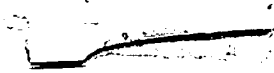


**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIS  
EM BANANEIRAS 'PRATA ANÃ', UTILIZANDO  
TÉCNICAS MOLECULARES E CITOGENÉTICAS**

**NILSON CÉSAR CASTANHEIRA GUIMARÃES**

**2005**



**NILSON CÉSAR CASTANHEIRA GUIMARÃES**

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIIS EM  
BANANEIRAS 'PRATA ANÃ', UTILIZANDO TÉCNICAS  
MOLECULARES E CITOGENÉTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador  
Prof. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Guimarães, Nilson César Castanheira

Identificação de variantes somaclonais em bananeiras 'Prata Anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas / Nilson César Castanheira Guimarães. -- Lavras : UFLA, 2005.

50 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Banana Prata Anã. 2. Muda. 3. Micropropagação. 4. Marcador molecular. 5. Citogenética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.77235

**NILSON CÉSAR CASTANHEIRA GUIMARÃES**

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIS EM  
BANANEIRAS 'PRATA ANÃ', UTILIZANDO TÉCNICAS  
MOLECULARES E CITOGENÉTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica/Agrobioquímica, para a obtenção do título de "Mestre".

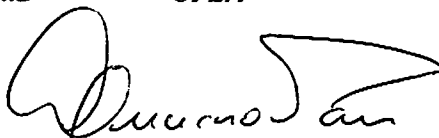
APROVADA em 4 de março de 2005.

Edilson Paiva, PhD

EMBRAPA/ CNPMS

Antônio Chalfun Jr., PhD

UFLA



Prof. Luciano Vilela Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

STATE OF TEXAS

County of ...

Know all men by these presents that ...

Witness my hand and seal this ... day of ... 19...

Notary Public in and for the State of Texas

My commission expires ...

ATTEST

My commission expires ...



Notary Public in and for the State of Texas

ATTEST

Notary Public in and for the State of Texas

Aos meus pais, Renato e Heloisa, os quais me proporcionaram sempre uma educação excelente e por terem me fornecido todas as condições para me formar homem íntegro e honesto,

**OFEREÇO.**

À minha esposa, Leísa, pelo carinho e pelo companheirismo, e por sempre estar ao meu lado e com sua presença em cada dia me fazer um ser humano melhor,

**DEDICO.**

... ..

...

... ..

...



## AGRADECIMENTOS

Ao criador.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela confiança e pela oportunidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e amigo Luciano Vilela Paiva, pela valiosa orientação, confiança, amizade e oportunidade concedida. Desde a graduação, tem sido para mim um modelo de profissionalismo e competência.

Ao professor Custódio Donizete dos Santos, pela amizade e disponibilidade em todos os momentos.

Ao pesquisador Dr. Antônio Chalfun Júnior, pelas opiniões e conselhos na condução deste trabalho e, sobretudo, pela amizade.

Ao pesquisador Dr. Edilson Paiva, pelas sugestões e pela idéia original que gerou este projeto.

A Multiplanta Tecnologia Vegetal, na pessoa do Dr. Marcos Paiva, pela parceria e pelo auxílio em todos os momentos que foram necessários.

Ao professor Renato Paiva, pela amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao amigo Pedro Radi Belicuas, pela ajuda na cessão de materiais importantes para a revisão deste trabalho e pela grande amizade, além de ter se mostrado um esportista digno em todas as derrotas que sofreu na quadra de tênis.

À estudante Paula Pereira Torga, pela contribuição nas análises citogenéticas e pela amizade construída nos últimos três anos.

Aos professores João Bosco dos Santos, Édila Vilela Resende Von Pinho e Dulcinéia de Carvalho, pelo fornecimento de reagentes, quando necessário.

Ao professor Carlos Roberto de Carvalho, pelo auxílio nas análises de citometria de fluxo.

Aos colegas do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Anderson, Daniela, Eliane, Ester, Juliana Érika, Maiana, Magnólia, Rodrigo, Sanzió e Sebastião Márcio.

Aos colegas do laboratório de bioquímica do DQI/UFLA, Xulita, Lucília, Daniela e Fernanda.

Aos meus irmãos, Renata e Gabriel 'Midi', pela amizade e amor.

Aos familiares e amigos Adriano 'Cabeça', Anseclever, Lú, Marina, Tia Nilcinha, Ronaldo, Pedro, Bruno, Tio Rubinho, Tia Zilda, Elisa, Aurea, Alex, Dona Hilda, Tio Edilson 'Jaburu', Andréa, Kenny, Kelton, Gislaine, José Heitor, Mário, Beth, Fernanda, Nelzy, Rogério, Flávio 'Leythe', Pauliani, Túlio, Oliver, Tati, Nina, Antônio 'Parede', Tatiana, Tullio, Igor 'Elói', Fábio, Tiago, Lucas e Juliano 'Codorna', pela convivência, fator absolutamente imprescindível para o sucesso.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	04
2.1 Bananeira: botânica, origem e distribuição geográfica .....	04
2.1.1 Cultivar Prata Anã .....	05
2.2 Produção de mudas de bananeira por micropropagação .....	06
2.3 Variação somaclonal em bananeiras .....	07
2.4 Utilização de marcadores moleculares na identificação de variantes somaclonais .....	09
2.4.1 Uso de RAPD na identificação de variantes somaclonais .....	11
2.4.2 Uso de SSR na identificação de variantes somaclonais .....	13
2.5 Contagem cromossômica .....	14
2.6 Citometria de fluxo .....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1 Identificação e coleta das plantas variantes .....	19
3.2 Extração e quantificação do DNA genômico .....	20
3.3 Amplificação via RAPD .....	22
3.4 Amplificação via SSR .....	23
3.5 Preparo de lâminas e contagem cromossômica .....	26
3.6 Citometria de fluxo .....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1 Análise morfológica das plantas variantes .....	29
4.2 Identificação de variantes somaclonais com marcadores RAPD .....	30

<b>4.3 Identificação de variantes somaclonais com marcadores</b>	
SSR.....	37
<b>4.4 Preparo de lâminas e contagem cromossômica.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Citometria de fluxo .....</b>	<b>41</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>

## RESUMO

GUIMARÃES, N. C. C. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras 'Prata Anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. 2005. 50 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Variação somaclonal é uma variação fenotípica de origem genética, ou seja, uma variação cromossômica que se torna herdável nas gerações seguintes, ou epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material sofre quando entra na cultura *in vitro*. Um problema específico envolvendo a variação somaclonal em bananeiras 'Prata Anã' foi observado em Andradas, Minas Gerais, em plantas oriundas de micropropagação. As plantas variantes apresentam porte mais alto que as 'Prata Anã' normais, cachos de valor comercial reduzido, folhas lanceoladas e pseudocaule mais fino. O porte destas plantas lembra o de uma bananeira da cultivar Prata. Uma das possibilidades é a de que as plantas 'Prata Anã' estejam retornando ao genótipo original 'Prata', uma vez que surgiram a partir de uma mutação desta cultivar. Esta variação tem ocorrido em escala maior do que o permitido, trazendo transtorno aos produtores de mudas e bananicultores. A maior dificuldade na separação dos indivíduos normais e variantes é que os caracteres morfológicos que são inerentes a este tipo de variação só se tornam evidentes quando a planta está adulta, o que impossibilita a eliminação dos indivíduos variantes ainda em viveiro. Com o objetivo de identificar, ainda em viveiro, aqueles indivíduos variantes somaclonais, técnicas moleculares (RAPD e SSR) e citogenéticas (contagem cromossômica e citometria de fluxo) foram utilizadas. Plantas adultas de bananeira 'prata anã' normais e variantes, e plantas de bananeira 'Prata' foram utilizadas nas análises. Foram utilizados 103 *primers* RAPD, 11 combinações de dois *primers* RAPD e 33 pares de *primers* SSR na tentativa de encontrar marcadores polimórficos que distinguíssem os indivíduos normais dos variantes, além de distinguir bananeiras 'Prata Anã' de 'Prata'. O primer OPW-08 gerou um fragmento polimórfico que distinguiu uma planta variante de todas as demais, provando que a variação não ocorre de maneira uniforme no genoma dos indivíduos variantes e que não há um retorno à cultivar Prata. As análises com marcadores SSR e a contagem cromossômica não possibilitaram a distinção dos indivíduos variantes nem a separação das cultivares Prata e Prata Anã. As análises de citometria de fluxo evidenciaram a grande instabilidade

---

\* Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Dr. Custódio Donizete dos Santos – UFLA (Co-orientador), Edilson Paiva, PhD – EMBRAPA/CNPMS, Antônio Chalfun Júnior, PhD – UFLA.

cromossômica das bananeiras, porém, não foram eficientes na identificação de variantes somaclonais.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, N. C. C. **Identification of somaclonal variants in banana 'prata anã', using molecular and cytogenetic techniques.** 2005. 50p. Dissertation (Master in Agrochemistry and Agrobiochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Somaclonal variation is a phenotypical variation of genetic origin, that is, a chromosomal variation that becomes inheritable in the following generations, or epigenetic, which is a transitory variation due to the physiological stress suffered when the material is submitted to the *in vitro* cultivation. A specific problem involving somaclonal variation in banana 'Prata Anã' was observed in Andradas, Minas Gerais, in plants originated from tissue culture. Banana 'Prata Anã' somaclonal variants are higher than normal plants, have non-marketable fruits, narrower leaves and thinner pseudo-stem. The height of these plants resembles the banana 'Prata', being the return of the 'Prata Anã' cultivar to the original 'Prata' genotype one of possibilities, since 'Prata Anã' is derived from a mutation in that cultivar. This variation occurs in a degree beyond the permitted level, being a main problem for banana fruits and seedlings producers. The main difficulty in the distinction of the normal and variant plants is the fact that the morphological characters that allow the separation of these two types are only visible and distinguishable when the plants are adult, what makes impossible the elimination of the variant seedlings at the nursery. For the early distinction of the variants, molecular (RAPD and SSR) and cytogenetic (chromosome counting and flow cytometry) techniques were used. Adult plants of banana 'Prata Anã' (normal and variants) and 'Prata' were utilized in the analyses. 103 RAPD primers, 11 combinations of two RAPD primers, and 33 pairs of SSR primers were used in the attempt to find polymorphic markers that distinguished the normal plants from the variants, and the 'Prata' from 'Prata Anã'. Primer OPW-08 generated a polymorphic fragment that distinguished a variant from all the other plants, proving that the variation does not occur uniformly in the genome of all the variants, and that there is no return to 'Prata' cultivar. Analyses with SSR markers and chromosome counting were not efficient either separating normal from variants or 'Prata' from 'Prata

---

\* Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Dr. Custódio Donizete dos Santos – UFLA (Co-Adviser), Edilson Paiva, PhD – EMBRAPA/ CNPMS, Dr. Antônio Chalfun Júnior, PhD – UFLA.

