

IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES SOMACLONAIS EM BANANEIRAS 'PRATA ANÃ', UTILIZANDO TÉCNICAS MOLECULARES E CITOGENÉTICAS¹

Identification of somaclonal variants in 'Prata Anã' banana using molecular and cytogenetic techniques

Nilson César Castanheira Guimarães², Paula Pereira Torga³, Eliane Cristina de Resende⁴, Antônio Chalfun Júnior⁵, Edílson Paiva⁶, Luciano Vilela Paiva⁷

RESUMO

Varição 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 submetido ao cultivo *in vitro*. Um problema específico envolvendo a variação somaclonal em bananeiras 'Prata Anã' foi observado em Andradas, Minas Gerais, em plantas oriundas de micropropagação. 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. Cento e três *primers* RAPD, 11 combinações de dois *primers* RAPD, e 33 pares de *primers* SSR foram utilizados na tentativa de se encontrar marcadores polimórficos capazes de distinguir 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 cromossômica das bananeiras, porém elas não foram eficientes na identificação de variantes somaclonais.

Termos para indexação: Variação somaclonal, bananeira, SSR, RAPD, citogenética.

ABSTRACT

Somaclonal variation is a phenotypical variation of genetic origin, that is, a chromosomal variation that becomes inheritable in the generations to follow, or of epigenetic origin, in this case being a transitory variation due to the physiological stress suffered when the material is submitted to *in vitro* cultivation. A specific problem involving somaclonal variation in 'Prata Anã' banana was observed in Andradas, Minas Gerais, in plants originated from tissue culture. The main difficulty in the distinction between 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 in their adult phase, which makes it impossible to eliminate the variant seedlings at the nursery stage. For the early distinction of the variants, molecular (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA and SSR – Simple Sequence Repeat) and cytogenetic (chromosome counting and flow cytometry) techniques were used. In the attempt to find polymorphic markers that distinguished the normal plants from the variants as well as the Prata cultivar from the Prata Anã cultivar, 103 RAPD primers, 11 combinations of two RAPD primers, and 33 pairs of SSR primers were used. Primer OPW-08 generated a polymorphic fragment that distinguished a variant from all of the other plants, proving that the variation does not occur uniformly in the genome of all variants, and that there is no return to Prata cultivar. Analyses with SSR markers and chromosome counting were not efficient in separating normal plants from variants or 'Prata' from 'Prata Anã'. Flow cytometry analyses showed an evident instability in the banana genome in terms of number of chromosomes, however, they were not efficient in identifying the somaclonal variants.

Index terms: Somaclonal variation, banana, SSR, RAPD, cytogenetics.

(Recebido em 19 de abril de 2005 e aprovado em 2 de outubro de 2006)

¹Trabalho realizado com bolsa da CAPES.

²Engenheiro Agrônomo, Mestre – Laboratório Nacional Agropecuário/LANAGRO – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA – Avenida Rômulo Joviano, s/n – Centro – 33600-000 – Pedro Leopoldo, MG – nilson.cesar@agricultura.gov.br

³Engenheira Agrônoma – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – paulaptorga@yahoo.com.br

⁴Química – Departamento de Química/DQI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – elianeresendec@yahoo.com.br

⁵Engenheiro Agrônomo, Pós-Doutorado, Professor – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – chalfunjunior@ufla.br

⁶Engenheiro Agrônomo, Pós-Doutorado, Pesquisador – Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo/CNPMS – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA – Rodovia MG 424 - Km 65 – Zona Rural – Cx. P. 151 – 35701-970 – Sete Lagoas, MG – edilson@cnpmc.embrapa.br

⁷Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor – Departamento de Química/DQI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – luciano@ufla.br

INTRODUÇÃO

Variabilidade genética tem sido observada em várias plantas durante a cultura de tecidos (REZENDE et al., 2008; SANTANA et al., 2008; LIMA et al., 2008). Esse fenômeno é normalmente chamado variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981), que 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 submetido ao cultivo *in vitro* (ILLG, 1990), variações essas existentes entre somaclones (soma = vegetativo; clone = cópia idêntica).

