas em plantas de melancia cv. Crimson Sweet provenientes de sementes com e sem escarificação mecânica, e submetidas à imersão em água ou doses de colchicina (0; 0,1% ou 0,2%), em dois períodos de exposição (24 horas ou 48 horas).

Nº de cromossomos	Tratamentos e frequência do número de cromossomos (%)											
	Colchicina 24 horas						Colchicina 48 horas					
	0,0		0,1%		0,2%		0,0		0,1%		0,2%	
	*CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE
22	100	100	87,5	80,0	35,3	46,7	100	100	86,7	84,6	23,0	17,7
44	0,0	0,0	0,0	0,0	5,9	6,6	0,0	0,0	0,0	15,4	7,7	29,4
Mixoploide (22 e 44)	0,0	0,0	12,5	20,0	58,8	46,7	0,0	0,0	13,3	0,0	69,3	52,9

* CE= com escarificação, SE = sem escarificação.

Observou-se também uma frequência elevada de plantas mixoploides em ambas as concentrações (0,1% e 0,2%) da solução de colchicina. O maior percentual (69,3%) destas, foi verificado no tratamento a 0,2% por 48 horas, submetido à escarificação. Provavelmente, a escarificação mecânica, aliada à maior dosagem e ao tempo de exposição, pode ter potencializado o efeito da colchicina e, assim, tenha induzido a uma maior formação de plantas mixoploides, que apresentam células diploides e tetraploides. Avaliando a indução de plantas tetraploides em melancia com a aplicação de 0,2%, 0,4% e 0,6% de solução de colchicina em plântulas, Jaskani et al. (2005), também obtiveram plantas mixoploides (34,0%), identificando-as pela análise de citometria de fluxo.

Vale ressaltar que, os resultados obtidos neste trabalho são referentes à identificação do número cromossômico (análise mitótica) e que Medina et al. (1958) relataram que a determinação de plantas tetraploides ($2n = 44$ cromossomos), nas raízes, nem sempre é uma indicação de que toda a planta foi "duplicada". Várias plantas podem ter apenas uma parte duplicada e, portanto, com o conjunto de dados relativos ao número cromossômico, tamanho de estômatos, de grãos de pólen, formato dos frutos, número e tamanho das sementes pode-se concluir, com maior segurança, sobre o efeito parcial ou total do tratamento.

Conclusão

Pode-se obter maior frequência de plantas tetraploides de melancia cv. Crimson Sweet a partir da imersão de sementes sem escarificação em solução de colchicina a 0,2% por 48 horas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Semiárido pela disponibilização da infraestrutura para a realização dos experimentos; ao programa de Pós-graduação da Universidade Estadual de Feira de Santana, à Capes e à Facepe/CNPq, pela concessão das bolsas.

Referências

- ALLARD, R. W. Poliploidia induzida no melhoramento de plantas. In: ALLARD, R. W. (Ed.). **Princípios do melhoramento de plantas**. New York: J. Wiley, 1971. p. 302-340.
- BRASSET, M. J. (Ed.). **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi, 1986. 584 p. il.
- GUERRA, M., SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.
- JASKANI, M. J.; KWON, S. W.; KIN, D. H. Flow cytometry of DNA content of colchicine treated with watermelon as a ploidy screening method at M1 stage. **Pakistan Journal Botany**, Karachi, v. 37, p. 685-696, 2005.
- KIHARA, H. Triploid watermelon, **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v. 58, p. 217-230, 1951.
- MEDINA, D. M.; PRADO, O. T.; MENDES, A. J. T.; ROESSING, C. A poliploidia artificial na obtenção de melancia sem semente. **Bragantia**, Campinas, v. 17, p. 81-100, nov. 1958.
- NOH, J.; SHEIKH, S.; CHON, H. G.; SEONG, M. H.; LIM, J. H.; LEE, S. G.; JUNG, G. T.; KIM, J. M.; JU, H. J.; HUH, Y. C. Screening different methods of tetraploid induction in watermelon [*Citrullus lanatus* (thunb.) Manst. and Nakai]. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Heidelberg, v. 53, n. 6, p. 521-529, 2012.
- RAZA, H.; JASKANI, M. J.; KHAN, M. M.; MALIK, T. A. In vitro induction of polyploids in watermelon and estimation based on DNA content. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 5, n. 3, 2003. Disponível em: <http://www.fspublishers.org/publicshed_papers/25191_.pdf>. Acesso em: 12 maio 2017.
- SHEIKH, S.; NOH, J.; SEONG, M. H.; JUNG, T. G.; KIM, M. J.; JU, H.; HUH, Y. C. Phenotypic markers for tetraploid watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] following parental exposure to colchicine in T₀ generation. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Heidelberg, v. 54, n. 6, p. 524-530, 2013.
- SOUZA, F. de F.; QUEIRÓZ, M. A. de; DIAS, R. de C. S. Melancia sem sementes: desenvolvimento e avaliação de híbridos triplóides experimentais de melancia. **Biociência**, Brasília, DF, n. 9, p. 90-95, 1999.
- SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A.; DIAS, R. C. S. Desenvolvimento de híbridos triplóides experimentais de melancia. **Sítientibus. Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana**, Feira de Santana, v. 1, n. 2, p. 154-160, 2001.
- SOUZA, F. de F.; QUEIRÓZ, M. A. de. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliploides de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, n. 3, p. 516-520, jul./set. 2004.