Anã. Flow citometry analyses showed the evident instability in the banana genome in terms of number of chromosomes, however were not efficient in identifying the somaclonal variants.



# 1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa spp.*) é uma das frutas mais consumidas no mundo, tendo grande importância econômica e social na maioria dos países tropicais. No Brasil, a banana ocupa o segundo lugar entre as frutíferas produzidas (5,77 milhões de toneladas/ano), apenas atrás dos cítricos; entretanto, é a mais consumida, com 34,5 kg/habitante/ano. Apesar da expansão de cultivos comerciais que utilizam tecnologia mais evoluída, alguns produtores ainda utilizam o cultivo tradicional, baseado, na maioria das vezes, em mão-de-obra familiar. Este é um dos motivos da baixa produtividade média do Brasil (1.127 cachos/ha) e também da baixa competitividade no mercado mundial, uma vez que, embora o país seja o segundo maior produtor, possui apenas 12% de participação na produção mundial, o que representa apenas 0,88% do total exportado no mundo (Alves, 1999; Silva, 2001).

As bananeiras são, normalmente, propagadas vegetativamente, por meio de mudas desenvolvidas a partir de gemas de seu rizoma. Para que a implantação de um bananal seja bem sucedida, é fundamental a seleção de mudas de boa qualidade. O ideal é que estas mudas sejam oriundas de viveiros que estejam próximos ao local de preparo do material de plantio. Ainda assim, a propagação convencional da bananeira tem vários inconvenientes, pois, uma vez que partes da planta-mãe são utilizadas sem nenhum tratamento e grandes extensões de tecidos são necessárias, o risco de contaminação do novo bananal por doenças e pragas é alto. Hoje, as técnicas de micropropagação são aquelas que fornecem resultados mais seguros ao produtor, por apresentarem um material livre de doenças e, normalmente, de genótipos selecionados. Dentre as vantagens da micropropagação têm-se a rápida multiplicação das variedades, a eliminação de

doenças, a conservação de germoplasma, a possibilidade de intercâmbio de germoplasmas de diferentes regiões e a seleção *in vitro*.

Entretanto, a micropropagação ainda apresenta algumas limitações, das quais a mais importante é a variação somaclonal. A variação somaclonal consiste no aparecimento de plantas anormais em função do cultivo intensivo *in vitro*, as quais não correspondem geneticamente à planta-mãe. Este problema ocorre em bananeiras em uma escala razoável, sendo necessário que medidas sejam tomadas de modo a identificar estes variantes antes que sejam levados ao campo, uma vez que podem causar sérios prejuízos ao produtor e também à empresa que comercializa as mudas.

A origem da variação somaclonal está no genoma da bananeira que pode tanto sofrer mutações, deleções ou inserções, como pode haver duplicações ou quebras cromossômicas que deverão ou não afetar o fenótipo da planta. Uma possibilidade de se identificar estes indivíduos variantes é o uso de marcadores moleculares e técnicas de citogenética, que possibilitam a distinção em duas frentes, tanto molecular quanto física.

Entre os marcadores moleculares utilizados na identificação de variantes somaclonais destacam-se os marcadores RAPD (sigla para o inglês *Random Amplified polymorphic DNA*) e SSR (sigla para o inglês *Simple Sequence Repeat*), que são marcadores baseados em PCR (sigla para o inglês *Polymerase Chain Reaction*) e por meio dos quais o DNA é diretamente analisado. Estes marcadores são especialmente eficientes para detectar mudanças na seqüência de nucleotídeos, ou seja, inversões, deleções e inserções.

Considerando a abordagem citogenética, duas técnicas podem ser utilizadas para que seja observada qualquer alteração em termos de número ou forma dos cromossomos. Uma técnica é a observação direta dos cromossomos em microscópio óptico, a qual permite a identificação de aberrações numéricas e morfológicas. A outra técnica é a citometria de fluxo, que permite uma

quantificação de DNA relativa, sendo extremamente precisa e eficiente na separação de indivíduos de ploidia normal daqueles que porventura tenham um número alterado de cromossomos.

Um problema específico envolvendo a variação somaclonal em bananeiras 'Prata Anã' foi observado em Andradas, Minas Gerais, em plantas oriundas de micropropagação. As plantas variantes apresentam porte mais alto que as 'Prata Anã' normais, cachos de valor comercial reduzido, folhas lanceoladas e pseudocaule mais fino. O porte destas plantas lembra o de uma bananeira da cultivar Prata e uma das possibilidades é a de que as plantas 'prata anã' estejam retornando ao genótipo original 'Prata', uma vez que surgiram a partir de uma mutação desta cultivar. Houve um esforço conjunto da empresa Multiplanta Biotecnologia Vegetal, da EMBRAPA/CNPMS e da UFLA/LCBM, visando desenvolver uma metodologia capaz de identificar, em termos moleculares e citogenéticos, os indivíduos variantes, para que se torne possível uma detecção precoce destas mudas anormais e que elas possam ser eliminadas antes do envio para produtores de banana, o que eliminaria prejuízos a produtores de mudas e bananicultores.

A oportunidade de realizar este trabalho surgiu deste projeto. As técnicas de marcadores moleculares RAPD e SSR, assim como as técnicas citogenéticas de contagem de cromossomos em microscópio óptico e citometria de fluxo, foram utilizadas, objetivando a identificação destes variantes somaclonais de bananeira 'Prata Anã'.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Bananeira: origem, botânica, evolução e distribuição geográfica

O principal centro de origem da maioria das cultivares de banana é o Continente Asiático, porém, alguns centros secundários, como algumas ilhas do pacífico e África, existem. Dentre estes centros secundários, destaca-se a África Ocidental, pela grande variabilidade genética existente (Silva, 2001).

As bananeiras produtoras de frutos comestíveis são plantas monocotiledôneas, pertencentes à ordem *Scitaminea*, na qual se incluem a subfamília *Musoideae* e o gênero *Musa*. A classificação que predomina há vários anos é a proposta por Simmonds & Shepherd (1955), baseada no número de cromossomos, ou seja, grupo com 10 e 11 cromossomos, podendo ser diplóide, triplóide ou tetraplóide. Por meio de cruzamentos experimentais pode-se constatar que as bananeiras triplóides originaram-se a partir de hibridações entre diplóides, bem como os tetraplóides se originaram do cruzamento entre triplóides e diplóides (Cheesman, 1932a, 1932b; Dodds, 1943). A distinção entre os grupos é feita com base em características morfológicas das plantas, além da contagem do número de cromossomos. O grupo de bananeiras que possui o número básico de 11 cromossomos divide-se em duas espécies: *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla, além dos híbridos entre as duas. Na evolução das bananeiras comestíveis participaram, principalmente, as espécies diplóides selvagens *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla, de modo que cada cultivar deve possuir combinações variadas de genomas completos dessas espécies parentais. Esses genomas são designados pelas letras A (*Musa acuminata*) e B (*Musa balbisiana*), de cujas combinações resultam os grupos AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (Simmonds & Shepherd, 1955).

Existe no Brasil um grande número de genótipos de bananeiras, além de um grande número de sinonímias, o que dificulta em muito a identificação das mesmas. As cultivares podem ser divididas em vários grupos, considerando-se, por exemplo, o número de cromossomos, a forma de utilização, o porte da planta, entre outros.

Como exemplo de cultivares, segundo a sua ploidia, têm-se (Silva, 2001):

- Grupo AA: 'Ouro';
- Grupo AAA: 'Caru', 'São Tomé', 'Nanica', 'Nanicão';
- Grupo AAB: 'Prata', 'Maçã', 'Mysore', 'Terra', 'Prata Anã';
- Grupo ABB: 'Figo';
- Grupo AAAB: 'Ouro da Mata'.

A bananeira é uma planta tipicamente tropical, exigindo calor constante e elevada umidade para seu bom desenvolvimento. Essas condições favoráveis são registradas na faixa compreendida entre os paralelos de 30° de Latitude Norte e Sul, nas regiões onde a temperatura se situa entre os limites de 10°C e 40°C. Entretanto, existe a possibilidade de seu cultivo em latitudes acima de 30°C (até 45°C), desde que a temperatura seja adequada (Alves, 1999; INIBAP, 1985; Moreira, 1987).

### **2.1.1 Cultivar Prata Anã**

A cultivar Prata Anã apresenta pseudocaule vigoroso de cor verde-claro, brilhante, com poucas manchas escuras próximas à roseta foliar. O porte varia de 2,0 a 3,5 m e o diâmetro do pseudocaule é de, aproximadamente, 50 cm. A coloração do pecíolo e das nervuras principais é também verde-claro-brilhante. A roseta é compacta, as pencas são mais juntas e as bananas mais curtas e roliças que as da 'Prata'. As pontas dos frutos têm formato de gargalo e a ráquis é coberta por flores masculinas e por brácteas, menos nos primeiros 10-15 cm. O

“coração” é bastante desenvolvido e a cultivar é tolerante ao frio. Devido ao grande vigor da planta, dispensa o uso de escoramento. Apresenta bom potencial de produtividade sob condições de irrigação, podendo atingir 30-35 t/ha/ciclo (Alves, 1999).

## 2.2 Produção de mudas de bananeira por micropropagação

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de banana do mundo (Arias et al., 2003). Nos últimos anos, tem sido verificado um aumento considerável na demanda de mudas de bananeira de alta qualidade, visando à renovação de bananais de regiões tradicionalmente produtoras, como litoral norte e sul de Santa Catarina, Registro (SP) e Janaúba (MG), e a ocupação de novas áreas, como o oeste paulista, Jaíba (MG) e o pólo frutícola Mossoró-Açu, (RN).

A produção comercial de mudas de bananeira por meio de cultura *in vitro* de ápices caulinares tem sido empregada com sucesso em países como Israel, França, Costa Rica, Cuba, Austrália, Taiwan e Brasil, possibilitando a produção de mudas superiores e praticamente livres de pragas e doenças, como o mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), moko (*Pseudomonas solanacearum*), nematóide (*Radopholus similis*) e a broca do rizoma (*Cosmopolites sordidus*) (Souza, 1994). Segundo Krikorian & Cronauer (1983), o desenvolvimento dessas técnicas é importante por permitir a rápida multiplicação de novos clones de cultivares selecionadas e de híbridos, obtidos a partir de programas de melhoramento genético. Mudas micropropagadas produzem 30% mais do que mudas obtidas convencionalmente (Sanada, 1993), permitem colheita sincronizada nos primeiros ciclos da cultura, graças à homogeneidade das mudas, e possibilitam maior vigor das plantas, maior número de dedos por penca, maior número de pencas por cacho, menor

variabilidade no tamanho e forma dos frutos, e menor incidência de nematóides em áreas contaminadas (Orellana et al., 1991; Quynh & Uyen, 1993).

