

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE COLCHICINA COMO INDUTORA DE POLIPLOIDIA EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

Freitas, L.L.<sup>1</sup>, Pereira, T.N.S.<sup>2</sup>, Freitas Neto, M.<sup>3</sup>, Pereira, M.G.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UENF/Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, lyzial.freitas@gmail.com

<sup>2</sup>UENF/Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, telmasp@uenf.br

<sup>3</sup>UENF/Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, moniquebiol@bol.com.br

<sup>4</sup>UENF/Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, messias@uenf.br

**Resumo** - O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo para indução química de tetraplóides em mamoeiro visando à obtenção, futura, de híbridos triplóides sem sementes via cruzamento entre linhagens diplóides e tetraplóides. Para tal, sementes da cultivar SS72/12 foram submetidas à germinação e ao lançarem as radículas foram imersas em água (controle) e em solução aquosa de colchicina em diferentes concentrações de 0,2, 0,1, 0,07, 0,05, 0,03, 0,02, 0,01, 0,007 e 0,005% por 12h. Na avaliação constatou-se que a ação da colchicina nas concentrações de 0,2 até 0,05% causou letalidade em 100% das plântulas, enquanto as concentrações 0,03 e 0,02% apresentaram plântulas vivas e mortas. Nas concentrações de 0,01 a 0,005% e o controle, houve 100% de sobrevivência. Analisou-se o tamanho dos estômatos e o número de cromossomos em metáfases mitóticas. O tamanho dos estômatos das plantas tratadas com colchicina a 0,03% e contagem de cromossomos nas células mitóticas das tratadas com 0,02% mostraram diferenças entre o material diplóide e o suposto poliplóide. Os resultados observados permitiram concluir que houve ação da droga nas concentrações de 0,02% e 0,03% podendo ter induzido a poliploidia.

**Palavras-chave:** Indução de poliplóides, *Colchicum autumnale* L., Caricaceae.

**Área do Conhecimento:** Genética

### Introdução

O desenvolvimento de frutos sem sementes via poliploidia vem sendo explorada em várias espécies frutíferas. O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma espécie diplóide com  $2n=2x=18$  cromossomos (DARLINGTON E AMMAL, 1945). O desenvolvimento de frutos de mamoeiro sem sementes será um avanço mercadológico; assim, a indução de poliplóides é uma linha de pesquisa que precisa ser iniciada nos programas de melhoramento dessa cultura.

Híbridos triplóides sem sementes podem ser obtidos através do cruzamento entre linhagens diplóides e tetraplóides. Os híbridos triplóides

por apresentarem um número ímpar de cromossomos têm a divisão meiótica irregular, gerando assim gametas desbalanceados e inviáveis fazendo com que seus frutos não apresentem sementes, apenas rudimentos.

A poliploidia pode ser obtida espontaneamente ou artificialmente. Na indução artificial são utilizadas substâncias químicas, como a colchicina, que impede a formação do fuso acromático durante a divisão celular, não permitindo a separação dos cromossomos na anáfase (ALLARD, 1971).

O objetivo do estudo foi desenvolver um protocolo para indução de tetraplóides em mamoeiro visando à obtenção, futura, de híbridos triplóides.

## Metodologia

Esta pesquisa está sendo desenvolvida no Setor de Citogenética, do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, da UENF. Para tal, 50 sementes da cultivar SS72/12 foram germinadas em B.O.D. à temperatura de 26,5°C. Oito dias após a germinação, as sementes que estavam emitindo a radícula foram imersas em solução aquosa de colchicina nas concentrações de 0,2, 0,1, 0,07, 0,05, 0,03, 0,02, 0,01, 0,007 e 0,005% e 0% (água pura, controle) por 12h em GERBOX. Após os tratamentos, as plântulas foram retiradas da solução e lavadas em água corrente durante 5 minutos e imediatamente transplantadas em bandeja de isopor na casa de vegetação.

