

USO DE ORIZALINA NA INDUÇÃO DE AUTOTETRAPLÓIDES DE BANANEIRA E SEUS EFEITOS *IN VITRO*

Frederico Henrique da Silva Costa¹, Sebastião de Oliveira e Silva², Honorato Pereira da Silva Neto³, Moacir Pasqual⁴, Edson Perito Amorim², Rute Lea Tosta⁵ e Janay Almeida dos Santos Serejo²

Resumo

O uso de orizalina como agente antimitótico é promissor na indução de plantas autotetraplóides *in vitro* e apresenta vantagens em relação à colchicina. O trabalho teve por objetivo determinar os efeitos *in vitro* de concentrações de orizalina (0, 15, 22,5 e 30 µM) e tempos de exposição (3 dias e 7 dias) em diplóides de *Musa acuminata*. A orizalina, nas concentrações e nos tempos de exposição avaliados, apresentou um baixo efeito negativo na sobrevivência dos explantes, sendo considerada de reduzida fitotoxicidade. O número médio de brotos por explante foi influenciado positivamente pela orizalina. O trabalho encontra-se em andamento, e as plantas tratadas e regeneradas em aclimatização têm apresentado indivíduos com diferenças morfológicas, os quais serão submetidos a uma pré-seleção com base em sua morfologia, e os possíveis autotetraplóides selecionados submetidos à confirmação da ploidia por outros métodos.

Introdução

A duplicação *in vitro* do número de cromossomos é uma técnica promissora e complementar às atividades convencionais de melhoramento genético da bananeira. Para isto, ápices caulinares de diplóides potencialmente úteis são induzidos à autotetraploidia *in vitro* com agentes antimitóticos como a colchicina e orizalina. Em seguida, as plantas duplicadas são utilizadas em hibridações com outros diplóides melhorados para gerar híbridos triplóides secundários que apresentem características de interesse (GANGA, CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007).

Entre os fatores básicos e que determinam o sucesso da duplicação de cromossomos *in vitro* destacam-se tipo, concentração, período de exposição e formas de aplicação do agente antimitótico, bem como o genótipo utilizado. Quanto ao tipo de antimitótico, a colchicina é a mais utilizada em bananeira, porém além dessa substância ser altamente tóxica ao ser humano, uma alta fitotoxicidade *in vitro* têm sido observada (VAN DUREN et al, 1996; GANGA, CHEZHIYAN, 2002). Como alternativa, compostos como a orizalina têm sido usados com eficiência, tendo como vantagens a baixa toxicidade *in vitro* e maior afinidade com a proteína do fuso mitótico (tubulina), além de ser utilizada em concentrações micromolares (KHOSRAVI et al., 2008).

O trabalho teve por objetivo determinar os efeitos *in vitro* de concentrações de orizalina (0; 15; 22,5 e 30 µM) e tempos de exposição (3 dias e 7 dias) em diplóides de *M. acuminata*.

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 e NBA-14.

Os tratamentos constituíram-se de quatro concentrações de orizalina (0; 15; 22,5 e 30 µM) e dois tempos de exposição (3 dias e 7 dias). Para isso, uma solução estoque (1 mM) foi preparada dissolvendo-se a orizalina 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

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

² 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

³ Assistente A, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000.

⁴ Professor efetivo do departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, CEP 37200-000.

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

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 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 transferidos para três frascos contendo cada um 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 4×2 , 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 número de brotos por explante estão apresentados nas Figuras 1 e 2. À exceção do número de brotos no diplóide NBA-14, interação significativa foi observada entre os fatores estudados (concentração e tempo de exposição), com bom ajuste das equações de regressão para as variáveis avaliadas.

Em geral, para os dois genótipos, houve uma tendência de redução na sobrevivência com o aumento da concentração de orizalina, independente do tempo de exposição. Todavia, esta diminuição foi baixa se comparada aos explantes não tratados (Figura 1). Quanto ao número de brotos, o genótipo Tong Dok Mak apresentou um comportamento quadrático aos três dias, enquanto aos sete dias houve uma resposta linear, com tendência de aumento do número de brotos com o incremento da concentração de orizalina. No genótipo NBA-14, apenas o fator concentração de orizalina teve efeito significativo, com comportamento quadrático (Figura 1). Além dos efeitos já mencionados, observou-se ainda um reduzido crescimento e diminuição no número de folhas expandidas em resposta ao tratamento com orizalina (genótipo Tong Dok Mak, Figura 2). O aumento da proliferação de brotações pelo uso da orizalina está em concordância com outros trabalhos, e este efeito tem sido atribuído ao fato de alguns herbicidas do grupo das dinitroanilinas, como a orizalina, estimular o crescimento de plantas a baixas concentrações (VAN DUREN et al., 1996; GANGA, CHEZHIYAN, 2002).

O trabalho encontra-se em andamento, e as plantas tratadas e regeneradas em aclimatização têm apresentado indivíduos com diferenças morfológicas, tais como, folhas com maior espessura e largas. As possíveis plantas poliplóides serão pré-selecionadas com base em sua morfologia, e os indivíduos selecionados submetidos à confirmação da ploidia mediante análise do conteúdo de DNA nuclear e contagem do número de cromossomos.

Conclusões

Alta sobrevivência é observada nos explantes tratados com orizalina. O número de brotos por explante é influenciado positivamente pela orizalina.

