



ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE DNA DE *Musa acuminata* COLLA COM DIFERENTES PLOIDIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

SEBASTIÃO DE OLIVEIRA E SILVA¹, LEILA APARECIDA SALLES PIO², MANUELA RAMOS DA SILVA³, DANIELA GARCIA SILVEIRA², JANAY DE ALMEIDA SANTOS-SEREJO⁴, LUCYMEIRE SOUZA MORAIS LINO²

INTRODUÇÃO

A determinação do nível de ploidia em plantas submetidas à duplicação cromossômica pode ser realizada por métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos compreendem a contagem dos cromossomos em células mitóticas e ou meióticas e a avaliação do conteúdo de DNA pela citometria de fluxo (DOLEZEL et al., 1994; VILLA, 1995). Entre os métodos indiretos que poderiam ser utilizados citam-se as características morfológicas e anatômicas das plantas.

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve análises de dispersão da luz, fluorescência, radiação, laser, fluxo hidrodinâmico e substâncias fluorescentes (fluorocromos) na determinação de algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas (células, núcleos, cromossomos e organelas). Para isso, é necessário utilizar um equipamento denominado citômetro de fluxo. Pela informação gerada por meio da determinação do conteúdo de DNA com alta resolução, é possível estimar o nível de ploidia das amostras de interesse. Este estudo tem sido empregado com sucesso em trabalhos de melhoramento genético de várias espécies vegetais, inclusive para a cultura da bananeira (DOLEZEL et al., 1994).

O presente trabalho objetivou avaliar o conteúdo de DNA do genoma de plantas diploides, triploides e tetraploides de *Musa acuminata* Colla por citometria de fluxo e confrontar esses dados com o grau de ploidia desses materiais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas frescas dos acessos de bananeira Calcutta e NBA (diploide AA), Grande Naine e Caipira (triploides AAA) e Calypso e Bucanero (tetraploides AAAA), obtidos na Embrapa

¹ Eng. Agr., PVNS/Capes/UFRB, e-mail: ssilva3000@gmail.com

² Eng. Agr., bolsista Capes PNPB, e-mail: leilapio.ufla@gmail.com, danielags@ig.com.br, lsmoraes@yahoo.com.br

³ Eng. Agr., estudante de pós-graduação, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, e-mail: manuelaagronomia@yahoo.com.br

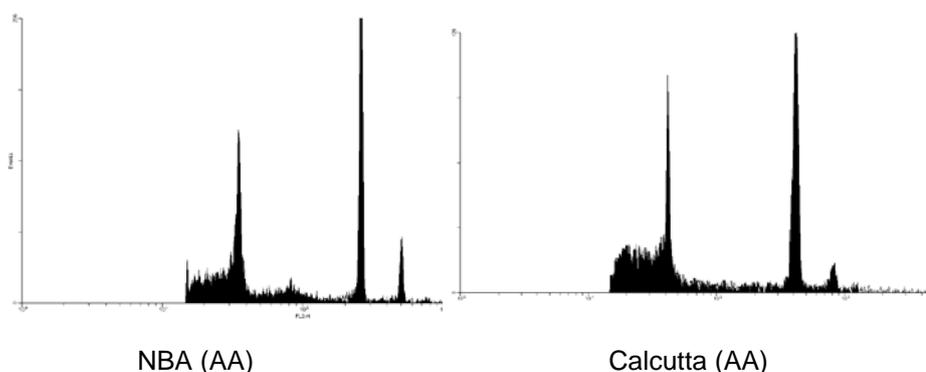
⁴ Eng. Agr., pesquisadora Embrapa Mandioca e Fruticultura, e-mail: janay@cnpmf.embrapa.br

Mandioca e Fruticultura, foram trituradas em placas de Petri, juntamente com o padrão de referência (*Pisum sativum* - 9,09 pg de DNA) contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos LB01. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e tela de 50 µm e posteriormente corada com 25 µL de iodeto de propídeo. Todo esse processo foi realizado sob gelo triturado. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur 4 cores (Becton Dickinson – BD), os histogramas obtidos no software Cell Quest™ e analisados no programa WINMDI, assim a leitura da fluorescência emitida por cada núcleo foi transformada em um ponto no histograma.

A determinação da quantidade de DNA foi feita pela posição relativa do pico G1 da planta analisada em relação à posição do pico G1 de um padrão de referência (9,09 pg). Os valores de conteúdo de DNA e os coeficientes de variação (CV) dos tratamentos (seis com quatro repetições) foram submetidos à análise de variância, sendo os coeficientes de variação e índices de DNA comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% pelo programa estatístico SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os histogramas obtidos pelas análises de citometria de fluxo de seis genótipos (di, tri e tetraplóides) de *Musa acuminata* Colla geraram picos G1 e G2 que representam respectivamente, a maior parte dos núcleos que estão na fase G1 da interfase e aqueles que estão na fase G2 da interfase juntamente, com os núcleos que estão em mitose (Figura 1). O pico G2 nem sempre foi formado. O vale formado entre os dois picos representa o período de síntese de DNA, ou seja, a fase S da interfase. Como foram analisados simultaneamente dois materiais vegetais, os histogramas geraram dois picos G1. O primeiro referente à análise das amostras de bananeira, enquanto o segundo é o do padrão de referência interno (*Pisum sativum*). Os picos menores formados são referentes à fase G2 da interfase e mitose e não são necessários para as análises, portanto, são desconsiderados. A razão entre estes dois picos (*Musa e Pisum*) foi utilizada como base para calcular o conteúdo de DNA das amostras de bananeira.