Uma série de trabalhos foi desenvolvida visando estabelecer protocolos seguros para a multiplicação *in vitro* de cultivares de bananeira (Angarita & Perea, 1991; Banerjee & De Langhe, 1985; Cronauer & Krikorian, 1984; Hwang et al., 1984; Sandoval et al., 1991; Wong, 1986). Esses trabalhos demonstraram que, para cada genótipo, devem ser realizadas modificações nos protocolos de micropropagação quanto ao tipo de explante, concentração de componentes do meio de cultura, condições físicas do ambiente e métodos distintos para o enraizamento e aclimação. Segundo Grattapaglia & Machado (1990), a eficiência de um protocolo de micropropagação pode ser avaliada, principalmente, pela taxa média de multiplicação ao longo dos subcultivos, pelo número final de mudas obtidas e pela porcentagem de plantas que conservem as características genéticas iniciais.

### **2.3 Variação somaclonal em bananeiras**

Variabilidade genética tem sido observada em várias plantas durante a cultura de tecidos. Este fenômeno é normalmente chamado de variação somaclonal (Karp, 1991; Larkin & Scowcroft, 1981; Meins, 1983), que é uma variação fenotípica de origem genética, ou seja, uma variação cromossômica que se torna herdável nas gerações seguintes, ou de epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material sofre quando entra na cultura *in vitro* (Illg, 1990). Estas variações existem entre somaclones (soma = vegetativo; clone = cópia idêntica). Variação somaclonal resulta tanto de variação genética preexistente dentro do explante quanto de variação induzida durante a fase de cultura de tecidos (Evans et al., 1984). Segundo Vuylsteke & Swennen (1990), as variações detectadas *in vitro* não diferem basicamente das variações que ocorrem naturalmente, sendo a frequência, no entanto, muito

superior, principalmente devido ao grande número de plantas propagadas por cultura de tecidos que não são identificadas como variantes ainda em viveiro. Variações em somaclones podem ocorrer em termos de cariótipo (aneuploidia ou poliploidia), alterações na sequência de DNA pela presença de elementos móveis, amplificação e depressão gênica, mudanças associadas com rearranjos cromossômicos (translocações, deleções e inserções), “crossing-over” somático e permuta de cromátides irmãs (Larkin & Scowcroft, 1981; Krikorian, 1989; Illg, 1990; Tabares et al., 1991). Estas alterações se refletem em mudanças no padrão isoenzimático, precocidade, crescimento, produtividade, qualidade, pigmentação, resistência a doenças e a condições climáticas, nas mais diferentes espécies (Patil & Navale, 2000).

Banana é uma espécie que produz variantes somaclonais (Krikorian et al., 1993), porém, apenas aquelas plantas que apresentam o mesmo tipo de variação em brotos laterais são também consideradas ‘variantes’ (Rodrigues et al., 1998). A maioria dos somaclones apresenta frutos com qualidade inferior aos do clone parental, além de serem plantas menos vigorosas. Vários tipos de variantes com diferentes tipos de morfologia são reportados em banana (Israeli et al., 1991; Vidhya & Ashalatha, 2002; Uma et al., 2002).

Uma das características marcantes que fazem com que a variação somaclonal seja um fator importante na multiplicação *in vitro* da bananeira é a marcante instabilidade numérica de genótipos do gênero *Musa*. Isto foi observado em indivíduos que deveriam ser exatos triploides ou tetraploides, mas, anormalidades morfológicas indicaram uma irregularidade mitótica. Ocasionalmente, uma planta anormal poderia reverter a um aspecto normal. Shepherd & dos Santos (1996) reportaram frequências variáveis de cromossomos em contagens cromossômicas de células de bananeira, especialmente naqueles cromossomos de tamanho muito reduzido (‘minicromossomos’), os quais poderiam ser interpretados como produtos de



quebras cromossômicas. Qualquer que seja a abordagem, é provável que nenhuma banana triploide seja totalmente estável em seu cariótipo somático.

O aparecimento dos tipos variantes durante o processo de multiplicação *in vitro* é um fator importante na propagação em larga escala de bananeiras. Segundo Hwang & Tang (1996), em qualquer programa de micropropagação é normal que exista de 3% a 5% de variação somaclonal; entretanto, em bananas, até 10% de variação são permitidos (como praticado por setores de comercialização) devido à constituição flexível do genoma desta cultura (Smith, 1988; Cote et al., 1993). No gênero *Musa*, a variação somaclonal, em termos fenotípicos, tem sido observada, em média, em 6% (Martinez et al., 1998). Hwang & Tang (2000) reportaram a ocorrência de 6% a 38% de tipos variantes em plântulas oriundas de cultura de tecidos em cultivares Cavendish e 29 casos de variação somaclonal em diversos tipos de bananas, com a incidência variando de 0% a 69,1%.

#### **2.4 Utilização de marcadores moleculares na identificação de variantes somaclonais**

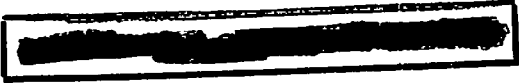
Varição somaclonal pode ocorrer para vários caracteres morfológicos, fisiológicos, de resistência a doenças, entre outros, bem como para marcadores genéticos moleculares e bioquímicos (Karp, 1995; Larkin & Scowcroft, 1981; Rani & Raina, 2000). Até meados da década de 1960, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência clorofítica, cor de pétala ou morfologia foliar. Marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Como variações facilmente detectáveis ocorrem com frequência muito inferior que variações imperceptíveis

(em termos de DNA) (Evans et al., 1984), a ausência de variações visíveis não significa a ausência de qualquer variação na progênie micropropagada. Marcadores isoenzimáticos podem ser utilizados para examinar a variação somaclonal crítica, porém, estes marcadores são limitados, tanto pelo baixo número e quantidade de polimorfismos quanto pelas suas expressões reguladas ao longo do desenvolvimento da planta. Marcadores de DNA são um meio mais atrativo de se examinar a variação somaclonal, uma vez que são mais informativos.

O advento das técnicas possibilitando detectar polimorfismos no DNA tem gerado um grande número de marcadores moleculares para análises genéticas dos indivíduos (Jeffreys et al., 1985). Os marcadores de DNA apresentam ampla capacidade de cobertura do genoma, o que possibilita uma detecção bastante confiável de indivíduos possivelmente variantes.

O primeiro marcador de DNA utilizado em plantas foi o *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Grodzicker et al., 1974). O polimorfismo é obtido de diferenças no tamanho molecular dos fragmentos de DNA genômico digeridos com enzimas de restrição e observado por hibridação destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A base genética do polimorfismo obtido pelo RFLP resulta de mutações nestes sítios de restrição, tais como inserções, deleções e substituições de bases entre estes sítios (Beckman & Soller, 1986).

Mais recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares. Aliadas às técnicas de clonagem e seqüenciamento de DNA, estas metodologias têm possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de



genomas eucariotos, além de avanços significativos nas áreas da genética e da biologia molecular.

#### 2.4.1 Uso de RAPD na identificação de variantes somaclonais

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar “primers” mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando, assim, a necessidade do conhecimento prévio de seqüência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos EUA. Willians et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), ou DNA polimórfico amplificado ao acaso. Welsh e McClelland (1990), por sua vez, propuseram a denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a *Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction* (AP-PCR), uma vez que os *primers* possuem seqüência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos do genoma.

RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR com duas características distintas:

- (1) utiliza um *primer* único e pequeno (cerca de 10 nucleotídeos) em vez de um par de *primers*;
- (2) o *primer* único tem seqüência arbitrária e, portanto, sua seqüência alvo é desconhecida.

Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase.

Existem evidências de que diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar não complementaridade do *primer* com o sítio de iniciação (*priming site*) e, assim, impedir a amplificação de um segmento (Willians et al., 1990). Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente.

O uso conjunto de dois *primers* arbitrários pode ser utilizado para que a quantidade de polimorfismo genético seja aumentada (Welsh & McClelland, 1991). Espera-se, desse modo, um aumento de quatro vezes mais bandas a partir de uma reação com dois *primers* do que duas reações separadas.

Uma característica importante destes marcadores é o fato de serem marcadores dominantes. Ao se observar uma banda no gel não é possível distinguir se aquele segmento é originado de uma ou duas cópias da sequência amplificada. A técnica RAPD detecta, assim, um alelo por loco. A ausência de banda representa todos os outros alelos daquele loco que, por um motivo ou outro, não puderam ser amplificados.

O uso de marcadores RAPD na identificação de indivíduos variantes somaclonais oriundos de micropropagação é bastante difundido, tendo, na maioria dos casos, as mudanças em bandas de somaclones sido reportadas em monocotiledôneas, como *Lolium* (Wang et al., 1993) e *Triticum* (Brown et al., 1993). Apesar disso, vários trabalhos com regenerantes de plantas dicotiledôneas, como beterraba (Munthali et al., 1996) e pêssigo (Hashmi et al., 1997) ou mesmo gimnospermas, como *Picea abies* (L.) Karst. (Fourré et al., 1997), reportam a eficiência do uso deste marcador na identificação de variantes.

Em bananas da cultivar Cavendish (*Musa* spp. AAA), 66 *primers* aleatórios de RAPD foram utilizados no escrutínio de uma população de plantas normais e variantes anãs, tendo 19 *primers* revelado polimorfismo entre as plantas anãs e as normais (Damasco et al., 1996).

#### 2.4.2 Uso de SSR na identificação de variantes somaclonais

Os microssatélites são seqüências de um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em *tandem*, ao longo da molécula de DNA, amplamente distribuídas nos genomas eucariotos, que são flanqueadas por regiões conservadas (Rafalski et al., 1996). Essas seqüências flanqueadoras são amplamente conservadas dentro e entre diferentes espécies do mesmo gênero, possibilitando sua transferência entre espécies.

A identificação dos microssatélites é um processo trabalhoso e de elevado custo, envolvendo a construção de bibliotecas genômicas, seleção de clones contendo os microssatélites, seqüenciamento em larga escala desses clones, desenho dos *primers* específicos e sua confirmação por PCR (Rafalski et al., 1996).

Os locos de microssatélite são altamente variáveis, multialélicos e com um elevado conteúdo informativo de polimorfismo. Os diversos alelos encontrados em locos SSR são o resultado de uma variação nos números de elementos simples repetidos nas ilhas de microssatélite; assim, cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Esses marcadores apresentam um elevado poder discriminatório e, normalmente, poucos locos garantem a completa diferenciação dos genótipos de interesse.

Belicuas (2004) utilizou *primers* microssatélite na diferenciação de indivíduos haplóides em milho. Esta aplicação dos marcadores microssatélite é

possível devido à estabilidade da herança mendeliana e da co-dominância deste marcador.