O advento das técnicas moleculares possibilitando detectar polimorfismos, em nível de DNA, tem gerado um grande número de marcadores para análises genéticas dos indivíduos (JEFFREYS et al., 1985; OLIVEIRA et al., 2007). Marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA) foram utilizados com sucesso na identificação de indivíduos variantes somaclonais de *Lolium sp.* (WANG et al., 1993), *Triticum sp.* (BROWN et al., 1993), beterraba (MUNTHALI et al., 1996), pêssego (HASHMI et al., 1997) e *Picea abies* (L.) Karst. (FOURRÉ et al., 1997). Em bananas da cultivar Cavendish (*Musa spp.* AAA), 66 *primers* aleatórios de RAPD foram utilizados no "screening" de uma população de plantas normais e variantes anãs, sendo que 19 *primers* revelaram polimorfismo entre as plantas anãs e as normais (DAMASCO et al., 1996).

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). Em *Populus tremuloides*, dez pares de *primers* SSR (Simple sequence repeat) foram utilizados visando a detecção de variantes somaclonais oriundos da cultura *in vitro*. Dois *primers* foram eficientes na separação dos indivíduos variantes daqueles normais (RAHMAN & RAJORA, 2001).

Os estudos de cariótipo de bananeira têm sido bastante dificultados em função de os cromossomos serem muito pequenos, impossibilitando, na prática, uma caracterização estrutural. 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, 1995; CARVALHO & SARAIVA, 1993).

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. A análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear é uma excelente alternativa aos métodos clássicos de contagem cromossômica (LOUREIRO & SANTOS, 2004).

Objetivou-se, neste trabalho, identificar variantes somaclonais de bananeiras, utilizando técnicas moleculares (RAPD e SSR) e citogenéticas (citometria de fluxo e contagem cromossômica). A escolha dessas técnicas como preferenciais para esse tipo de trabalho foi baseada em trabalhos anteriores e nos resultados obtidos ao longo do presente trabalho.

MATERIALE MÉTODOS

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 das plantas normais. 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, sendo que as mudas que deram origem às bananeiras foram adquiridas junto à empresa. Esses 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.

Extração e quantificação do DNA genômico

O protocolo utilizado foi baseado no proposto por Romano (1998), com modificações importantes para adequá-lo ao DNA de bananeira. Para a extração do DNA, cerca de 1 g de tecido foliar fresco foi triturado em N₂ líquido, utilizando-se pistilo e almofariz, até que fosse obtido um pó bastante fino. Em seguida, o material foi transferido para microtubos gelados, e esses foram preenchidos até a metade com o pó macerado. Em seguida, 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 mistura-

dos ao triturado foliar. Essa 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 esse 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. Foi 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 µL 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°C. Após esse período, a solução foi centrifugada a 18.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado por inversão. 300 µL de etanol 70% gelado foram adicionados e o tubo foi levemente girado para que o pellet e as paredes fossem lavados. O microtubo foi centrifugado a 18.000 x g por 3 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. O pellet foi então seco em câmara de fluxo laminar por 1 a 2 horas, e ressuspenso em 47,5 µL de tampão 0,01 mol/L Tris-HCl pH 8,0 adicionado de 2,5 µL 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 µg/mL) por 15 minutos, lavado por 10 minutos em água corrente, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak®). A quantificação por densidade ótica a 260 nm de comprimento de onda (λ) foi realizada em espectrofotômetro Femto 700 plus (Femto®) e a medição da qualidade da amostra foi realizada pela medição da densidade ótica a 280 nm de λ . Para o cálculo da concentração de DNA na amostra, a seguinte fórmula foi utilizada: $[DNA]_{ng/\mu L} = 50 \mu g/\mu L \times CO \times FD \times A_{260}$ sendo $[DNA]_{ng/\mu L}$ = Concentração de DNA em ng/µL; CO =

Caminho ótico (cm); FD = Fator de diluição; A_{260} = Absorbância a 260 nm.

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 ng/µL, sendo que a solução estoque foi armazenada a -20°C e a solução de trabalho foi mantida a 4°C.

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°C por 1 minuto, seguido por desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°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°C por 7 minutos. O volume final de cada reação de amplificação foi de 10 µL, contendo 30 ng de DNA, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4, 50 mmol/L KCl, 1,5 mmol/L MgCl₂, 50 µmol/L de cada um dos dNTPs, 0,25 µmol/L do *primer* RAPD correspondente e 0,3 unidades (U) de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). 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 de fotodocumentação EDAS 290 (Kodak®).

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).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), e foi 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 MgCl₂, 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 de fotodocumentação EDAS 290 (Kodak®).

