



Caracterização isoenzimática de clones de bananeira nanicão submetidos à salinidade¹



Cláudia Ulisses², Terezinha R. Camara³, Lilia Willadino⁴, Cynthia C. de Albuquerque²,
Luíza S. S. Martins⁴ & Nara S. A. de Freitas⁴

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada à UFRPE

² UFRPE. Programa de Pós-graduação em Botânica. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP 52171-900, Recife, PE. Fone: (81) 3302-13 64. E-mail: claudia@nlink.com.br (Foto)

³ UFRPE. Depto. de Química. Fone: (81) 3302-1364. E-mail: tcamara@novaera.com.br.

⁴ UFRPE. Depto. de Biologia. Fone: (81) 3302-1366. E-mail: lilia@truenet.com.br

Protocolo 123 - 15/8/2001

Resumo: O presente trabalho teve o objetivo de identificar possíveis variações isoenzimáticas em plantas de bananeira, provenientes de gemas da cultivar nanicão, submetidas à pressão de seleção *in vitro*, com 80 e 100 mol m⁻³ de NaCl. Após aclimatadas, as plantas foram transferidas para solo com diferentes níveis de salinidade do extrato de saturação do solo (CEe de 0,2, 7,0 e 14,0 dS m⁻¹) e cultivadas, durante 30 dias, em casa-de-vegetação. Em solo com CEe de 14,0 dS m⁻¹ as plantas não resistiram à salinidade. Dos sistemas isoenzimáticos analisados, apenas o sistema peroxidase apresentou atividade em todas as amostras de tecido foliar analisadas. As plantas regeneradas a partir de gemas submetidas ao estresse salino *in vitro*, apresentaram bandas anódicas e catódicas nos tratamentos com 0,2 e 7,0 dS m⁻¹, enquanto as plantas provenientes de gemas não tratadas em meio salino, apresentaram apenas bandas catódicas. Alterações em número e intensidade de bandas isoenzimáticas podem ser decorrentes de variações somaclonais induzidas pelo estresse salino imposto durante o cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: *Musa* spp, isoenzimas, peroxidase, variação somaclonal

Isoenzyme characterization of the clones of banana nanicão subjected to salinity

Abstract: This study is aimed to identify isoenzymatic variations in banana plants derived from buds of cultivar nanicão subjected to *in vitro* selection with 80 and 100 mol m⁻³ of NaCl. After acclimatization, plants were cultivated for 30 days in a greenhouse, under different levels of soil salinity of saturation extracts (ECe = 0.2, 7.0 and 14.0 dS m⁻¹). Plants cultivated in soil with 14.0 dS m⁻¹ did not resist the stress. Among the isoenzymatic systems evaluated, only peroxidase system showed activity in all the leaf samples. Plants regenerated from buds subjected to *in vitro* saline stress presented anodic and cathodic bands for treatments with 0.2 and 7.0 dS m⁻¹, while plants formed from buds grown on salt free medium showed only cathodic bands. Alterations of band number and intensity could be due to somaclonal variation induced by salt stress during *in vitro* culture.

Key words: *Musa* spp, isoenzymes, peroxidase, somaclonal variation

INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é a fruta de preferência mundial, motivo pelo qual se constitui numa das culturas mais exploradas no mundo e assume importância fundamental, pelo seu valor econômico e social. No Brasil, a região Nordeste é responsável por 38,52% da produção nacional de banana (Anuário Estatístico Brasileiro, 1997). Nos últimos anos, entretanto, tem sido registrada queda na produção dessa frutífera, em decorrência de diversos fatores, dentre eles a salinização do solo provocada, em maior parte, pela irrigação. Nas regiões áridas e semi-áridas o cultivo irrigado é uma

alternativa para garantir a produção no período da estiagem, mas o manejo inadequado do solo e da água pode resultar na salinização das terras antes produtivas. O desenvolvimento da bananeira é reduzido quando o cultivo é realizado em solos com condutividade elétrica do extrato saturado (CEe) maior que 3,0 dSm⁻¹ (Israel et al., 1986). Uma alternativa que possibilita a expansão do cultivo em áreas com problema de salinização, é a obtenção de cultivares adaptadas à essas condições.

