

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE DIPLÓIDES DE BANANEIRA TRATADOS COM COLCHICINA

Frederico Henrique da Silva Costa¹, Moacir Pasqual², Sebastião de Oliveira e Silva³, Edson Perito Amorim³, Honorato Pereira da Silva Neto⁴, Rute Lea Tosta⁵ e Janay Almeida dos Santos Serejo³

Resumo

A duplicação do número de cromossomos *in vitro* é uma importante técnica para complementar as atividades convencionais de melhoramento genético da bananeira sendo utilizada para obter triplóides secundários. O trabalho teve por objetivo determinar os efeitos *in vitro* de concentrações de colchicina (0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mM) e tempos de exposição (24 h e 48 h) em diplóides de *Musa acuminata* Colla. O tratamento com colchicina *in vitro* provocou uma redução significativa na sobrevivência e no número médio de brotos, intensificado com o aumento da concentração e do tempo de exposição. Entre as plantas tratadas e regeneradas em aclimatização têm-se observado indivíduos com folhas mais espessas, largas e de crescimento lento. O trabalho encontra-se em andamento, as plantas obtidas serão pré-selecionadas com base em características morfológicas, e os possíveis autotetraplóides terão a ploidia confirmada por outros métodos.

Introdução

A obtenção de variedades de bananeira mais produtivas e resistentes a pragas é dificultada mediante o melhoramento por hibridação, sobretudo, devido o longo ciclo, triploidia e esterilidade na maioria das variedades comestíveis. Em virtude dessas limitações, técnicas biotecnológicas como a duplicação do número de cromossomos *in vitro*, vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas para complementar às atividades convencionais de melhoramento genético da cultura (SILVA *et al.*, 2002).

Utilizando a duplicação de cromossomos, diplóides promissores são induzidos a autotetraploidia *in vitro* com agentes antimitóticos e as plantas duplicadas usadas em hibridações com outros diplóides melhorados, gerando triplóides secundários que apresentem características de interesse (VAN DUREN *et al.*, 1996; BAKRY *et al.*, 2007). Para isto, a colchicina tem sido o antimitótico mais utilizado e a variação de sua concentração, tempo de exposição e formas de aplicação a cada genótipo, devem ser pré-requisitos básicos em protocolos de duplicação de cromossomos (ASIF, MAK, YASMIN *et al.*, 2000; GANGA, CHEZHIAN, 2002; BAKRY *et al.*, 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar concentrações e tempos de exposição à colchicina e seus efeitos sobre a regeneração *in vitro* de diplóides de *M. acuminata* Colla.

Material e Métodos

Broto axilares da quarta geração *in vitro* (cortados 4-8 mm acima da base e com algumas bainhas foliares removidas) foram utilizados para a indução de autotetraplóides dos diplóides de *M. acuminata* (2n=2x=22) Tong Dok Mak (TDM), NBA-14 e Malbut.

Os tratamentos constituíram-se de cinco concentrações de colchicina (0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mM) e dois tempos de exposição (24h e 48h). Para isso, uma solução estoque (0,1 M) foi preparada dissolvendo-se a colchicina em álcool 95% e completando o volume final com água Mili Q. Em seguida, a solução foi esterilizada a frio (0,22 µm) e as concentrações finais (tratamentos) adicionadas ao meio líquido já autoclavado. Foram utilizados seis frascos de 250 mL, cada um contendo 20 mL do tratamento e cinco explantes, os quais permaneceram em agitação (120 rpm) e ambiente sala de

¹ Estudante de Doutorado em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: fredericohenrique@yahoo.com.br

² Professor do departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, CEP 37200-000.

³ Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000. E-mail: ssilva@cnpmf.embrapa.br; edson@cnpmf.embrapa.br; janay@cnpmf.embrapa.br

⁴ Assistente A, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000.

⁵ Estudante de Agronomia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000.

crescimento artificial (temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas à $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecido por duas lâmpadas fluorescentes tubulares do tipo luz do dia especial - Osram 20 W). Após a aplicação dos tratamentos, os explantes (dez por frasco) foram mantidos em 40 mL de água destilada e autoclavada, por 24 horas a 120 rpm. Por fim, os explantes foram transferidos para seis frascos (cinco por frasco) contendo 40 mL de meio fresco semi-sólido, fase denominada de primeiro subcultivo pós-tratamento.

Em todas as etapas, utilizou-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com BAP (6-benzilaminopurina) ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), pH 5.8, e autoclavado por 20 min. Apenas os tratamentos foram realizados em meio líquido, nas demais fases o meio foi solidificado com Phytigel ($1,7 \text{ g L}^{-1}$). As avaliações foram realizadas aos 30 dias do primeiro subcultivo, determinando-se a percentagem de sobrevivência dos explantes, o número de brotações em cada explante inicial e outros parâmetros.