Preparo de lâminas e contagem cromossômica

Foram coletadas e lavadas em água, raízes com aproximadamente 1 cm de comprimento. Após a lavagem as raízes foram secas em papel de filtro, e transferidas para um frasco escuro, contendo a solução 8-hidroxiquinoleína a 0,029%, onde permaneceram por 7 horas. Em seguida, as raízes foram secas em papel de filtro, e transferidas para a solução metanol: ácido acético (3:1), onde permaneceram por 15 minutos, sendo logo após transferidas para nova solução metanol: ácido acético (3:1), onde permaneceram por 24 horas.

Após a fixação as raízes foram lavadas em água destilada por 15 minutos, sendo a água trocada a cada 5 minutos, e submetidas à maceração enzimática em solução de Pectinex® (onde para cada raiz a ser digerida foram colocados, em microtubo, 10 µL de enzima + 100µL de água destilada) em a 34°C, por cerca de 2 horas. Terminada a maceração, as raízes foram lavadas por 15 minutos em água destilada, trocando a água a cada 5 minutos, e então foram fixadas em solução metanol: ácido acético (3:1), onde permaneceram por 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 mantida 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 em placa aquecedora.

Citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no laboratório de citogenética do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. 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 esse triturado foram adicionados 500 µL de tampão DNA Staining Solution Partec®. 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. As preparações foram analisadas em um citômetro de fluxo modelo PAS III Partec®, 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação de variantes somaclonais com marcadores RAPD

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 1).

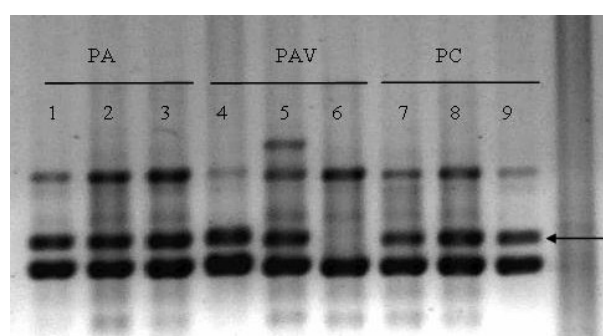


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras 'Prata Anã' (canaletas 1 a 3), 'Prata Anã' variantes somaclonais (canaletas 4 a 6) e 'Prata' (canaletas 7 a 9), amplificados com o uso do oligonucleotídeo OPW-08. A seta indica a banda polimórfica.

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 2), a mesma planta ‘Prata Anã’ variante somaclonal apresentou um padrão diferente das demais. A uniformidade fenotípica dos variantes aponta para uma alteração nesse indivíduo que não tenha afetado a sua morfologia.

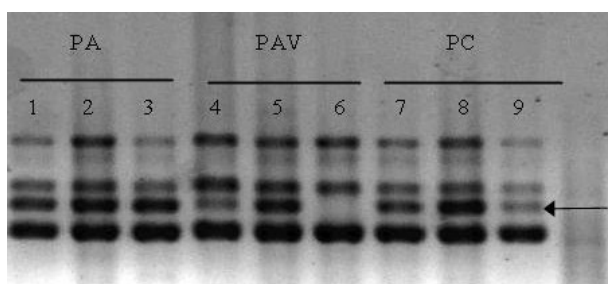


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras ‘Prata Anã’ (canaletas 1 a 3), ‘Prata Anã’ variantes somaclonais (canaletas 4 a 6) e ‘Prata’ (canaletas 7 a 9), amplificados com o uso dos oligonucleotídeos OPW-08 e OPA-01 em uma única reação. A seta indica a banda polimórfica.

Identificação de variantes somaclonais com marcadores SSR

Nenhum dos 33 pares de *primers* microsatélite utilizados nesse experimento forneceu bandas polimórficas, sendo portanto inviáveis na distinção entre os indivíduos normais e variantes. Também não foram eficientes na diferenciação de bananeiras da cultivar 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 dessas cultivares, inserindo-as no subgrupo ‘Prata’, apesar de ‘Prata Anã’ ser um mutante da ‘Branca’, não pertencendo ao subgrupo ‘Prata’. A falta de fragmentos polimórficos pode ser observada, por exemplo, ao se amplificarem as preparações de DNA com o par de *primers* Ma1/17 (Figura 3).

Preparo de lâminas e contagem cromossômica

As raízes coletadas a partir de plantas *in vitro* deram origem à lâminas de boa qualidade, com cromossomos bem centralizados na placa metafásica da célula, de fácil distinção e contagem (Figura 4).

