

## Notas Científicas

### Desenvolvimento in vitro de bananeira 'Ouro' após poliploidização com antimitóticos

Viviane Peixoto Borges<sup>(1)</sup>, Thiago de Santana Marques<sup>(1)</sup>, Alda Silva dos Reis<sup>(1)</sup>,  
Neuza Helena Carvalho de Oliveira<sup>(1)</sup>, Jamily Almeida de Jesus<sup>(1)</sup>, Daniela Garcia Silveira<sup>(2)</sup>,  
Janay Almeida dos Santos-Serejo<sup>(3)</sup>, Sebastião de Oliveira e Silva<sup>(3)</sup> e Carlos Alberto da Silva Ledo<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, nº 710, Centro, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: vivipborges@yahoo.com.br, thiagosmarques@gmail.com, aldareiss@gmail.com, hcarvalhoagro@gmail.com, jamilybio@hotmail.com

<sup>(2)</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Campus Guanambi, Zona Rural, Distrito de Ceraíma, CEP 46430-000 Guanambi, BA, Brasil. E-mail: dgsilveira@hotmail.com <sup>(3)</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/nº, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: jserejo@gmail.com, ssilva3000@gmail.com, carlos.ledo@embrapa.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi caracterizar o desenvolvimento in vitro de bananeira 'Ouro' após poliploidização com antimitóticos. Explantes foram submetidos aos seguintes tratamentos, por 24 e 48 horas: amiprofos-metil (APM), a 0, 10, 20, 30, 40 e 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; cafeína, a 3, 6, 9 e 12  $\text{g L}^{-1}$ ; e colchicina, a 2,5  $\text{mmol L}^{-1}$ . Avaliaram-se sobrevivência, número de brotos, altura do broto principal e número de raízes. As concentrações intermediárias foram as mais promissoras nos dois tempos de exposição, para APM, e no de 24 horas para cafeína. As maiores concentrações de APM e cafeína afetam negativamente o desenvolvimento in vitro dos explantes.

Termos para indexação: *Musa acuminata*, amiprofos-metil, cafeína, colchicina.

### In vitro development of 'Ouro' banana after polyploidization with antimetotics

**Abstract** – The objective of this work was to characterize the in vitro development of 'Ouro' banana after polyploidization with antimetotics. Shoot apices were subjected to the following treatments for 24 and 48 hours: amiprofos-methyl (APM), at 0, 10, 20, 30, 40, and 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; caffeine, at 3, 6, 9, and 12  $\text{g L}^{-1}$ ; and colchicine, at 2.5  $\text{mmol L}^{-1}$ . Survival, number of shoots, main shoot height, and number of roots were evaluated. The intermediary concentrations were the most promising at both exposure times for APM and at 24 hours for caffeine. The highest concentrations of APM and caffeine negatively affect the in vitro development of the shoot apices.

Index terms: *Musa acuminata*, amiprofos-methyl, caffeine, colchicine.

O Brasil é o quarto produtor mundial de banana (*Musa* sp.), com produção de aproximadamente 6,9 milhões de toneladas, cultivadas em 485 mil hectares (FAO, 2016). O melhoramento genético convencional da bananeira é baseado no cruzamento de triploides com diploides selvagens ou melhorados, bem como no cruzamento de tetraploides com diploides selvagens ou melhorados (Amorim et al., 2011; Silva et al., 2013). Contudo, esse método é limitado pela ocorrência de esterilidade em materiais de interesse. Para contornar essa dificuldade, estão sendo empregadas técnicas como a poliploidização in vitro, que se baseia na indução da duplicação cromossômica em diploides promissores, seguida do cruzamento dos autotetraploides com diploides melhorados, o que gera

um triploide secundário. Assim, é possível introduzir resistência a doenças nos híbridos gerados, como, também, obter híbridos triploides secundários com características de fruto semelhantes às das variedades de interesse (Bakry et al., 2007; Silva et al., 2013).

Os antimitóticos são um dos principais fatores que influenciam a poliploidização. Essas substâncias atuam ao se ligar às proteínas que formam as fibras do fuso acromático, denominadas tubulinas, o que impede sua polimerização. Consequentemente, suprimem a formação das fibras ou, ainda, inativam os fusos mitóticos já formados, o que não permite a separação dos cromossomos na anáfase. Desse modo, as células iniciam o ciclo celular seguinte com a quantidade de DNA duplicada (Aleza et al., 2009).