Após as avaliações, os explantes sobreviventes (brotações axilares e gemas existentes) foram subcultivados por mais duas vezes em meio fresco. Em seguida, as brotações foram alongadas e enraizadas em meio MS desprovido de BAP, e as plantas obtidas transferidas para estufa de aclimatização. Os subcultivos (30-35 dias) foram realizados em sala de crescimento artificial, enquanto o alongamento e enraizamento sob luz natural.

O experimento foi delineado inteiramente ao acaso, num esquema fatorial 5×2 , com seis repetições (cada constituída por um frasco e cinco explantes, total de 30 explantes por tratamento). Os dados foram submetidos à análise de variância, e foram ajustadas equações, quando apropriado. Dados referentes à percentagem de sobrevivência e número de brotos foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$ e $(x+1)^{0,5}$ respectivamente.

Resultados e Discussão

Os resultados de sobrevivência e o número de brotos do genótipo Malbut estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Interação significativa entre os fatores estudados (concentração x tempo de exposição) foi observada para os genótipos Tong Dok Mak e Malbut, enquanto para o diplóide NBA-14 apenas o fator tempo de exposição foi significativo.

Para a variável sobrevivência dos explantes, um bom ajuste das equações de regressão ($R^2 > 0,90^{**}$) foi observado nos genótipos utilizados. De modo geral, houve uma tendência de redução na sobrevivência com o aumento da concentração e tempo de exposição, diminuição essa intensificada a partir de 1,25 mM e 48 horas (Figuras 1 e 2). Entre os genótipos, o Malbut foi o menos sensível ao tratamento (Figura 1).

Com relação ao número de brotos, nenhum modelo polinomial (até o 3º grau) foi ajustado no genótipo TDM, e as médias variaram de 0,63 brotos (0 mM) a 1,67 brotos (5 mM), com 24 horas de exposição; e de 1,27 brotos (0 mM) a 0,08 brotos (5 mM), as 48 horas. Quanto ao genótipo NBA-14, não houve efeito significativo do fator concentração, diferentemente do tempo de exposição, onde maior e menor número de brotos foi observado com 24 horas (1,46 brotos) e 48 horas (0,50 brotos) respectivamente (teste t, $P < 0,05$). Com relação ao diplóide Malbut, houve uma tendência de aumento do número de brotos às 24 horas de exposição, ao passo que às 48 horas, essa tendência foi de redução, principalmente após 2,5 mM de colchicina (Figura 1). Outros efeitos, tais como, redução da emissão de raízes e de folhas e aumento da oxidação dos explantes foram observados em resposta aos tratamentos com colchicina (Figura 2). Embora o meio utilizado apresente BAP, cujo efeito principal é induzir brotos, raízes podem ser emitidas com o tempo de cultivo.

Os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com outros trabalhos, nos quais o tratamento com colchicina (2,5 mM a 10 mM), por 12, 24 e 36 horas, promoveu redução da sobrevivência dos explantes, demora na regeneração *in vitro* de brotos (emissão da primeira folha) e redução no número de brotos regenerados em diplóides de bananeira AA e AB (VAN DUREN et al., 1996; GANGA, CHEZHIYAN, 2002).

O presente trabalho encontra-se em andamento. Entre as plantas tratadas e regeneradas em aclimatização têm-se observado indivíduos com folhas mais espessas, largas e de crescimento lento, as quais serão submetidas a uma pré-seleção com base em características morfológicas, e os possíveis

autotetraplóides terão a ploidia confirmada por métodos como a citometria de fluxo e contagem do número de cromossomos.

Conclusões

O tratamento dos explantes com colchicina reduz a sobrevivência e o desenvolvimento de brotos. Concentrações maiores que 1,25 mM e 48 horas de exposição apresentam alta fitotoxicidade.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de estudos e financiamento de projetos.

Referências

- ASIF, M. J.; MAK, C.; YASMIN, O. R. Polyploid induction in a local wild banana (*Musa acuminata* spp. malaccensis). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 3, n. 5, p. 740-743. 2000.
- BAKRY, F.; REBERDIERE, N.P.; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicines treatment inducuz non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. *Fruits*, v. 62, p. 3-12. 2007.
- GANGA, M.; CHEZHIAN, N. Influence of the antimitotic agents colchicines and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 77, n. 5, p. 572-575. 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG F.A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497. 1962.
- SILVA, S.O.; ALVES, E.J.; LIMA, M.B.; SILVEIRA, J.R.S. *Bananeira*. In: BRUCKNER, C.H. Melhoramento de Fruteiras Tropicais. Viçosa: UFV, p.101-157. 2002.
- VAN DUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica*, v. 88, p. 25-34. 1996.

