

# DURAÇÃO DO CICLO CELULAR EM MITOSE DE DIPLÓIDE DE BANANEIRA PELA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO

Lucymeire Souza Morais Lino<sup>1</sup>, Leila Aparecida Salles Pio<sup>2</sup>, Karine Simões Ferreira<sup>3</sup>, Camila Aparecida Lopes<sup>3</sup>, Sebastião de Oliveira e Silva<sup>4</sup>, Moacir Pasqual<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Pós-doutoranda Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas – BA, email: smorais@yahoo.com.br; <sup>2</sup> Pós-doutoranda Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras – MG, CP-3037, email: leilapio.ufla@gmail.com; <sup>3</sup> Aluna de Graduação – Universidade Federal de Lavras; <sup>4</sup> Pesquisador, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical – Cruz das Almas – BA, e-mail: ssilva@cnpmf.embrapa.br; <sup>5</sup> Professor, Universidade Federal de Lavras, mpasqual@ufla.br.

## INTRODUÇÃO

Os principais entraves da bananicultura são: falta de resistência às principais doenças e pragas, baixa produtividade e porte elevado de algumas cultivares. Uma das estratégias para a solução desses problemas é a criação de novas variedades, mediante o cruzamento de diplóides melhorados (AA) com triplóides (AAB) e tetraplóides artificiais (AAAB e AAAA), gerando híbridos tetraplóide e ou triplóides secundários.

Para a obtenção de tetraplóides (AAAA) sintéticos a partir de diplóides é necessário realizar a duplicação de cromossomos, mediante o uso de agentes antimitóticos como a colchicina e a orizalina (PIO, 2008). O conhecimento do tempo de duração do ciclo celular da bananeira otimizará trabalhos de duplicação de cromossomos, especificamente em relação ao período de exposição aos agentes antimitóticos, que são muito tóxicos e podem causar a morte das plantas em tempos de exposição muito prolongados. Pio (2008), em trabalhos com duplicação de cromossomos de bananeira, relatou problemas com a morte de grande parte das plantas e perda de parcelas. Esse problema não teria ocorrido se as plantas ficassem em exposição aos agentes antimitóticos apenas no tempo de duração do ciclo celular e não em períodos muito longos, como 24 e 48 h, como aqueles usados na maioria dos trabalhos de duplicação cromossômica. Este procedimento poderia diminuir também o aparecimento de mixoplóides (células com diferentes números de cromossomos na mesma planta), que é um outro problema grave neste tipo de trabalho.

A técnica para a obtenção da análise do ciclo celular usando a citometria de fluxo se baseia no estágio de divisão da célula no referido ciclo, registrada nos histogramas obtidos. Galbraith *et al.* (2002) e Sgorbati *et al.* (1986) entre outros, utilizaram esta técnica para estudar as diferenças de proporção de cada fase do ciclo celular, consoante os órgãos,

partes dos órgãos e idade das plantas. Sandoval et al. (2003) efetuaram um estudo ao nível do ciclo celular em tecidos *in vitro* de coqueiro de forma a controlar a sua regeneração.

Mediante o exposto, este trabalho teve como objetivo a observação do período do ciclo celular do diplóide NBA-14 de bananeira, com o uso da técnica de citometria de fluxo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizadas três plantas de diplóide NBA de bananeira, com um ano de idade, mantidas em vaso, em casa de vegetação. As plantas foram retiradas dos vasos e lavadas com cuidado para não danificar as raízes e em seguida foram colocadas em um recipiente contendo o sincronizador mitótico hidroxiuréia (2,5 mM), em volume suficiente para cobrir todas as raízes. As plantas foram mantidas nesse tratamento por 14 horas no escuro, após esse período, foram retiradas da solução de hidroxiuréia, lavadas e mantidas em um recipiente com água destilada de modo a cobrir as raízes. Os materiais utilizados para a análise foram ponta de raízes em crescimento ativo, coletadas em intervalos de uma hora e analisadas em citometria de fluxo. Para cada análise foram utilizadas seis raízes.