Marcadores microsatélite são também eficientes na detecção de variação somaclonal. Em *Populus tremuloides*, dez pares de *primers* SSR foram utilizados visando à detecção de variantes somaclonais oriundos da cultura *in vitro*. Dois *primers* foram eficientes na separação dos indivíduos variantes daqueles normais. Apesar disso, nenhuma diferença morfológica pode ser detectada nas plântulas até 6 meses de idade, o que indica que a avaliação visual pode não ser sensível o bastante para identificar os indivíduos variantes (Rahman & Rajora, 2001):

## 2.5 Contagem cromossômica

Nos estudos relacionados à determinação do número de cromossomos da bananeira, foi determinado que, no gênero *Musa*, existem dois números básicos de cromossomos, 10 e 11 (Cheesman, 1948). De acordo com Shepherd (1984), os cromossomos da bananeira são pequenos e não são visíveis, pelo menos separadamente, numa célula que não esteja em divisão mitótica. Apresentam-se como filamentos compridos e finos dentro do núcleo, porém, no início da divisão (prófase) eles se contraem numa espiral compacta ainda dentro da membrana externa do núcleo, estando aptos a receber alguns corantes especiais. Nessa fase, a contagem precisa é praticamente impossível. Os estudos de cariótipo de bananeira têm sido bastante dificultados em função de os cromossomos serem bastante pequenos, sendo impossível, na prática, uma caracterização estrutural.

Após o rompimento da membrana nuclear, na metáfase da mitose normal, os cromossomos são mais receptivos aos corantes, distribuindo-se no equador de um fuso invisível. Rapidamente, cada cromossomo divide-se longitudinalmente, migrando para os pólos opostos ao fuso (anáfase), para

reconstruir dois novos núcleos com o mesmo número de cromossomos da célula original. Citogeneticistas atuais utilizam várias substâncias para paralisar as metáfases, eliminando os fusos e deixando os cromossomos ainda mais contraídos e dispersos no citoplasma (Carvalho, 1995). As substâncias principais usadas são o p-diclorobenzol, monobromonaftaleno, 8-oxiquinolína e colchicina.

A colchicina é um inibidor mitótico muito utilizado para a indução de duplicação cromossômica e em pré-tratamentos para a confecção de lâminas de mitose. Ela se liga à tubulina e inibe a formação dos microtúbulos que compõem as fibras do fuso, não havendo, assim, a migração dos cromossomos para os pólos da célula, permitindo que esses cromossomos permaneçam na forma mais condensada na placa metafásica da célula, onde a visualização ao microscópio ótico é favorecida. Para que essa visualização ocorra, é necessário diferenciar os cromossomos do restante da célula. Para tanto, um método muito utilizado é o de Feulgen, no qual o DNA reage com uma solução de ácido clorídrico, que retira as bases púricas e forma agrupamentos aldeídos na desoxirribose e na presença de fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso, conhecido como reativo de Schiff, ele combina com os radicais aldeído, formando um composto vermelho insolúvel. Esse método de coloração possui uma proporcionalidade entre a intensidade da coloração e a quantidade de DNA presente na célula.

Uma das técnicas mais bem sucedidas na contagem de cromossomos de bananeira é a secagem-ao-ar com maceração enzimática e dissociação celular, que permite uma visualização em profundidade e grande nitidez (Carvalho & Saraiva, 1993; Carvalho, 1995).

## **2.6 Citometria de fluxo**

O desenvolvimento da técnica de citometria de fluxo ocorreu no final na década de 1950, originalmente objetivando a contagem e análise de células sanguíneas. A imunologia celular e a hematologia foram, sem sombra de dúvida,

as duas áreas da biologia que impulsionaram o desenvolvimento da tecnologia da citometria de fluxo (Côrte-Real et al., 2002). No entanto, com a natural evolução técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como células vegetais e microbianas (Dolezel, 1997). As aplicações da citometria de fluxo em estudos com células vegetais têm aumentado bastante em laboratórios por todo o mundo (Dolezel, 1991), havendo a oportunidade de separar subpopulações de partículas celulares/subcelulares (*cell sorting*), além de análises rápidas (*real time*) do conteúdo de DNA e RNA, da expressão de transgenes e contagem de células, entre outras aplicações (Yanpaisan et al., 1999).

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão de luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida. A medição em fluxo permite análises em altas velocidades, em torno de  $10^2$  a  $10^3$  partículas por segundo, e garante que as estruturas analisadas sejam selecionadas aleatoriamente em toda a amostra. A suspensão líquida contendo as células a serem analisadas é introduzida no centro da câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente (*sheath fluid*) que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida. Por meio de um fenômeno físico designado por focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se em fluido laminar e, uma a uma, ao centro do fluxo (Dolezel, 1997). Estas partículas intersectam um feixe de iluminação bastante intenso, com origem em uma ou mais fontes de iluminação, que podem ser raios laser e ou lâmpadas de vapor de mercúrio. No momento em que estas partículas intersectam o feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotônica e ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade depende das características das partículas (Côrte-Real et al., 2002). Os fótons são posteriormente recebidos e analisados por um fotodiodo e por tubos fotomultiplicadores, que convertem e



amplificam os sinais luminosos em pulsos analógico-digitais que são processados por analisadores em vários canais. Os sinais de cada partícula acumulam-se em histogramas e são observados no monitor do aparelho.

Nos eucariotos, o crescimento e a divisão celular são processos cíclicos, sendo a mitose dividida em fases G1, S e G2. Durante a fase G1, período de crescimento celular, uma célula diplóide apresenta conteúdo de DNA celular igual a 2C, ou seja, possui duas cópias de cada cromossomo. Na fase S ocorre uma duplicação do material genético e posteriormente, na fase G2, ocorre nova fase de crescimento celular, na qual o conteúdo de DNA nuclear é 4C. A partir desta fase, a célula está pronta para dividir-se em duas células filhas (mitose), nas quais cada núcleo possuirá, novamente, o conteúdo de DNA original, 2C. Numa população de células em expansão, o número de núcleos na fase G1 é maior do que na fase G2. Dessa forma, os histogramas obtidos pelos citômetros de fluxo em uma análise de ploidia apresentam picos de maior intensidade no canal referente à fase G1 do ciclo celular do que os picos referentes à fase G2.

A quantificação do DNA de uma célula baseia-se na quantidade de fluorescência emitida pelo núcleo quando esse é corado com um fluorocromo específico para o DNA. Para essa quantificação, os núcleos devem ser isolados, pois alguns fluorocromos apresentam dificuldade de penetração na membrana citoplasmática (Loureiro & Santos, 2004). Esse procedimento elimina interferências de DNA citoplasmático e de fluorescências não específicas de moléculas como as clorofilas (Dolezel, 1991). Os corantes utilizados ligam-se especificamente e estequiometricamente ao DNA. Alguns deles ligam-se também a moléculas de RNA, portanto, para uma determinação mais precisa, é necessária a utilização de RNase no preparo da suspensão (Price & Johnston, 1996).

As medições do conteúdo de DNA nuclear não são perfeitas e apresentam variações que, geralmente, estão relacionadas com o método de

isolamento dos núcleos, com a coloração específica para o DNA e com a leitura no citômetro de fluxo (Marie & Brow, 1993). Essas variações são expressas na forma do coeficiente de variação (CV). Marie & Brow (1993) consideram que o CV é um critério muito importante na validação das medições citológicas e definem um intervalo de valores entre 1% e 2% para análises de precisão e 3% para análises de rotina.

A quantificação do nível de ploidia por citometria de fluxo é realizada pela análise da intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos corados com fluorocromos específicos para DNA. Os picos dominantes gerados nos histogramas são relativos à quantidade de DNA dos núcleos na fase G1 do ciclo celular. A estimativa do nível de ploidia é feita comparando-se os picos G1 do histograma de uma amostra com o pico de uma planta padrão com ploidia conhecida (Dolezel, 1997). A análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear é uma excelente alternativa para os métodos clássicos de contagem cromossômica. Comparativamente, a citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é mais conveniente, pois a amostra é de fácil preparação; é mais rápida, processando dezenas de amostras em um dia; não necessita de células em divisão; é um método não destrutivo e é capaz de detectar mixoploidia (Loureiro & Santos, 2004).

Belicuas (2004), trabalhando com a citometria de fluxo na identificação de indivíduos haplóides androgenéticos de milho, obteve resultados eficientes para a contagem de cromossomos, desde que um padrão de ploidia conhecida seja utilizado nas análises.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Identificação e coleta das plantas variantes

As plantas variantes somaclonais da cultivar Prata Anã foram identificadas em um bananal na cidade de Andradas, MG, segundo parâmetros morfológicos, como folhas lanceoladas, porte mais alto, folhas mais eretas e pseudocaule mais fino que o das plantas normais. As plantas variantes destoam visivelmente das plantas normais, como pode ser verificado nas Figuras 1 e 2.



FIGURA 1. Bananeira da cultivar Prata Anã variante somaclonal, em bananal no município de Andradas, MG.



FIGURA 2. Bananeira da cultivar Prata Anã variante somaclonal destoando das demais em um bananal no município de Andradas, MG.

Oito rizomas de plantas normais e variantes da cultivar Prata Anã foram coletados em um bananal próximo à empresa Multiplanta Biotecnologia Vegetal, em Andradas, MG e as mudas as quais deram origem às bananeiras foram adquiridas desta mesma empresa. Estes rizomas foram plantados em vasos com substrato (Plantimax + esterco + terra peneirada) e foram mantidos em umidade e temperatura ambiente em casa de vegetação no Setor de Paisagismo do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Quatro rizomas de plantas da cultivar Prata foram coletados no pomar da UFLA e plantados na cidade de Lavras, MG. Todos os rizomas foram irrigados até que houvesse a produção de folhas, necessárias para a extração do DNA.