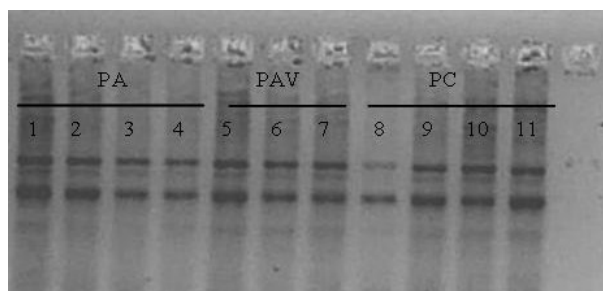


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA de bananeiras ‘Prata Anã’ (canaletas 1 a 4), ‘Prata Anã’ variantes somaclonais (canaletas 5 a 7) e ‘Prata’ (canaletas 8 a 11), amplificados com o uso do par de *primers* Ma 1/17.

O inconveniente dessas plântulas extremamente jovens é que é impossível afirmar se são realmente normais ou variantes, uma vez que nesse estágio é impossível a detecção daqueles caracteres morfológicos que são utilizados como base para a identificação daqueles indivíduos variantes somaclonais.

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, uma vez que 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 observa-se na Figura 4.

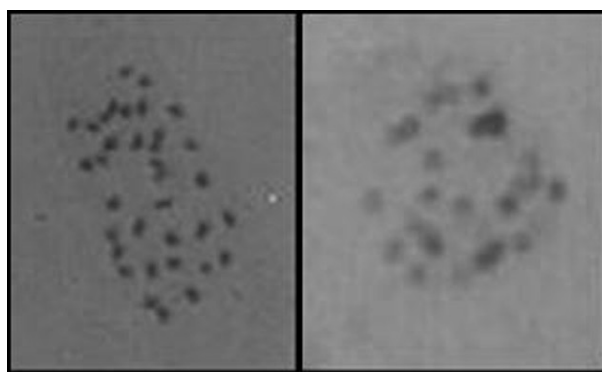


Figura 4 – Cromossomos de bananeiras ‘Prata Anã’ jovem (esquerda) e variante somaclonal adulta (direita) propagadas *in vitro*, em estágio de metafase da mitose, preparados pelo método de secagem ao ar.

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*. Na tabela 1 apresentam-se os resultados das análises.

Tabela 1 – Resultado da quantificação relativa do DNA de cada planta de bananeira 'Prata Anã', analisada por citometria de fluxo.

Tipo de bananeira da cultivar Prata Anã	Index ^a
Normal	1,25
Normal	1,21
Normal	1,00
Normal	1,26
Normal	1,00
Normal	1,25
Normal	1,04
Normal	1,22
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: ^a O INDEX corresponde ao valor de leitura no citômetro da quantidade de DNA, sendo que o INDEX 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 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.

CONCLUSÕES

Tanto os marcadores moleculares quanto as técnicas citogenéticas utilizados nesse estudo não foram eficientes na exata distinção dos indivíduos variantes

daqueles normais para esse 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. Como morfológicamente são idênticas, é provável que essa 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 dos indivíduos variantes dos normais, nas condições de amostragem do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Berlin, v. 237, p. 311-317, 1993.

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

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

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, p. 211-217, 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, p. 118-123, 1996.

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, p. 159-169, 1997.

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, p. 624-627, 1997.

- ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990. p. 287-295.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hipervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, London, v. 314, p. 67-73, 1985.
- 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**, Oxon, v. 7, p. 657-666, 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, p. 197-214, 1981.
- LIMA, E. C.; PAIVA, R. NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, A. A. N. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* BAILL. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan./fev. 2008.
- 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.
- 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, p. 474-478, 1996.
- OLIVEIRA, M. DO S. P. DE.; AMORIM, E. P.; SANTOS, J. B. DOS.; FERREIRA, D. F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n. 6, p.1645-1653, nov./dez. 2007.
- 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, p. 531-536, 2001.
- REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. DE. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n. 3, p.821-827, maio/jun. 2008.
- ROMANO, E. Extração de DNA em tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. p. 163-178.
- SANTANA, J. R. F. DE.; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M. DE.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n. 2, p. 640-644, mar./abr. 2008.
- SOUZA, S. A. C. **Avaliação da variabilidade genética em Musa spp. utilizando marcadores microssatélites**. 2002. 86 f. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.
- WANG, Z. Y.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. **Plant Science**, Amsterdam, v. 94, p. 179-193, 1993.