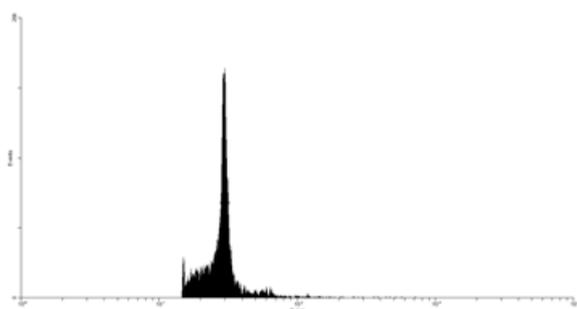
As amostras foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado, para a obtenção da suspensão nuclear (Dolezel, 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze com uma pipeta plástica, filtrado em uma malha de náilon de 50  $\mu$ m e armazenado em um tubo de polietileno. Em seguida as amostras foram coradas com 25  $\mu$ L de Iodeto de Propídeo e armazenadas no escuro, dentro de um recipiente com gelo triturado e posteriormente analisadas. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

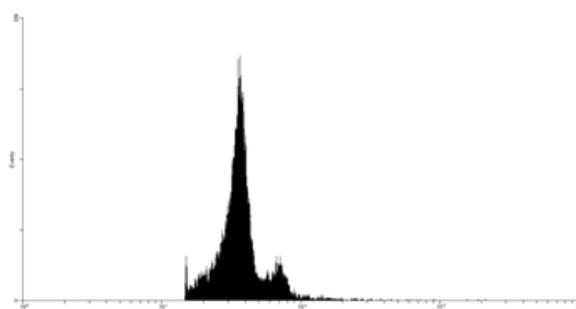
Em cada histograma obtido nas análises de citometria de fluxo foram analisadas 10.000 células e cada célula é representada por um ponto no gráfico, formando os picos que podem ser observados nas Figuras 1. O histograma da Figura 1-A refere-se à testemunha, que não foi submetida ao tratamento. O pico obtido refere-se a fase G1 da interfase e foi formado no canal 29,84 e ao análise teve coeficiente de variação muito baixo (1,08). O Histograma da Figura 1-B se refere ao material analisado imediatamente após o tratamento

com hidroxiuréia, apresentou o pico G1 formado no canal 35,92 e obteve-se cv elevado (2,83). É possível observar que a espessura do pico é maior em relação a da testemunha. Isso é devido ao acúmulo de células na fase G1 da interfase, que se concentram nesta fase do ciclo, devido ao uso do sincronizador hidróxiuréia. Observou-se também a formação de um pequeno pico, que se refere a células na fase G2 da interfase e também células entrando em mitose. No histograma da Figura 1-C é possível observar que uma hora após a retirada do material da solução com hidroxiuréia o pico G1 diminui, enquanto o G2 aumenta, indicando a passagem das células da fase G1 para a G2 da interfase à mitose. Na Figura 1-D horas após o tratamento o pico G2 tornou-se maior que o G1, indicando que a maioria das células estão na fase G2 da interfase e em mitose. No histograma da Figura 1-E, as células tendem a retornar ao final do ciclo e na Figura 1-F o pico se tornou semelhante ao da testemunha, sendo formado no canal 28,89 e o coeficiente de variação volta a ficar baixo (1,14) e o ciclo celular se estabiliza na fase G1 da mitose após quatro horas de observação.

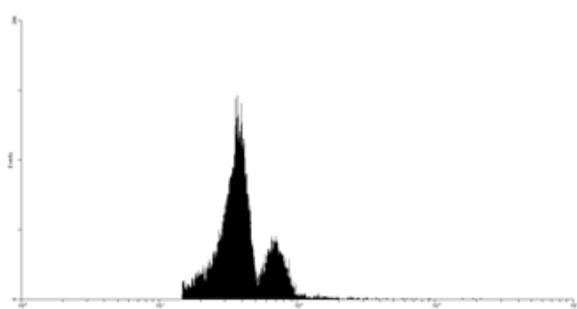
Esses resultados demonstraram que a citometria de fluxo é uma boa técnica para ser utilizada na análise do ciclo celular do diplóide NBA-14 de bananeira.