Agradecimentos

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

Referências

BAKRY, F.; REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicines treatment induce 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.

KHOSRAVI, P.; KERMANI, M. J.; NEMATZADEH, G. A.; BIHAMTA, M. R.; YOKOYA, K. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. *Euphytica*, v.160, p.267-275. 2008.

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.

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.

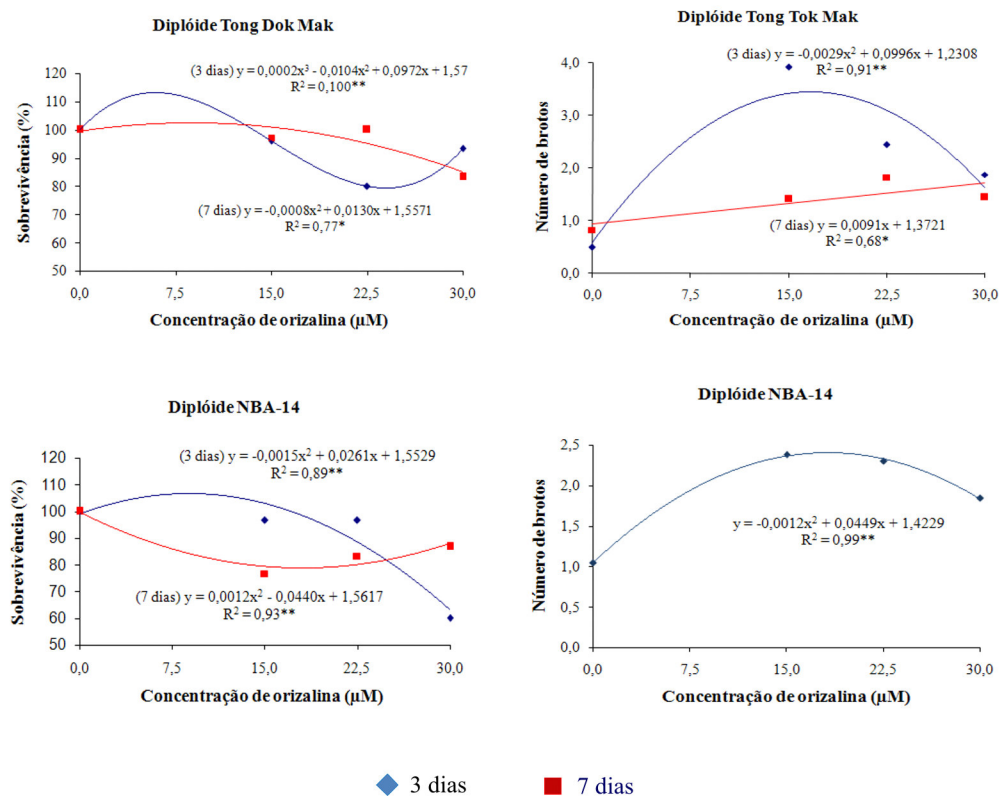


Figura 1. Equações de regressão para a sobrevivência e o número médio de brotações, por genótipo diplóide, em razão das concentrações de orizalina e do tempo de exposição (3 dias e 7 dias). Média de seis repetições. * e ** significativos a 5% e a 1% de probabilidade. Cruz das Almas, 2009.

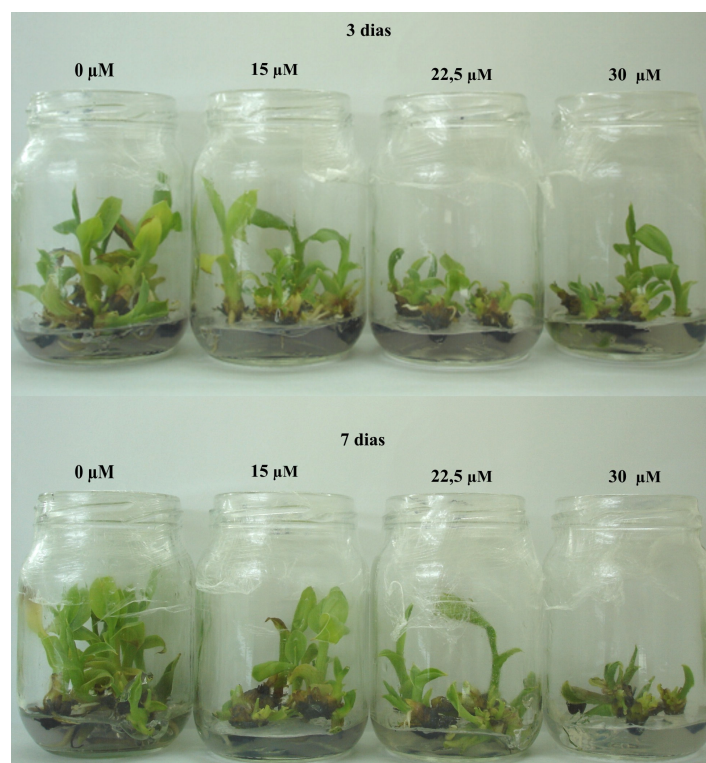


Figura 2. Efeitos morfofisiológicos *in vitro* da indução de autotetraplóides no genótipo Tong Dok Mak pelo uso orizalina, aos 30 dias do primeiro subcultivo. Cruz das Almas, 2009.