### **3.2 Extração e quantificação do DNA genômico**

Para a extração do DNA, cerca de 1 g de tecido foliar fresco foi triturado em N<sub>2</sub> líquido, utilizando-se pistilo e almofariz, até que fosse obtido um pó bastante fino. Em seguida, o material foi transferido para microtubos gelados, que foram preenchidos até a metade com o pó macerado. Imediatamente, 600 µL de tampão de extração (2% CTAB (p/v), 0,1 mol/L Tris-HCl pH 8,0, 1,4 mol/L NaCl, 0,02 mol/L EDTA pH 8,0, 1% Sarcosil (p/v), 1% PVP (p/v), 0,2% β-mercaptoetanol (v/v) pré-aquecido a 65°C foram adicionados e misturados ao triturado foliar. Esta mistura foi mantida em banho-maria a 65°C, por 1 hora, com homogeneização a cada 15 minutos, tendo o cuidado de observar-se sempre o contato do tampão com o material vegetal. Após este período, a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, 1 volume (600 µL) de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e o tubo foi levemente agitado por 10 minutos. É importante uma agitação bastante leve para que não houvesse quebra do DNA, suficiente apenas para que existisse a emulsificação das fases. A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 18.000 x g, por 5 minutos, à temperatura ambiente, tendo

sido o sobrenadante (fase aquosa) transferido para um novo microtubo. A lavagem do sobrenadante com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi realizada novamente, seguindo os mesmos volumes, tempos de agitação e centrifugação. Após a segunda lavagem, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e 900  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado foram adicionados para que o DNA fosse precipitado. O microtubo foi então invertido levemente, para aumentar a precipitação e incubado por 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após este período, a solução foi centrifugada a  $18.000 \times g$  por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado por inversão; 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado foram adicionados e o tubo foi levemente girado para que o sedimento e as paredes fossem lavados. O microtubo foi centrifugado a  $18.000 \times g$  por 3 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento foi então seco em câmara de fluxo laminar por 1 a 2 horas e ressuspensão em 47,5  $\mu\text{L}$  de tampão 0,01 mol/L Tris-HCl pH 8,0 adicionado de 2,5  $\mu\text{L}$  de RNase A (10 mg/mL).

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 1%, pela comparação com padrões de DNA de concentração conhecida e em espectrofotômetro. Para a quantificação em gel de agarose 1% (m/v, m = massa e v = volume) foi realizada eletroforese a 100 V em tampão TAE (0,001 mol/L EDTA pH 8,0; 0,04 mol/L TRIS pH 8,0; 0,02 mol/L ácido acético) por 1 hora. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 15 minutos, lavado por 10 minutos em água corrente, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak<sup>®</sup>). A quantificação por densidade ótica a 260 nm de comprimento de onda ( $\lambda$ ) foi realizada em espectrofotômetro Femto 700 plus (Femto<sup>®</sup>) e a medição da qualidade da amostra foi realizada pela medição da densidade ótica a 280 nm de  $\lambda$ . Para o cálculo da concentração de DNA na amostra, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$[\text{DNA}]_{\text{ng}/\mu\text{L}} = 50 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times \text{CO} \times \text{FD} \times A_{260}$$

sendo:

$[\text{DNA}]_{\text{ng}/\mu\text{L}}$  = concentração de DNA em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ;

CO = caminho ótico (cm);

FD = fator de diluição;

$A_{260}$  = absorvância a 260 nm.

A aferição da qualidade do DNA foi realizada pela leitura em 280 nm de comprimento de onda, sendo ideal que a relação entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm estivesse entre 1,6 a 2,0.

De posse das concentrações reais de cada amostra, o DNA foi diluído em tampão 0,01 mol/L Tris-HCl pH 8,0 até a concentração de trabalho de 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , tendo a solução estoque sido armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  e a solução de trabalho foi mantida a  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.3 Amplificação via RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), utilizando-se um programa com desnaturação inicial a  $95^\circ\text{C}$  por 1 minuto, seguido por desnaturação a  $94^\circ\text{C}$  por 10 segundos, anelamento a  $36^\circ\text{C}$  por 1 minuto e extensão a  $72^\circ\text{C}$  por 2 minutos. Os passos de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 34 vezes e, em seguida, a reação foi finalizada por uma extensão a  $72^\circ\text{C}$  por 7 minutos. O volume final de cada reação de amplificação foi de 10  $\mu\text{L}$ , contendo 30 ng de DNA, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4, 50 mmol/L KCl, 1,5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  de cada um dos dNTPs, 0,25  $\mu\text{mol}/\text{L}$  do *primer* RAPD correspondente e 0,3 unidades (U) de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>). Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% (m/v), com eletroforese a 100 V em tampão TAE (0,001 mol/L EDTA pH 8,0; 0,04 mol/L TRIS pH 8,0; 0,02 mol/L ácido acético) por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi incubado

em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 20 minutos, lavado em água corrente por 10 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak®).

Foram utilizados os seguintes primers RAPD da série Operon: OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPA-20, OPB-01, OPB-02, OPB-03, OPB-04, OPB-05, OPB-06, OPB-07, OPB-08, OPB-09, OPB-10, OPC-02, OPC-03, OPC-04, OPC-05, OPC-06, OPC-07, OPC-08, OPC-09, OPC-10, OPC-12, OPC-17, OPC-19, OPD-01, OPD-02, OPD-03, OPD-04, OPD-05, OPD-06, OPD-07, OPD-08, OPD-09, OPD-10, OPE-01, OPE-02, OPE-03, OPE-05, OPE-06, OPE-07, OPE-08, OPE-09, OPE-10, OPE-11, OPE-12, OPE-13, OPE-14, OPE-15, OPE-16, OPE-17, OPE-18, OPE-19, OPE-20, OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPF-05, OPF-06, OPF-07, OPF-08, OPF-09, OPF-10, OPF-11, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPF-15, OPF-16, OPF-17, OPF-18, OPF-19, OPF-20, OPG-01, OPG-02, OPG-03, OPI-01, OPI-02, OPI-03, OPI-04, OPN-07, OPN-10, OPP-04, OPP-08, OPW-07 e OPW-08.

### 3.4 Amplificação via SSR

Um total de 33 pares de *primers* foram testados, compreendendo 27 desenvolvidos por Crouch et al. (1998) (série Ma) e 6 pares de *primers* desenvolvidos por Lagoda et al. (1998) (série AGMI), sintetizados pela Bio Synthesis (Lewisville, TX, EUA). Detalhes dos *primers* empregados estão listados na Tabela 1.





Primer	Seqüência (5'→3')	Produto* (pb)	Tm <sup>b</sup> (°C)
Ma 3/103	icgcicccicctttagagctcig	152	58
Ma 3/127	icgctcctaaacagcttatactc	nd	54
Ma 3/130	aatcgcgcgcacagcgcgcgata	198	56
Ma 3/131	icgcgataccaaagcctttagcga	123 :	58
Ma 3/132	aaagcgcgatacgcgcgcgacaa	160	56
Ma 3/139	acgcgcgcgcgcgcgcgcgcacac	nd	64
Ma 3/161	aaagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	188	56
AGMI 24/25	tttagctcctcctcctcctcctcctc	248	60
AGMI 93/94	tttagctcctcctcctcctcctcctc	128	70
AGMI 121/122	gatacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	333	60
AGMI 157/158	gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	143	54
AGMI 67/68	ataaccctcctcctcctcctcctc	nd	56
AGMI 161/162	icgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	nd	58

Nota: \* tamanho esperado do alelo amplificado de acordo com a seqüência do fragmento usado no desenho dos primers; <sup>b</sup> temperatura de anelamento; nd = tamanho não divulgado.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), tendo sido utilizado um programa com desnaturação inicial a 94°C, por 3 minutos, seguido por desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 50°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Os passos de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 30 vezes e, em seguida, a reação foi finalizada por uma extensão a 72°C por 7 minutos. O volume final de cada reação de amplificação foi de 18 µL, contendo 30 ng de DNA, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4, 50 mmol/L

KCl, 1,6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 140 µmol/L de cada um dos dNTPs, 0,3 µmol/L de cada *primer* e 0,5 unidades (U) de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 4% (m/v), com eletroforese a 100 V em tampão TAE (0,001 mol/L EDTA pH 8,0; 0,04 mol/L TRIS pH 8,0; 0,02 mol/L ácido acético) por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 20 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak®).

### 3.5 Preparo de lâminas e contagem cromossômica

As raízes novas, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram coletadas e lavadas em água corrente. Após a lavagem, as raízes foram secas em papel de filtro e transferidas para um frasco coberto com papel alumínio, contendo a solução 8-hidroxiquinoleína a 0,029%, onde permaneceram por sete horas. Em seguida, as raízes foram secas em papel de filtro e transferidas para a solução fixadora de metanol:ácido acético (3:1), onde permaneceram por 15 minutos, sendo logo após transferidas para nova solução fixadora metanol:ácido acético (3:1), onde permaneceram por um tempo mínimo de 24 horas.

Após a fixação, as raízes foram lavadas em água destilada por 15 minutos, sendo a água trocada de 5 em 5 minutos e submetidas à maceração enzimática em solução de Pectinex® (em que, para cada raiz a ser digerida, foram colocados, em microtubo, 10 µL de enzima + 100µL de água destilada) em banho-maria a 34°C, por cerca de 2 horas. Terminada a maceração, as raízes foram lavadas por 15 minutos em água destilada, trocando-se a água de 5 em 5 minutos e, então, foram fixadas em solução fixadora metanol:ácido acético (3:1), na qual permaneceram por um tempo mínimo de 24 horas a -20°C. Para o preparo das lâminas, as raízes foram secas em papel de filtro e transferidas para solução de HCl 1N, que foi levada para o banho-maria a 60°C, por 20 minutos.

Após o banho, a raiz digerida e fixada foi transferida para a lâmina inclinada 30°, sob microscópio estereoscópio, com a região meristemática voltada para baixo. A dissociação celular foi feita com auxílio de uma lâmina de aço, enquanto era gotejada, com pipeta Pasteur, a solução fixadora gelada para espalhar a célula ao longo da lâmina. Em seguida, as lâminas foram secas em movimentos rápidos contra o ar para propiciar o espalhamento das placas metafásicas e, finalmente, secas em placa aquecedora a 50°C. A lâmina foi, então, mergulhada em ácido acético 45% durante 10 segundos, para promover o clareamento do citoplasma e aumentar o contraste e foi novamente seca ao ar e em placa aquecedora. Após a secagem, a lâmina foi mergulhada no corante Giemsa 10% durante cinco minutos e foi então lavada em água destilada para que o excesso do corante fosse retirado. A lâmina foi mais uma vez seca ao ar e em placa aquecedora. Após este procedimento, as lâminas estavam prontas para serem analisadas.

Os seguintes critérios foram utilizados na avaliação da qualidade das lâminas preparadas pelos dois diferentes métodos: espalhamento das células na lâmina, presença de citoplasma circundando os cromossomos, definição dos núcleos interfásicos, espalhamento e definição dos cromossomos.

### **3.6 Citometria de fluxo**

Folhas jovens de bananeiras normais e variantes somaclonais da cultivar Prata Anã foram coletadas no município de Andradas, Minas Gerais e acondicionadas em ambiente úmido e de baixa temperatura (gelo) até o momento do processamento.

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. A metodologia de extração e coloração da suspensão nuclear foi utilizada conforme as recomendações do fabricante, utilizando o tampão DNA

*Staining Solution Partec*<sup>®</sup>. Discos foliares de 1 cm de diâmetro foram retirados do limbo foliar e transferidos para placas de petri, onde foram triturados com o auxílio de uma lâmina de aço. A este triturado foram adicionados 500 µL de tampão de extração e coloração. Após dois minutos de incubação, a suspensão nuclear foi filtrada em uma tela de 40 µm de diâmetro, acrescentando-se mais 1500 µL do tampão. Após cinco minutos de incubação, a suspensão nuclear foi filtrada em telas de 20 µm em tubos específicos para leitura no citômetro de fluxo.