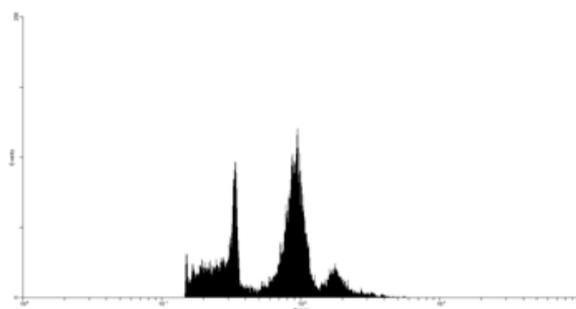
**A. Testemunha – canal 29.84 CV 1.08**



**B. Tempo 0 - canal 35.92 CV 2.83**



**C. Tempo 1h – canal 35.83 CV 3.28**



**D. Tempo 2h – Pico 1: canal 33.48 CV 0.83  
Pico 2: canal 91.79 CV 2.13**

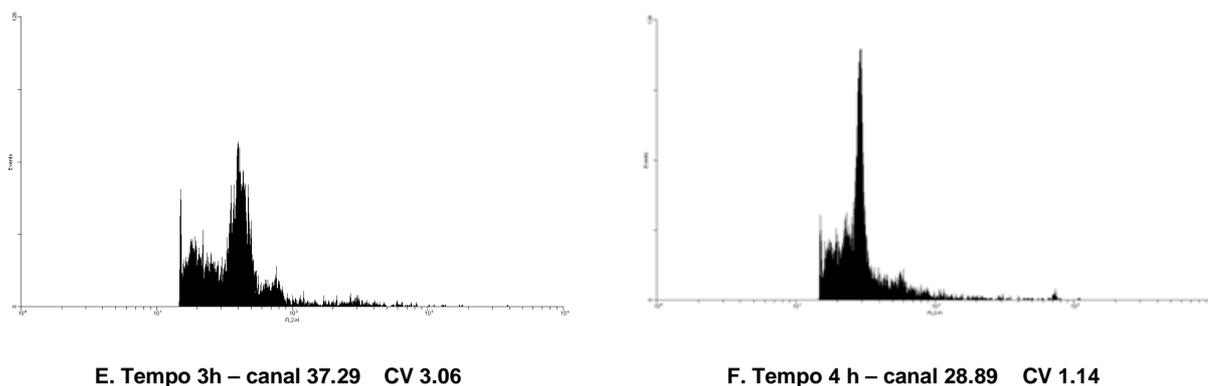


Figura 1. Histogramas de citometria de fluxo de plantas do genótipo NBA, submetidas a tratamentos com hidroxiuréia para a verificação do tempo do ciclo celular.

## CONCLUSÃO

O ciclo celular mitótico da bananeira diplóide NBA-14 dura aproximadamente 4 horas.

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOLEŽEL, J. 1997. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics** 38 (3): 285-302.
- GALBRAITH, D.; LAMBERT, G.; MACAS, J. E DOLEŽEL, J. 2002. **Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. Current Protocols in cytometry**, Eds Robinson, J., Azmi, A. e Tutois, S. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 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.
- SANDOVAL, A.; HOCHER, V. E VERDEIL, J. L. 2003. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. **Plant Cell Reports** 22 (1): 25-31.

SGORBATI, S.; LEVI, M.; SPARVOLI, E.; TREZZI, F. E LUCCHINI, G. 1986. Cytometry and flow cytometry of 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)-stained suspensions of nuclei released from fresh and fixed tissues of plants. **Physiologia Plantarum** 68 (3): 471-476.