O antimitótico tradicionalmente utilizado em estudos dessa natureza é a colchicina; porém, essa substância provoca efeitos secundários, como esterilidade, crescimento anormal e mutações, além de ser altamente tóxica para o homem devido a sua elevada afinidade com os microtúbulos da célula animal (Dhooghe, 2011). Alguns tipos de herbicidas apresentam capacidade de poliploidização com baixa toxicidade, como o amiprofos-metil (APM), um herbicida amido fosfórico, que vem sendo testado por ser eficaz no bloqueio de células em metáfase (Doležel et al., 1994). Outra substância que está sendo avaliada é a cafeína, que apresenta as vantagens de ser pouco dispendiosa e relativamente não tóxica para as plantas (Thomas et al., 1997). É importante salientar que há poucos estudos sobre bananeira com substâncias alternativas à colchicina, especialmente com APM (Rodrigues et al., 2011), e não há relatos do uso da cafeína na poliploidização *in vitro* dessa cultura.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o desenvolvimento *in vitro* de bananeira 'Ouro' após poliploidização com antimitóticos.

O experimento foi conduzido na Embrapa Mandioca e Fruticultura (12°40'9"S e 39°06'22"W, a 220 m de altitude), em Cruz das Almas, BA. Foi utilizada a cultivar diploide (AA) Ouro de *Musa acuminata* Colla, obtida do banco ativo de germoplasma da referida instituição. Os tratamentos foram aplicados em ápices caulinares com 1 cm de comprimento e consistiram dos seguintes antimitóticos, testados em dois tempos de imersão (24 e 48 horas): APM, a 0, 10, 20, 30, 40 e 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; cafeína, a 0, 3, 6, 9 e 12  $\text{g L}^{-1}$ ; e colchicina, a 2,5  $\text{mmol L}^{-1}$ . A concentração de colchicina apresentou bons resultados em estudos de poliploidização com diploides de bananeira e, portanto, foi utilizada como parâmetro de comparação (Ganga & Chezhiyan, 2002; Rodrigues et al., 2011).

Para a aplicação dos tratamentos, seis explantes por frasco foram imersos em 20 mL de meio de cultura MS líquido acrescido das soluções antimitóticas. Foram utilizados cinco frascos, o que totalizou 30 explantes por tratamento. Os explantes permaneceram sob agitação mecânica, a 120 rpm, durante 24 e 48 horas, em sala de crescimento artificial, com fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes (40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram lavados em água estéril por 24 horas,

sob agitação, e, posteriormente, estabelecidos *in vitro* (dois explantes por frasco).

Após o estabelecimento, foram realizados três subcultivos, que são o mínimo necessário para a redução de mixoploides. Em todas as etapas, foi utilizado o meio MS gelificado com 2,4  $\text{g L}^{-1}$  de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  de 6-benzilaminopurina (BAP), e o pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ . Os subcultivos ou os ciclos de multiplicação foram realizados em intervalos de 45 dias, por meio da subdivisão longitudinal das brotações individuais, retiradas dos tecidos oxidados e de raízes existentes, seguida da transferência dos explantes para meio de cultura fresco. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento artificial.

Após 45 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis: percentual de sobrevivência, número de brotos, altura do broto principal (cm) e número de raízes. Todos os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições; cada uma representada por um frasco e dois explantes, o que totalizou 30 explantes por tratamento. Para APM, utilizou-se arranjo fatorial 6x2, com seis concentrações e dois períodos de imersão; para cafeína, arranjo fatorial 5x2, com cinco concentrações e dois períodos de imersão; e, para colchicina, apenas uma concentração e dois períodos de imersão.

Os dados foram submetidos ao teste F da análise de variância, e, para as médias das concentrações, foram ajustados modelos de regressão polinomial, quando possível. As análises foram realizadas no programa estatístico Sisvar 5.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG).

Nos tratamentos com APM, foram observadas diferenças para as concentrações, além de interação entre concentração e tempo de exposição, em todas as variáveis analisadas. Entretanto, não houve efeito do tempo de forma isolada em nenhuma das variáveis. Para a maioria das variáveis, não foi possível o ajuste de um modelo de regressão até grau 2 e com alto  $R^2$  (Figura 1). Aos 45 dias após a indução de poliploidia, os maiores percentuais de sobrevivência dos explantes foram verificados na testemunha (ausência de antimitótico) e na concentração de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de APM, que apresentou 96,67 e 96,43% de sobrevivência dos explantes nos períodos de 24 e 48 horas de exposição ao antimitótico, respectivamente.