A quantificação relativa do DNA em núcleos de células normais e variantes foi realizada comparando-se as posições dos respectivos picos na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular. Esses picos são gerados de acordo com a leitura do comprimento de onda emitido pelo corante DAPI que se liga ao DNA em regiões ricas em adenina e timina.

As preparações foram analisadas em um citômetro de fluxo modelo PAS III Partec<sup>®</sup>, equipado com lâmpada HBO de arco de mercúrio 100 W para excitação em UV e com o parâmetro SSC-Blue para análise em 488 nm.

Os histogramas obtidos foram analisados estatisticamente com ferramentas do programa FlowMax Partec<sup>®</sup> para a determinação da quantidade de DNA em cada indivíduo, em relação aos demais que estavam sendo processados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise morfológica das plantas variantes

As plantas variantes, após três meses na casa de vegetação, já apresentavam uma altura maior (Figuras 3 e 4). As condições de luminosidade, irrigação, temperatura e substrato foram as mesmas para as variantes e normais. Foi assim confirmada a eficiência na seleção daquelas plantas da cultivar Prata Anã que seriam variantes ou normais.



FIGURA 3. Bananeiras com 3 meses de idade, em casa de vegetação, no Setor de Paisagismo do Departamento de Agricultura. As bananeiras dentro do retângulo vermelho são ‘Prata Anã’ variantes somaclonais e aquelas dentro do retângulo azul são ‘Prata Anã’ normais.



FIGURA 4. Bananeiras com 3 meses de idade, em casa de vegetação no Setor de Paisagismo do Departamento de Agricultura. À esquerda, uma planta 'Prata Anã' normal e à direita 'Prata Anã' variante.

#### 4.2 Identificação de variantes somaclonais com marcadores RAPD

A tentativa de identificação de variantes somaclonais de bananeiras 'Prata Anã' com marcadores RAPD foi realizada utilizando-se 103 oligonucleotídeos, os quais estão relacionados na Tabela 2 com seus respectivos resultados.

TABELA 2. Relação do número de produtos amplificados por cada oligonucleotídeo utilizado.

Oligonucleotídeo	Número de produtos amplificados
OPA-01	3
OPA-02	5
OPA-03	1
OPA-04	0
OPA-05	3
OPA-06	0
OPA-07	1
OPA-08	3
OPA-09	3
OPA-10	2
OPA-11	5
OPA-12	2
OPA-14	1
OPA-15	3
OPA-16	1
OPA-17	2
OPA-18	2
OPA-19	3
OPA-20	4
OPB-01	2
OPB-02	2
OPB-03	2
OPB-04	3
OPB-05	2
OPB-06	0
OPB-07	3
OPB-08	0
OPB-09	0
OPB-10	3
OPC-02	0
OPC-03	0
OPC-04	3
OPC-05	0
OPC-06	5
OPC-07	4
OPC-08	4
OPC-09	5
OPC-10	6
OPC-12	0
OPC-17	0

...continua...

Oligonucleotídeo	Número de produtos amplificados
OPC-19	0
OPD-01	0
OPD-02	6
OPD-03	2
OPD-04	2
OPD-05	2
OPD-06	0
OPD-07	3
OPD-08	3
OPD-09	0
OPD-10	3
OPE-01	2
OPE-02	1
OPE-03	0
OPE-05	0
OPE-06	4
OPE-07	2
OPE-08	1
OPE-09	0
OPE-10	0
OPE-11	1
OPE-12	0
OPE-13	0
OPE-14	1
OPE-15	3
OPE-16	3
OPE-17	2
OPE-18	4
OPE-19	2
OPE-20	0
OPF-01	1
OPF-02	3
OPF-03	2
OPF-04	2
OPF-05	1
OPF-06	4
OPF-07	3
OPF-08	2
OPF-09	0
OPF-10	2
OPF-11	0
OPF-12	0
OPF-13	5
OPF-14	1
OPF-15	0

... continua...





Tabela 2. cont.

Oligonucleotídeo	Número de produtos amplificados
OPF-16	0
OPF-17	0
OPF-18	0
OPF-19	0
OPF-20	5
OPG-01	0
OPG-02	3
OPG-03	0
OPI-01	3
OPI-02	1
OPI-03	3
OPI-04	0
OPN-07	0
OPN-10	1
OPP-04	2
OPP-08	2
OPW-07	4
OPW-08	3

Não foi observada a ocorrência de fragmentos polimórficos que diferenciasssem os grupos de plantas estudados. No total, 188 bandas foram visualizadas e nenhum polimorfismo encontrado. A falta de fragmentos polimórficos pode ser observada, por exemplo, ao se amplificarem as preparações de DNA com os oligonucleotídeos OPB-10 (Figura 5) e OPC-06 (Figura 6).

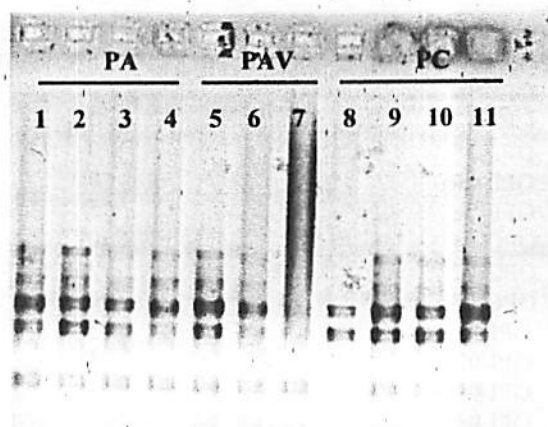


FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras 'Prata Anã' (canaletas 1 a 4), 'Prata Anã' variantes somaclonais (canaletas 5 a 7) e 'Prata' (canaletas 8 a 11), amplificados com o uso do oligonucleotídeo OPB-10.

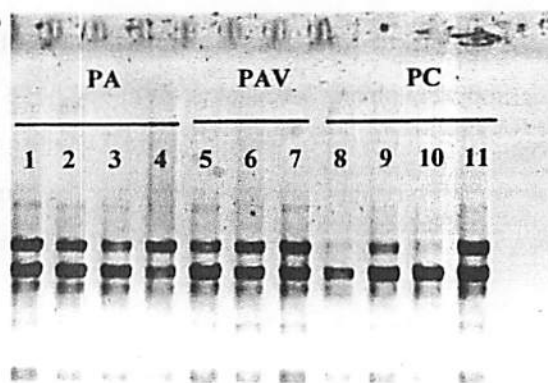


FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras 'Prata Anã' (canaletas 1 a 4), 'Prata Anã' variantes somaclonais (canaletas 5 a 7) e 'Prata' (canaletas 8 a 11), amplificados com o uso do oligonucleotídeo OPC-06.

Quando o oligonucleotídeo OPW-08 foi utilizado, uma planta 'Prata Anã' variante forneceu um padrão de bandas diferente das demais 'Prata Anã' variantes e de todas as demais (Figura 7). Este dado discorda do que foi relatado por Gomes (2002), pois o *primer* OPW-08 deveria distinguir as plantas 'Prata' daquelas 'Prata Anã'. Houve diferença em uma planta apenas, daquelas consideradas variantes somaclonais, o que evidencia que a variância não ocorre de maneira uniforme entre as plantas variantes e que, apesar da morfologia da variação ser bastante consistente, regiões diferentes do genoma podem estar sendo suprimidas, duplicadas ou modificadas para cada planta variante.

Para que pudessem ser aumentadas a quantidade de informações e a possibilidade de se encontrar fragmentos de DNA polimórficos, 11 reações de RAPD com dois *primers* diferentes por reação foram utilizadas. As combinações de *primers* utilizadas e a quantidade de fragmentos amplificados estão relacionadas na Tabela 3.

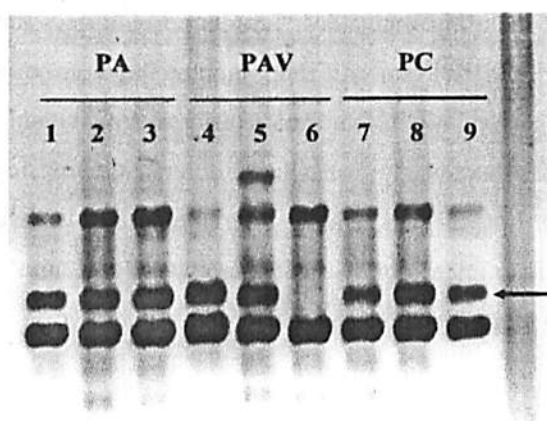


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras 'Prata Anã' (canaletas 1 a 3), 'Prata Anã' variantes somaclonais (canaletas 4 a 6) e 'Prata' (canaletas 7 a 9),

amplificados com o uso do oligonucleotídeo OPW-08. A seta indica a banda polimórfica.

TABELA 3. Relação do número de produtos amplificados por cada combinação de *primers* utilizada.

Combinação de primers	Número de produtos amplificados
OPW-08 + OPA-01	4
OPW-08 + OPA-02	2
OPW-08 + OPA-03	2
OPA-01 + OPA-02	3
OPA-01 + OPA-03	2
OPA-01 + OPA-11	4
OPB-07 + OPA-03	3
OPB-07 + OPA-01	4
OPC-09 + OPC-06	7
OPA-03 + OPC-06	5
OPA-01 + OPC-09	4

A utilização de dois primers por reação também não foi eficiente na diferenciação dos materiais estudados. Entretanto, é interessante destacar que quando o *primer* OPW-08 foi utilizado juntamente com o *primer* OPA-01 (Figura 8), a mesma planta 'Prata Anã' variante somaclonal apresentou um padrão diferente das demais, confirmando a diferença que existe entre elas e que a variação pode ter uma origem genética diferente para cada variante. Entretanto a uniformidade fenotípica dos variantes aponta para uma alteração neste indivíduo que não tenha afetado a sua morfologia.

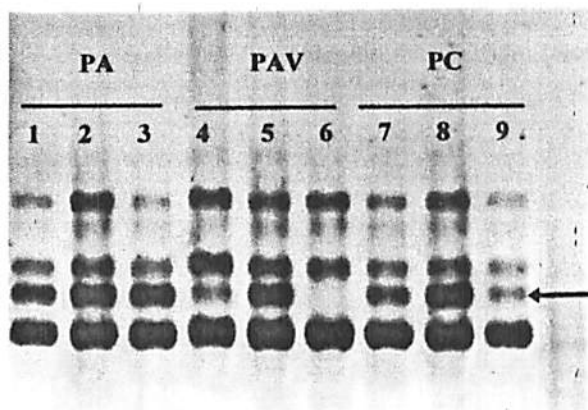


FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras 'Prata Anã' (canaletas 1 a 3), 'Prata Anã' variantes somaclonais (canaletas 4 a 6) e 'Prata' (canaletas 7 a 9), amplificados com o uso dos oligonucleotídeos OPW-08 e OPA-01 em uma única reação. A seta indica a banda polimórfica.