Para a seleção de plantas supostamente poliplóides dentre todas as plantas sobreviventes após os tratamentos, foi efetuada a análise do tamanho dos estômatos. Para tal, a impressão dos estômatos em lâmina de vidro foi obtida pressionando-se uma região do limbo foliar, de folhas desenvolvidas, sobre um pedaço de fita adesiva branca coberta com algumas gotas de acetona concentrada. Após a secagem, as lâminas foram observadas em microscópio óptico e imagens foram capturadas com o *software* Image-Pro Plus versão 5.1 (Media Cybernetics); após este procedimento foram feitas medições dos estômatos com o auxílio do programa MicroMeasure 3.3 e comparadas as médias do tamanho dos estômatos em planta diplóide normal e suposto poliplóide com realização do teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a confirmação do nível de ploidia das plântulas, supostamente tetraplóides, foi efetuada a contagem dos cromossomos nas células mitóticas. Para a obtenção das metáfases foram utilizadas 2 cm das pontas de raízes das plântulas, que foram coletadas e pré-tratadas com solução saturada de

paradiclorobenzeno a 4° C por 8 horas. Após pré-tratamento, as pontas foram lavadas, fixadas em 3:1 (metanol:ácido acético), e armazenadas em *freezer* até o momento de preparo das lâminas.

No preparo das lâminas, as pontas foram separadas por espessura e transferidas para tubos *ependorf* de 1ml e submetidas à digestão enzimática (pectinase 20% e celulase 2%) a temperatura de 37°C, por 1h e 30 min. Ao final da digestão, o material foi transferido para tubos de 1ml contendo água destilada e em seguida centrifugado durante 10 min a 5000 rpm para a suspensão dos núcleos. Após este procedimento os núcleos foram resuspendidos em solução de 4:1 (metanol:ácido acético) e novamente centrifugados, duas vezes, e conservados em *freezer* até o momento da preparação das lâminas.

Na montagem das lâminas foi utilizado uma gota do material preparado, que foi seco em câmara úmida à temperatura ambiente. Após a secagem, procedeu-se a coloração com solução de Giemsa 2% durante 15 min a temperatura de 37°C. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas para observação em microscópio óptico sob campo claro nas objetivas de imersão de 60X e 100X de aumento. As imagens contendo cromossomos condensados e bem espalhados, foram capturadas por meio de câmera digital (3.3 MPixel Qcolor3C) conectada ao microscópio utilizando-se o *software* de captura.

## Resultados

A concentração de 0,2% de colchicina foi a primeira a ser utilizada e verificou-se uma ação bastante prejudicial da colchicina nas plântulas, sendo possível observar a formação de grandes tumores nos meristemas radiculares e no hipocótilo, impedindo o desenvolvimento das plântulas, e assim, causando a morte das

mesmas. Portanto, foi necessário testar outras concentrações do químico na tentativa de encontrar concentrações que permitissem a sobrevivência das plântulas.

A concentração de 0,01% também causou tumores bem desenvolvidos e morte e todas as plântulas. As concentrações de 0,07% e 0,05% apresentaram plântulas com tumores menores e com moderado desenvolvimento do sistema radicular; algumas plântulas chegaram a apresentar crescimento da parte aérea após a região do calo, porém posteriormente morreram.

A concentração de 0,03% apresentou efeito nítido da colchicina, apresentando plântulas mortas, plântulas anãs deformadas, com inchaço em todo o caule e dificuldade na emissão de folhas jovens, sendo estas raquíticas e deformadas que provavelmente não desenvolverão e, portanto, morrerão; também surgiram plântulas com calo (tumor) na região do terço inferior do caule, plântulas com folhas muito grandes no decorrer do desenvolvimento destas, e apresentando folhas rajadas, intercalando verde claro normal da cultivar, com um verde muito intenso, e áreas um pouco cloróticas e plântulas aparentemente normais, com taxa de sobrevivência de 30%.

Para realizar seleção de plantas supostamente poliplóides, dentre todas as plantas sobreviventes após o tratamento foi realizada análise do tamanho dos seus estômatos (Tabela 1), onde se pode observar diferenças entre o comprimento e largura dos estômatos diplóides e as medidas do suposto poliplóide. Também se observou um número de estômatos menor por área de folha avaliada nos supostos poliplóides.

**TABELA 1** – Médias do tamanho dos estômatos em planta diplóide normal e suposto poliplóide

	Comprimento	Largura
Diplóide	16,71b	9,40b
Suposto poliplóide	23,88a	12,89a

Letras diferentes seguidas na coluna indicam diferença estatística pelo teste T ao nível de 5% de probabilidade.

Nas concentrações de 0,01 a 0,005%, e o controle, houve 100% de sobrevivência das plântulas e nenhuma ação visual da colchicina. Assim, foi possível estabelecer o limite entre uma concentração que é letal, deforma e não deforma plântulas (0,03%) e uma concentração em que a colchicina não apresenta nenhum tipo de ação visual nestas, ou seja, 100% de sobreviventes (0,01%). Então, testou-se uma concentração intermediária de 0,02% que também apresentou efeito nítido da colchicina. Assim, realizou-se análise via contagem de cromossomos das metáfases mitóticas para indicar o nível de ploidia e resultados preliminares demonstraram que a planta tratada com colchicina a 0,02% apresenta um número maior de cromossomos que o normal de 18 cromossomos que possui a espécie.