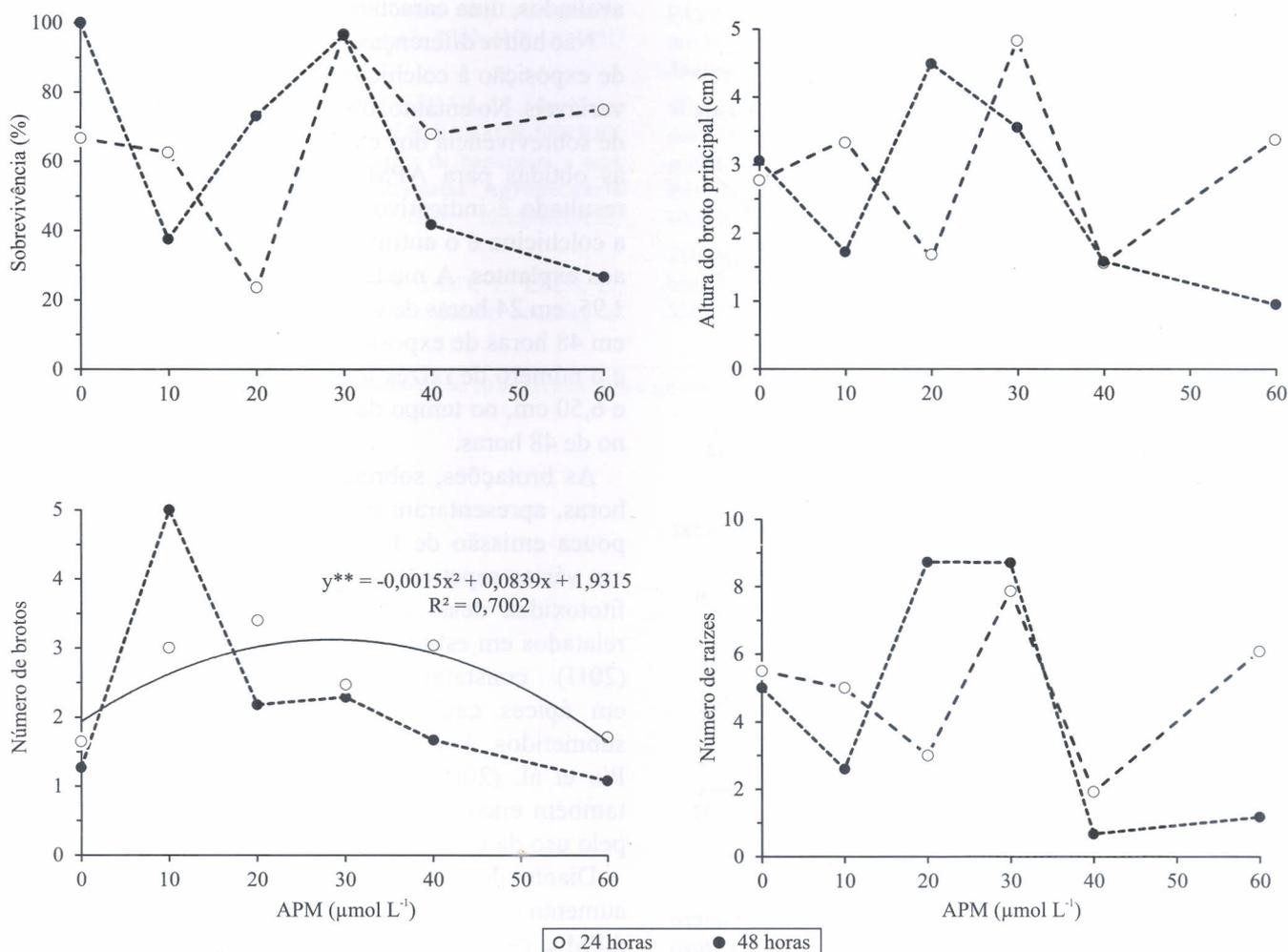
De modo geral, não foi possível estabelecer uma relação entre a sobrevivência dos explantes e as concentrações de APM, devido à amplitude dos resultados, não sendo possível, inclusive, ajustar equações de regressão. Contudo, observou-se maior mortalidade quando os explantes foram submetidos a concentrações mais elevadas e maior tempo de exposição aos tratamentos. Esses resultados corroboram os obtidos por Rodrigues et al. (2011), que avaliaram a indução de poliploidia em bananeira com uso de APM, nas concentrações de 40 e 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e com exposição por 24 e 48 horas.