#### 4.3 Identificação de variantes somaclonais com marcadores SSR

Nenhum dos 33 pares de *primers* microssatélite utilizados neste experimento forneceu bandas polimórficas, sendo, portanto, inviáveis na distinção entre os indivíduos normais e variantes. Também não foram eficientes na diferenciação de bananeiras das cultivares Prata e Prata Anã, o que corrobora com o descrito por Souza (2002) que, utilizando o mesmo conjunto de pares de *primers* no estudo de variabilidade genética de *Musa* spp., não obteve sucesso na diferenciação destas cultivares, inserindo-as no subgrupo 'Prata'. Normalmente, a classificação em subgrupos está relacionada à ocorrência de pequenas mutações em um clone, porém, com efeito importante em seu uso e comercialização (Dantas et al., 1997). As variações expressivas em caracteres morfológicos nem sempre refletem um mesmo grau de variações genéticas (Gawel et al., 1992), o que explica a ausência de polimorfismo quando utilizados os 33 pares de *primers*, mesmo que, aparentemente, as plantas 'Prata Anã',

'Prata Anã' variantes e 'Prata' sejam tão distintas. A falta de fragmentos polimórficos pode ser observada, por exemplo, ao se amplificarem as preparações de DNA com os pares de *primers* Ma 1/16 (Figura 9), Ma1/17 (Figura 10) e AGMI 121/122 (Figura 11).

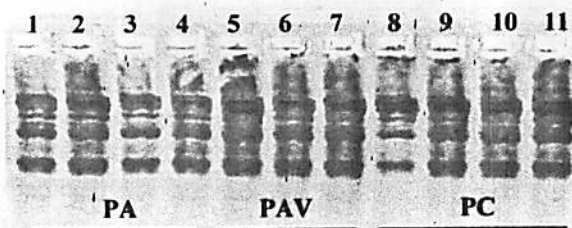


FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras 'Prata Anã' (canaletas 1 a 4), 'Prata Anã' variantes somaclonais (canaletas 5 a 7) e 'Prata' (canaletas 8 a 11), amplificados com o uso do par de *primers* Ma 1/16.

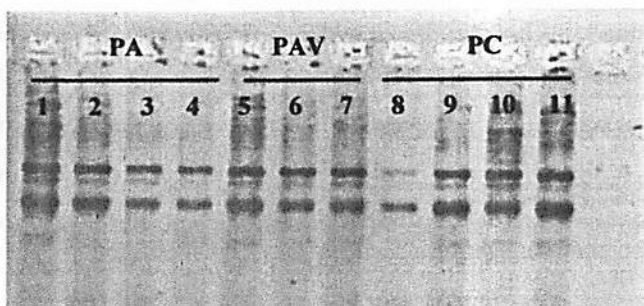


FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras 'Prata Anã' (canaletas 1 a 4), 'Prata Anã' variantes somaclonais (canaletas 5 a 7) e 'Prata' (canaletas 8 a 11), amplificados com o uso do par de *primers* Ma 1/17.

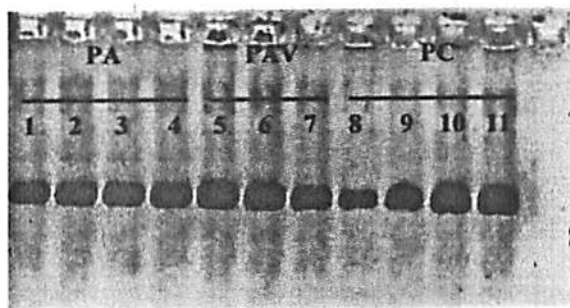


FIGURA 11. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras 'Prata Anã' (canaletas 1 a 4), 'Prata Anã' variantes somaclonais (canaletas 5 a 7) e 'Prata' (canaletas 8 a 11), amplificados com o uso do par de *primers* AGMI 121/122.

#### 4.4 Preparo de lâminas e contagem cromossômica

As raízes coletadas de plantas *in vitro* deram origem a lâminas de boa qualidade, com cromossomos bem centralizados na placa metafásica da célula, de fácil distinção e contagem (Figura 12). Nestas células foi possível se observar um número de 33 cromossomos, tendo uma pequena oscilação de um ou dois cromossomos para mais ou menos sido detectada. O fato das células não apresentarem exatamente 33 cromossomos é explicado pela dificuldade em contar os cromossomos da bananeira, que possuem tamanho extremamente reduzido, e, também, pela natural instabilidade mitótica inerente à espécie (Shepherd & dos Santos, 1996; Shepherd & da Silva, 1996). O inconveniente destas plântulas extremamente jovens é que é impossível afirmar que são realmente normais ou variantes, uma vez que, neste estágio, é impossível a detecção daqueles caracteres morfológicos que são utilizados como base para a identificação daqueles indivíduos variantes somaclonais.

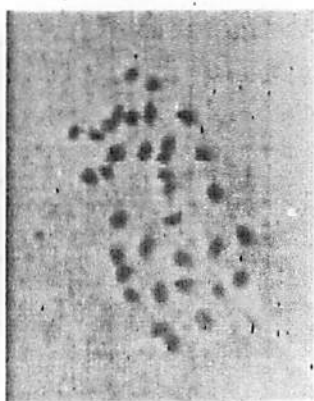


FIGURA 12. Célula de bananeira 'Prata Anã' jovem, propagada *in vitro*, preparada pelo método de secagem ao vácuo.

Células de ponta de raiz de plantas da cultivar Prata Anã adultas sabidamente normais e variantes somaclonais foram analisadas, entretanto, os resultados fornecidos não foram satisfatórios. Isso porque as plantas adultas não fornecem um material tenro o suficiente para que as lâminas tenham qualidade e a contagem possa ser realizada. As células freqüentemente apresentavam-se 'embaçadas', rompidas e as lâminas muito sujas, além de haver uma maior dificuldade na ligação do corante ao DNA. Um exemplo de célula adulta de ponta de raiz de uma planta 'Prata Anã' variante é mostrado na Figura 13.





FIGURA 13. Célula de bananeira 'Prata Anã' variante somaclonal adulta, propagada *in vitro*, preparada pelo método de secagem ao ar.

#### 4.5 Citometria de fluxo

Vinte plantas foram aleatoriamente coletadas e analisadas no citômetro de fluxo, sendo 8 'Prata Anã' adultas, 8 'Prata Anã' variantes adultas e 4 plântulas 'Prata Anã' cultivadas *in vitro*. As plantas foram classificadas em cada grupo de acordo com a sua morfologia. As plântulas não puderam ser diferenciadas, uma vez que, neste estágio, ainda não é possível discernir as variantes das normais. A Tabela 4 contém os resultados das análises.

TABELA 4. Resultado da quantificação relativa do DNA de cada planta de bananeira 'Prata Anã' analisada por citometria de fluxo.

<i>Tipo de bananeira da cultivar 'prata anã'</i>	<i>INDEX<sup>a</sup></i>
Normal	1,25
Normal	1,21
Normal	1,00
Normal	1,26
Normal	1,00
Normal	1,25
Normal	1,04
Normal	1,22

...continua...

Tabela 4, cont.

Plântula	1,19
Plântula	1,18
Plântula	1,05
Plântula	1,25
Variante	1,21
Variante	1,25
Variante	1,22
Variante	1,00
Variante	1,23
Variante	1,25
Variante	1,02
Variante	1,16

Nota: <sup>a</sup> O INDEX corresponde ao valor de leitura no citômetro da quantidade de DNA, no qual 1,00 corresponde à menor leitura. Uma planta com INDEX 1,22 possui, em seus núcleos, 22% a mais de DNA que aquelas plantas de referência.

A quantidade de DNA é extremamente variável entre os indivíduos e não há um padrão de quantidade maior ou menor em um ou outro tipo de planta (Tabela 4). A distribuição daquelas plantas com mais ou menos DNA no núcleo foi totalmente aleatória, não sendo, portanto, a citometria uma técnica eficiente para a distinção dos indivíduos da cultivar Prata Anã que possuem este tipo de variação somaclonal.

## 5 CONCLUSÕES

Tanto os marcadores moleculares quanto as técnicas citogenéticas utilizados neste estudo não foram eficientes na exata distinção dos indivíduos variantes daqueles normais para este tipo de variação somaclonal em bananeiras da cultivar Prata Anã.

O *primer* de RAPD OPW-08 distinguiu uma planta variante somaclonal de todas as demais, inclusive de outras plantas também variantes, sugerindo que a variação não ocorre de maneira uniforme no genoma, apesar das características morfológicas serem compartilhadas por todos os variantes. Como morfológicamente são idênticas, é provável que esta diferença não esteja relacionada com a característica que determina a morfologia das plantas variantes.

As análises de citometria de fluxo se mostraram ineficientes na distinção entre os indivíduos variantes e os normais, nas condições de amostragem do trabalho.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. J. **A Cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CNPMP, 1999. 585 p.

ANGARITA, A.; PEREA, M. Micropropagación de plátanos y bananos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: CIAT, 1991. p. 495-512.

ARIAS, P.; DANKERS, C.; LIU, P.; PILKAUSKAS, P. **The world banana economy, 1985-2002**. Roma: FAO, 2003. 97 p.

BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 4, n. 6, p. 351-354, 1985.

BECKMAN, J. S.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphism in plant genetic improvement. **Oxford Surveys of Plant Molecular Cell Biology**, Oxford, v. 3, p. 196-250, 1986.

BELICUAS, P. R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides adrogenéticos em milho**. 2005. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BROWN, P. T. H.; LANGE, K. G.; KRANZ, E.; LÖRZ, H. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 237, n. 3, p. 311-317, Mar. 1993.

CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. 1995. 127 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosome without enzymatic maceration. **Biotechnic and Histochemistry**, Louisville, v. 68, n. 3, p. 142-145, May 1993.

CHEESMAN, E. E. Classification of the bananas. II. The genus *Musa* L. **Kew Bulletin**, London, n. 2, p. 106-117, 1948.

CHEESMAN, E. E. Genetic and cytological studies of *Musa*. I. Certain hybrids of the Gros Michel banana. *Journal of Genetics*, Cambridge, v. 26, n. 3, p. 291-312, 1932a.