### Discussão

A ação da colchicina em algumas concentrações causou letalidade e provocou a formação de calo nas regiões meristemáticas das plântulas. HOFMEYR (1942) tratou plântulas de mamoeiro com solução de colchicina (0 a 0,5%) e também observou que algumas concentrações foram letais e as concentrações mais efetivas variaram de 0,06% a 0,1%. Enquanto SOUZA (1999) induziu poliploidia em melancia em uma concentração ideal de 0,2% de colchicina por 24 horas.

Nas concentrações de 0,2 até 0,05% de colchicina, onde não houve nenhuma plântula sobrevivente, verificou-se que as concentrações mais severas (0,2% e 0,1%) provocaram a formação de grandes tumores nos meristemas radiculares e no hipocótilo paralisando o desenvolvimento das plântulas.

A concentração de 0,07% apresentou plântulas com tumores menores e certo desenvolvimento do sistema radicular, em algumas plântulas. Na concentração de 0,05% de solução de colchicina, foram verificados

tumores ainda menores, e plântulas já apresentavam maior desenvolvimento radicular. Não houve nenhuma plântula sobrevivente. Porém, foi apresentado maior desenvolvimento das mesmas.

A concentração de 0,03% teve efeito nítido da colchicina, apresentando desde plântulas mortas, plântulas anãs deformadas, plântulas muito inchadas com folhas deformadas, plântulas sem inchaço com folhas deformadas, plântulas com calos e plântulas aparentemente normais. HOFMEYR (1942) também observou algumas anormalidades em plantas adultas tratadas com colchicina como nanismo, esterilidade e algumas irregularidades meióticas.

Apenas uma planta com 10 meses de idade, supostamente poliplóide, desenvolveu e está sendo mantida no campo, no entanto ainda não floresceu, o que pode ser devido a ação da colchicina já que o mamoeiro floresce em menos de 6 meses após a germinação. Pela análise do tamanho dos estômatos pode-se observar que a média do comprimento e largura dos estômatos do suposto poliplóide foi maior (23,88  $\mu\text{m}$  x 12,89  $\mu\text{m}$ ) que a do diplóide (16,71  $\mu\text{m}$  x 9,40  $\mu\text{m}$ ), o que pode ser um indicativo da ação da colchicina na indução da poliploidia, já que a identificação de poliplóides pode ser realizada através da determinação do tamanho e da densidade de estômatos foliares (Aryavand *et al.*, 2003). Na análise via contagem de cromossomos, sendo as plantas tetraplóides, espera-se que as células contadas tenham 36 cromossomos, porém nas imagens obtidas das plantas tratadas na concentração de 0,02% não se conseguiu contar com precisão o número total de cromossomos. Desta maneira, não se pode afirmar se a indução de poliploidia foi eficaz, sendo necessário que mais metáfases mitóticas sejam analisadas para a confirmação da ação da colchicina.

## Conclusão

Com base nesses resultados preliminares conclui-se que a concentração de 0,03% e de 0,02%, de colchicina podem ser indutoras de poliploidia em um tempo de exposição de 12 horas; entretanto, outros produtos químicos, cujo efeito é semelhante ao da colchicina, devem ser testados, como a orizalina, visando a obtenção de um número maior de plântulas poliplóides.

## Referências

- Allard, R.W. Poliploidia induzida no melhoramento de plantas. In: Allard, R.W. Princípios do melhoramento de plantas. New York: J. Wiley, 1971. p.302-340.
- Aryavand, A.; Ehdai, B.; Tran, B.; Waines, J.G. (2003) Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. **Genetic Resources and Crop Evolution** 50: 175-182.
- Darlington C.D.; Ammal E.K.J. Chromosome atlas of cultivated plants. George Allen and Unwin LTD., London. 1945.
- Hofmeyr, J.D.J.; Van Elden, H. Tetraploidy in *Carica papaya* L. induced by colchicine. **South African Journal of Science** 33: 181-185, 1942.
- Media Cybernetis (2004) Image-Pro plus, version 5.1 for Windows. Media Cybernetics Inc, Maryland, USA.
- Souza, F.F; Queiroz, M.A.; Dias, R.C.S. (1999) Desenvolvimento e avaliação de híbridos triplóides experimentais de melancia. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento – Encarte Especial*, n.9, p.90-95.