Com relação ao número médio de brotos, constatou-se comportamento quadrático para os ápices caulinares tratados por 24 horas. Para 48 horas de exposição, houve elevada emissão de brotos na presença de 10

$\mu\text{mol L}^{-1}$ , em comparação à testemunha e às demais concentrações. Resultados semelhantes foram obtidos por Ganga & Chezhiyan (2002) e Costa et al. (2011) para orizalina, outro tipo de herbicida, na poliploidização in vitro de diferentes genótipos de bananeira.

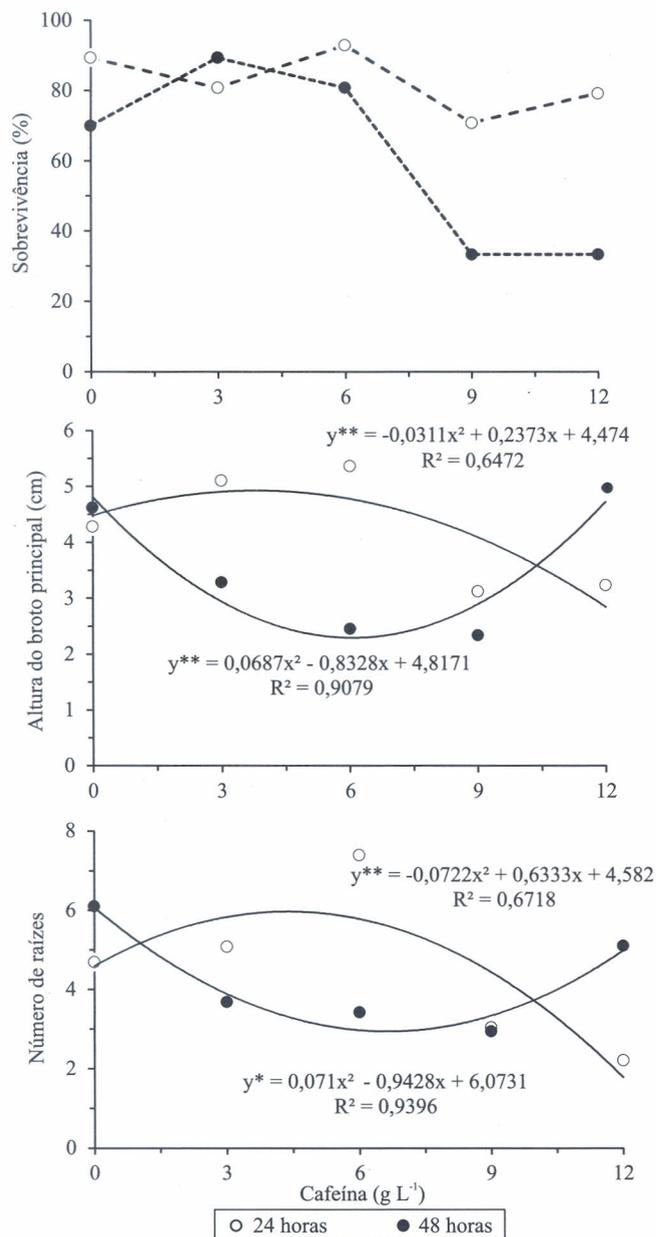
Quanto à altura do broto principal e ao número de raízes, resultados satisfatórios foram obtidos a 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de APM, para os explantes expostos durante 24 horas, e a 20 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para os explantes expostos por 48 horas. Observou-se, em todas as variáveis, que a combinação entre a maior concentração de APM e o maior período de exposição afetou negativamente o desenvolvimento in vitro dos explantes.

Em relação à aplicação da cafeína, houve interação entre concentração e tempo de exposição para todas as variáveis, exceto número médio de brotos (Figura 2).



**Figura 1.** Sobrevivência, altura do broto principal, número de brotos e número de raízes em ápices caulinares de bananeira 'Ouro' (*Musa acuminata*), submetidos à poliploidização in vitro com amiprofos-metil (APM), 45 dias após o estabelecimento.

Não houve variação para percentagem de sobrevivência dos explantes quando submetidos ao tempo de 24 horas; entretanto, houve redução de 58,73% em 48 horas de exposição, com aumento da concentração de 6 para 9 g L<sup>-1</sup>, tendo-se mantido a mesma variação na concentração de 12 g L<sup>-1</sup>.



**Figura 2.** Sobrevivência, altura do broto principal e número de raízes em ápices caulinares de bananeira 'Ouro' (*Musa acuminata*), submetidos à poliploidização in vitro com cafeína, 45 dias após o estabelecimento.