CHEESMAN, E. E. Genetic and cytological studies of *Musa*. II. Hybrids of the Gros Michel banana. *Journal of Genetics*, Cambridge, v. 26, n. 3, p. 313-316, 1932b.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUZA, M.; SILVA, M.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos da biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, v. 71, p. 19-33, 2002.

COTE, F. X.; SANDOVAL, J. A.; MARIE, P. H.; AUBOIRON, E. Variation in micropropagated bananas and plantains: literature survey. *Fruits*, Paris, v. 48, n. 1, p. 15-22, Jan./Feb. 1993.

CRONAUER, S. S.; KRIKORIAN, A. D. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. *Annals of Botany*, London, v. 53, n. 3, p. 321-328, Mar. 1984.

CROUCH, H. K.; CROUCH, J. H.; JARRET, R. L.; CREGAN, P. B.; ORTIZ, R. Segregation at microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. *Crop Science*, Madison, v. 38, n. 1, p. 211-217, Jan./Feb. 1998.

DAMASCO, O. P.; GRAHAM, G. C.; HENRY, R. J.; ADKINS, S. W. SMITH, M. K.; GODWIN, I. D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 16, n. 1/2, p. 118-123, Nov. 1996.

DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. O.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E. J. *A Cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais*. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CNPMP, 1997. p. 27-34.

DODDS, K. S. Genetic and cytological studies of *Musa*. V. Certain edible diploids. *Journal of Genetics*, Cambridge, v. 45, n. 2, p. 113-138, 1943.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, Poznań, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.  
DOLEZEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis : PCA*, Sussex, v. 2, n. 4, p. 143-154, Sept. 1991.

EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; MEDINA-FILHO, H. P. Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 71, n. 6, p. 759-774, June 1984.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moléculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FOURRÉ, J. L.; BERGER, P.; NIQUET, L.; ANDRÉ, P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and applied genetics*, Berlin, v. 94, n. 2, p. 159-169, Feb. 1997.

GAWEL, N. J.; JARRET, R. L.; WHITTEMORE, A. P. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in *Musa* species. *Theoretical and applied genetics*, Berlin, v. 81, n. 3/4, p. 286-290, July 1992.

GOMES, G. A. C. **Divergência genética entre cultivares e certificação genética e fitossanitária de matrizes de bananeira**. 2002. 127 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1990. p. 99-169.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, New York, v. 39, p. 439-446, 1974.

HASHMI, G.; HUETTEL, R.; MEYER, R.; KRUSBERG, L.; HAMMERSCHLAG, F. RAPD analysis of Somaclonal variants derived from embryo callus culture of peach. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 16, n. 9, p. 624-627, June 1997.

HWANG, S. C.; CHEN, C. L.; LIN, J. C.; LIN, H. L. Cultivation of banana using plantlets from meristem culture. *HortScience*, Alexandria, v. 19, n. 2, p. 231-233, Apr. 1984.

HWANG, S.; TANG, C. Y. Improved resistance to *Fusarium* wilt through somaclonal variation in Cavendish bananas In: CONFERENCE ON

CHALLENGES FOR BANANA PRODUCTION AND UTILIZATION IN 21ST CENTURY, 1996, Trichy. *Proceedings*. . . Trichy: AIPUB, 2000. p. 195-208.

HWANG, S.; TANG, C. Y. Somaclonal variation and its use for improving Cavendish (AAA dessert) bananas in Taiwan. In: FRISON, E. A.; HORRY, J. P.; DEWAELE, D. (Ed.) *New frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium and Sigatoka*. Kuala Lumpur: INIBAP, 1996. p. 173-181.

ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., (Ed.) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990. p. 287-295.

INIBAP. *Main plantain/banana producing regions of the world*. Ottawa: INIBAP, 1985. 9 p.

ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; LAHAV, E. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Scientific Horticulture*, Amsterdam, v. 48, n. 1/2, p. 71-88, Oct. 1991.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, London, v. 314, n. 6006, p. 67-73, 1985.

KARP, A. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, Oxford, v. 7, p. 1-58, 1991.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, Dordrecht, v. 85, n. 1/3, p. 295-302, 1995.

KRIKORIAN, A. D. *In vitro* culture of bananas and plantains: Background, update and call for information. *Tropical Agriculture*, Trinidad, v. 66, n. 3, p. 194-200, July 1989.

KRIKORIAN, A. D.; CRONAUER, S. S. Banana. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). *Handbook of plant cell culture*. New York: Macmillan, 1983. v. 2, p. 327-348.

KRIKORIAN, A. D.; IRIZARRY, H.; CRONAUER-MITRA, S. RIVERA, E. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa AAB*) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Annals of Botany*, London, v. 71, n. 6, p. 519-535, June 1993.

LAGODA, P. J. L.; NOYER, J. L.; DABIER, D.; BAURENS, F. C.; GRAPIN, A.; LANAUD, C. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 7, n. 5, p. 657-666, May 1998.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - A novel source of genetic variability from cell cultures for improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, v. 77, p. 18-29, 2004.

MARIE, D.; BROW, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, Paris, v. 78, n. 1/2, p. 41-51, 1993.

MARTINEZ, O.; REYES, L. M.; BELTRAN, M. Chemovariability in the genus *Musa*: similarities and differences. *Infomusa*, Montpellier, v. 7, n. 2, p. 16-20, Dic. 1998.

MEINS, F. Heritable variation in plant cell culture. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v. 34, p. 327-346, 1983.

MOREIRA, R. S. *Banana: teoria e prática do cultivo*. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 355 p.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, Amsterdam, v. 155, p. 335-350, 1987.

MUNTHALI, M. T.; NEWBURY, H. J.; FORD-LLOYD, B. V. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 15, n. 7, p. 474-478, Mar. 1996.

ORELLANA, P.; PEREZ PONCE, J.; AGRAMONTE, D.; GOMEZ, R.; JIMENEZ, E.; MARTINEZ, S.; ALMAGUER, E.; GOMEZ, P. La micropropagación del plátano a escala comercial en Cuba. *ACEVIV Boletín Científico*, Bogotá, v. 3, n. 3, p. 29-38, 1991.

PATIL, P. V.; NAVALE, P. A. Somaclonal variation in fruit crops: a review. *Journal of Maharashtra Agricultural University*, Maharashtra, v. 25, n. 1, p. 8-14, 2000.



PRICE, H.; JOHNSTON, J. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: JAUHAR, P. **Methods of genome analysis in plants**. New York: CRC Press, 1996. p. 115-131.

QUYNH, N. T.; UYEN, N. V. **Adapted propagation techniques for commercial crops of the tropics**. Stockholm: International Foundation for Science, 1993. 244 p.

RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York: Elsevier, 1996. p. 75-134.

RAHMAN, M. H.; RAJORA, O. P. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 6, p. 531-536, Sept. 2001.

RANI, V.; RAINA, S. N. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Largo, v. 36, n. 5, p. 319-330, Sept./Oct. 2000.

RODRIGUES, P. H. V.; TULMANN NETO, A.; CASSIERI NETO, P.; MENDES, B. M. J. Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp., AAA group). **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 490, p. 469-473, 1998.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

SANADA, M. Micropropagation of semitropical crop and its application to cultivation in Okinawa. In: THIQUYNH, N.; UYEN, N. V. (Ed.). **Adapted propagation techniques for commercial crops of the tropics**. Stockholm: [s. n.], 1993. p. 101-105.

SANDOVAL, J. A.; BRENES, G.; PÉREZ SÁNCHEZ, L. **Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE**. San José, Turrialba: CATIE, 1991. 24 p. (Informe Técnico, 186).

SHEPHERD, K. **Contagem de cromossomas**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1984. n. p.

SHEPHERD, K.; da SILVA, K. M. Mitotic Instability in banana varieties. Aberrations in conventional triploid plants. *Fruits*, Paris, v. 51, n. 1, p. 99-103, Jan./Feb. 1996.

SHEPHERD, K.; dos SANTOS, J. A. Mitotic Instability in banana varieties. I – Plants from callus and shoot tip cultures. *Fruits*, Paris, v. 51, n. 1, p. 5-11, Jan./Feb. 1996.

SILVA, C. R. R. *Fruticultura tropical*, Lavras, MG: UFLA/FAEPE, 2001. 178 p.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *The Journal of the Linnean Society of London*, London, v. 55, p. 302-315, 1955.

SMITH, M. K. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. *Fruits*, Paris, v. 43, n. 4, p. 219-223, Apr. 1988.

SOUZA, E. V. D. *Multiplicação in vitro da bananeira triplóide (AAA) 'Caipira' e instabilidade mitótica das plantas produzidas*. 1994. 73 p. Dissertação (Mestrado em genética) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA.

SOUZA, S. A. C. *Avaliação da variabilidade genética em Musa spp. utilizando marcadores microssatélites*. 2002. 86 p. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

TABARES, E.; PACHÓN, J.; ROCA, W. M. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones*. Cali: CIAT, 1991. p. 339-359.

UMA, S.; SELVARAJAN, R.; SARASWATHI, M. S.; RAMESHKUMAR, A.; SATHIAMOORTHY, S. Production of quality planting material in banana. In: GLOBAL CONFERENCE ON BANANA AND PLANTAIN, 2002, Bangalore, India. p. 24-30.

VIDHYA, R.; ASHALATHA, S. N. In-vitro culture, pseudostem pigmentation and genetic characterization of *Musa acuminata* cv. Red. In: GLOBAL

CONFERENCE ON BANANA AND PLANTAIN, 2002, Bangalore, India.  
Abstracts. . . Bangalore, India, 2002. p. 65.

VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R. Somaclonal variation in African plantains.  
IITA Research, Ibadan, v. 1, n. 1, p. 4-10, 1990.

WANG, Z. Y.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. Plants from  
cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. *Plant Science*, Clare, v.  
94, n. 1/2, p. 179-193, 1993.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with  
arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Polymorphisms generated by arbitrarily  
primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic  
mapping. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v. 19, n. 4, p. 303-306, Feb. 1991.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K.; RAFALSKY, J. A.;  
TINGEY, S. U. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as  
genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535,  
Nov. 1990.

WONG, W. C. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): initiation,  
proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant  
Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 159-166, 1986.

YANPAISAN, W.; KING, N.; DORAN, P. Flow citometry of plant cells with  
applications in large scale bioprocessing. *Biotechnology Advances*,  
Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 3-27, 1999.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
DEPARTMENT OF POLITICAL SCIENCE

PH.D. THESIS  
SUBMITTED TO THE FACULTY OF THE DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES  
IN CANDIDACY FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

BY  
[Name]

CHICAGO, ILLINOIS  
1961

THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
DEPARTMENT OF POLITICAL SCIENCE

PH.D. THESIS  
SUBMITTED TO THE FACULTY OF THE DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES  
IN CANDIDACY FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

BY  
[Name]

CHICAGO, ILLINOIS  
1961