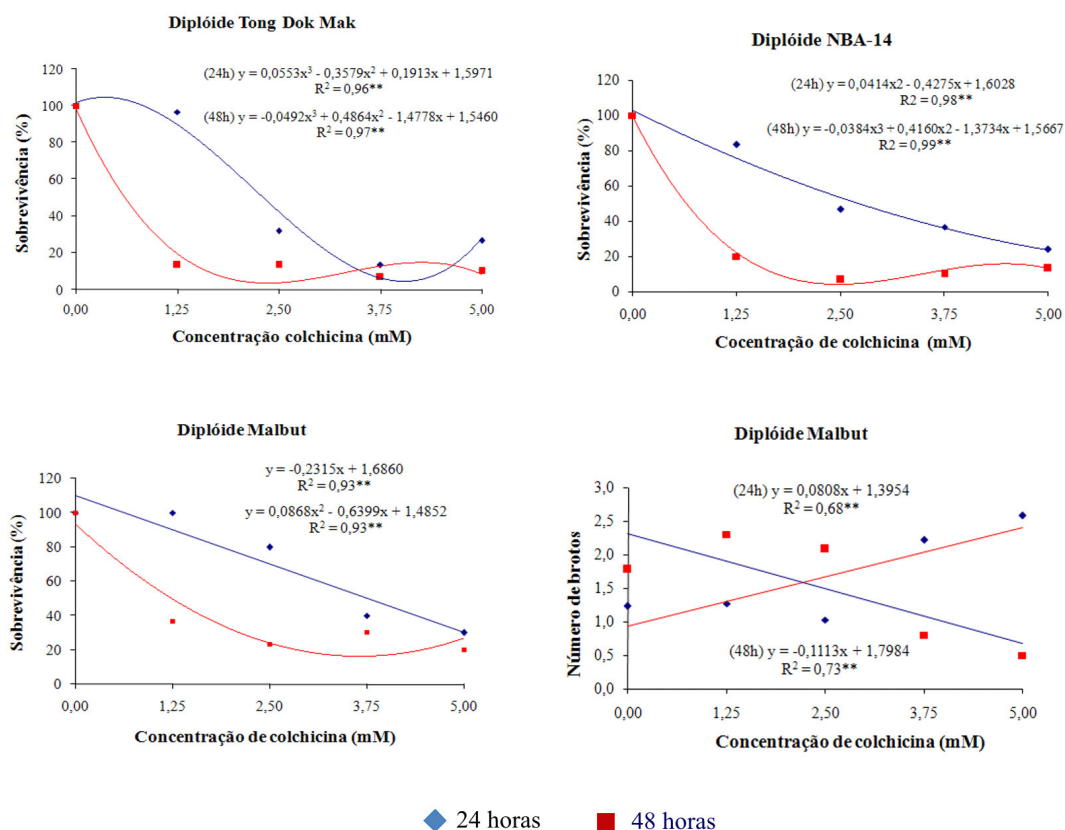


Figura 1. Equações de regressão para a sobrevivência e o número de brotações, por genótipo diplóide, em razão das concentrações de colchicina e do tempo de exposição (24 horas e 48 horas). Média de seis repetições. ** significativos a 1% de probabilidade. Cruz das Almas, 2009.

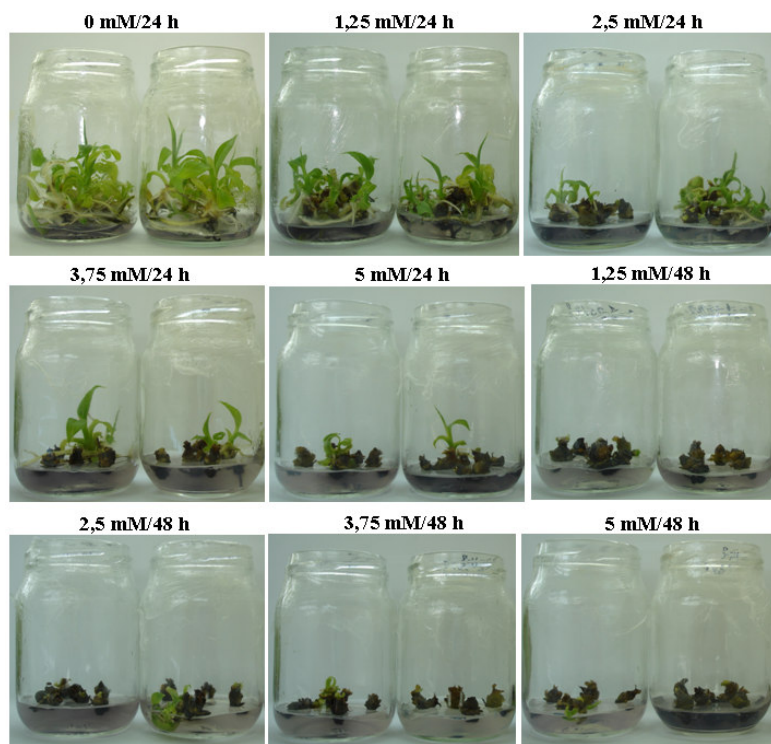


Figura 2. Efeitos morfofisiológicos *in vitro* da indução de autotetraplóides no genótipo NBA-14 pelo uso colchicina, aos 30 dias do primeiro subcultivo. Cruz das Almas, 2009.