O número médio de brotos variou de 0,83, na concentração de 9 g L<sup>-1</sup> por 24 horas, a 1,40, na de 12 g L<sup>-1</sup> por 48 horas, mas não foram observadas diferenças estatísticas. Para altura do broto principal e número de raízes, foi possível ajustar equações de regressão, tendo-se obtido resultados semelhantes entre si, mas análogos ao encontrados para sobrevivência, com tendência de incremento destas variáveis na maior concentração (12 g L<sup>-1</sup>) e no maior tempo de exposição (48 horas).

No geral, as plantas tratadas com cafeína apresentaram aparência e desenvolvimento normal, sem as anormalidades observadas nos tratamentos com APM e, principalmente, colchicina, como raízes rígidas e escurecidas e formação de massa de células não diferenciadas na base dos explantes. Esses resultados são indicativos da menor fitotoxicidade da cafeína em comparação aos demais antimetabólitos avaliados, uma característica altamente desejável.

Não houve diferenças significativas nos dois períodos de exposição à colchicina, em relação a nenhuma das variáveis. No entanto, observou-se menor percentagem de sobrevivência dos explantes (50%) em comparação as obtidas para APM (66%) e cafeína (72%). Este resultado é indicativo, conforme o esperado, de que a colchicina é o antimetabólito que causa maior toxidez aos explantes. A média de brotos por explante foi de 1,95, em 24 horas de exposição à colchicina, e de 2,25 em 48 horas de exposição. A altura do broto principal e o número de raízes foram, respectivamente, de 2,74 e 6,50 cm, no tempo de 24 horas, e de 1,85 e 3,04 cm no de 48 horas.

As brotações, sobretudo aquelas expostas por 48 horas, apresentaram desenvolvimento anormal, com pouca emissão de folhas e não formação de raízes em várias repetições. Esses resultados, atribuídos à fitotoxicidade deste antimetabólito, são frequentemente relatados em estudos de poliploidização. Costa et al. (2011) constataram desordens morfofisiológicas em ápices caulinares de diploides de bananeira submetidos à poliploidização com colchicina. Já Pio et al. (2014), em pesquisas de poliploidização, também encontraram sintomas de toxidez causados pelo uso da colchicina.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o aumento da concentração e do período de imersão em APM e cafeína induz maior taxa de mortalidade em culturas de bananeira 'Ouro', e que as concentrações de 60 μmol L<sup>-1</sup> de APM e 12 g L<sup>-1</sup> de cafeína afetam

negativamente o desenvolvimento in vitro dos explantes avaliados. Contudo, as concentrações avaliadas de cafeína não causam desordens morfofisiológicas em ápices caulinares de bananeira, e a colchicina é o antimitótico que causa maior fitotoxidez.

## Referências

- ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. **Plant Cell Reports**, v.28, p.1837-1846, 2009. DOI: 10.1007/s00299-009-0783-2.
- AMORIM, E.P.; SILVA, S. de O. e; AMORIM, V.B. de O.; PILLAY, M. Quality improvement of cultivated *Musa*. In: PILLAY, M.; TENKOUANO, A. (Ed.). **Banana breeding: progress and challenges**. New York: CRC Press, 2011. p.252-280. DOI: 10.1201/b10514-14.
- 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.
- COSTA, F.H. da S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. e; PEREIRA NETO, H.P. da; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. 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.
- DHOOGHE, E.; LAERE, K. van; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. van. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.359-373, 2011. DOI: 10.1007/s11240-010-9786-5.
- DOLEŽEL, J.; DOLEŽELOVÁ, M.; NOVÁK, F.J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, v.36, p.351-357, 1994. DOI: 10.1007/BF02920930.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 27 jan. 2016.
- GANGA, M.; CHEZHIYAN, N. Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.77, p.572-575, 2002. DOI: 10.1080/14620316.2002.11511540.
- 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. DOI: 10.5897/AJB2014.14009.
- RODRIGUES, F.A.; SOARES, J.D.R.; SANTOS, R.R. dos; PASQUAL, M.; SILVA, S. de O. e. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.13476-13481, 2011.
- SILVA, S. de O. e; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos; FERREIRA, C.F.; RODRIGUEZ, M.A.D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.919-931, 2013. DOI: 10.1590/S0100-294520130003000032.
- THOMAS, J.; CHEN, Q.; HOWES, N. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. **Genome**, v.40, p.552-558, 1997. DOI: 10.1139/g97-072.

Recebido em 20 de abril de 2016 e aprovado em 28 de junho de 2016