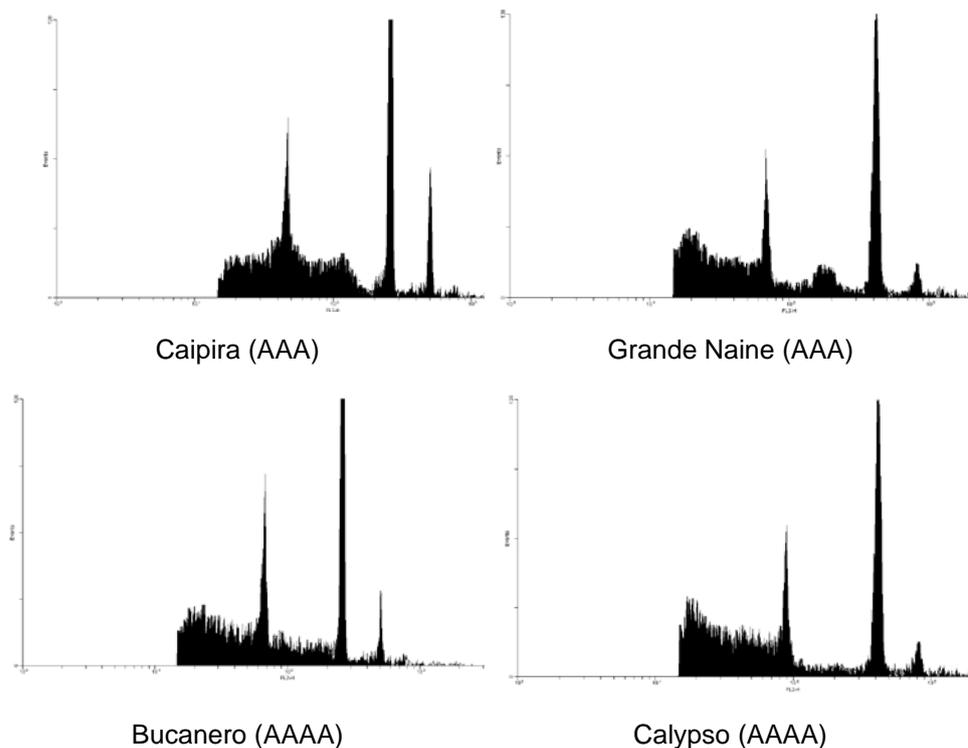


Figura 1 - Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo em *Musa acuminata* Colla. O pico maior à esquerda de cada histograma corresponde ao G1 das amostras dos diploides (NBA e Lidi), triploides (Caipira e Grande Naine) e os tetraploides (Bucanero e Calypso) e os picos à direita ao padrão de referência (*Pisum sativum*).

No presente estudo, assim como no de Madail (2011) foi utilizado como padrão interno a ervilha (*Pisum sativum*), que possui um conteúdo de 2 C de DNA de 9,09 pg. Este padrão foi escolhido por possuir um conteúdo de DNA cujo valor situa-se no meio do valor médio para a maioria dos conteúdos de DNA vegetal, podendo, desta forma, ser utilizado para avaliar tanto plantas com um pequeno genoma quanto aquelas com um genoma grande.

Os coeficientes de variação (CV) encontrados para os picos G1 variaram de 0,61 a 1,15 % (Tabela 1), caracterizando um excelente resultado, inferior ao encontrado em trabalhos bastante citados com bananeira, como o de Dolezel et al. (1994). Houve diferença entre os CV's dos genótipos de diferentes ploidias, no entanto, todos foram muito inferiores ao máximo aceitável. Os índices de DNA para os diploides Calcutta e NBA foram de 0,96 pg. As variedades, Grande Naine e Caipira, que são triploides, apresentaram 1,48 pg e 1,63 pg de DNA, respectivamente, formando dois grupos diferentes (**b** e **c**), ambos com diferença significativa do agrupamento dos diploides, que se encontram no grupamento **a**. A 'Caipira' apresentou tamanho de genoma ligeiramente maior que a Grande Naine, embora ambas sejam triploides. Os tetraploides Calypso (1,90 pg) e Bucanero (2,26 pg), também formaram dois grupos diferentes com os valores mais altos de DNA. Os índices

de DNA encontrados para os diploides foram os menores, para os triploides intermediários e nos tetraploides foram observados os maiores índices. A diferença observada na quantidade de DNA de indivíduos de mesma ploidia, como em Grande Naine e Caipira, pode ser devida à origem diferentes das variedades, como observado por Dolezel et al. (1994), existe variação de quantidade de material genético no genoma A.

Tabela 1 - Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para acessos de bananeira (*Musa acuminata*) com diferentes níveis de ploidia.

Variedade	Genoma	Índice de DNA (pg)	CV
Calcutta	AA	0,96 a*	0,84 b
NBA	AA	0,96 a	1,15 b
Grande Naine	AAA	1,48 b	0,61 a
Caipira	AAA	1,63 c	1,01 b
Calypso	AAAA	1,90 d	0,64 a
Bucanero	AAAA	2,26 e	0,96 b
CV%		3,88	27,90

*Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Os genótipos diploides Calcutta e NBA possuem os menores genomas, os triploides Grande Naine e Caipira apresentam genoma intermediário e os tetraploides Calypso e Bucanero têm os maiores genomas, confirmando a relação esperada entre conteúdo de DNA e nível de ploidia.

REFERÊNCIAS

- DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVÁK, F. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *Musa balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, 1994.
- MADAIL, R. H. **Descritores morfológicos e conteúdo de DNA na caracterização de acessos de bananeira**. 2011. 104p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- VILLA, V. B. **Análise citomorfoanatômica e eletroférica de híbridos de Solanum tuberosum L. X. (*Solanum Tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt)**. 1995. 76p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.