O melhoramento de cultivares de bananeira de importância econômica visando a tolerância à salinidade do solo, depara-se com a esterilidade das cultivares comerciais, razão pela qual a técnica de seleção *in vitro* surge como alternativa biotecnológica.

lógica, uma vez que pode promover o aumento da variabilidade genética na forma de variantes somaclonais. A variação somaclonal tanto pode surgir a partir de fatores preexistentes na planta, como ser induzida durante a fase de cultivo *in vitro*. Essas variações podem determinar alterações no fenótipo e/ou genótipo dos indivíduos resultantes, podendo ser detectadas a partir de análise isoenzimática e de outros marcadores moleculares (Evans & Sharp, 1986; Skirvin et al., 1994).

Os sistemas isoenzimáticos constituem importante ferramenta bioquímica na identificação de híbridos inter-específicos e de variantes genéticos, bem como na detecção de alterações gênicas em plantas provenientes do cultivo *in vitro*. A presença ou ausência de bandas, assim como modificações na intensidade das mesmas, auxiliam de forma significativa na diferenciação isoenzimática de plantas (Jarret & Litz, 1986).

Variações nos padrões dos sistemas isoenzimáticos da peroxidase são freqüentes em plantas submetidas a estresses abióticos. O incremento da atividade dessas enzimas antioxidantes é fundamental para evitar danos a nível celular, provocados por espécies ativas de oxigênio (Sreenivasulu et al., 1999). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é seqüestrado pelas peroxidases e decomposto por meio da oxidação de co-substratos, como compostos fenólicos e/ou antioxidantes (Dionísio-Sese & Tobita, 1998). Plantas com altos níveis de antioxidantes, constitutivos ou induzidos, são reportadas como mais tolerantes a danos oxidativos (Dionísio-Sese & Tobita, 1998; Sreenivasulu et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi identificar possíveis variações isoenzimáticas em plantas de bananeira nanicao, provenientes de gemas submetidas à pressão de seleção *in vitro*, com 80 e 100 mol m⁻³ de NaCl.

MATERIAL E MÉTODOS

Trinta plantas de bananeira (*Musa spp*) provenientes de gemas submetidas à pressão de seleção *in vitro* com 80 e 100 mol m⁻³ de NaCl (Ulisses et al., 2000) e plantas micropropagadas em meio sem adição de NaCl (tratamento controle) foram transplantadas para potes plásticos, com capacidade para 300 mL, contendo uma mistura de solo e vermiculita (2:1) e aclimatadas em telado com sombrite 70%, pelo período de 30 d. Após a aclimação, as 30 plantas foram transferidas e mantidas, durante 30 d, em casa-de-vegetação. Foram estabelecidos três tratamentos, em função da condutividade elétrica do extrato saturado do solo (CEe: 0,2; 7,0 e 14,0 dS m⁻¹). A combinação desses níveis de salinidade do solo com os níveis de salinidade do meio seletivo (0, 80 e 100 mol m⁻³ de NaCl) do qual as plantas procediam, totalizaram 9 tratamentos. Foram mantidas 3 repetições nos tratamentos em solo com CEe de 0,2 e 7,0 dS m⁻¹, totalizando nove plantas em cada nível de salinidade, e 4 repetições no tratamento com CEe de 14,0 dS m⁻¹, totalizando 12 plantas. Após o período experimental, coletaram-se amostras de tecido foliar das plantas sobreviventes, para realização de análises isoenzimáticas.

Amostras de folhas jovens (0,5 g) foram maceradas, individualmente, até total homogeneização, em presença de 1,5 mL de uma solução extratora composta pelos tampões

borato de lítio e triscitrato, além de 300 mg de sacarose e 300 mg de polyvinylpyrrolidone (PVP). Após a homogeneização, os extratos foram colocados em tubos “eppendorf” e centrifugados a 12.000 x g durante 10 min, a 4 °C; em seguida, segmentos de papel Whatman nº 3, medindo 0,4 x 0,5 cm², foram embebidos nos extratos das amostras e aplicados em gel de poliacrilamida a 7% (Scandalios, 1969) em sistema de eletroforese horizontal e descontínuo. Após a aplicação das amostras nos géis, os retângulos de papel Whatman foram marcados com azul de bromofenol (1% m/v em álcool etílico); nas cubas, utilizaram-se soluções-tampão borato de lítio e triscitrato. Os géis foram postos a migrar a uma temperatura aproximada de 4 °C, até que a linha de frente atingisse 9 cm do ponto de aplicação das amostras. Durante a migração, utilizou-se uma corrente de 9,0 v cm⁻¹ e, após a corrida eletroforética, efetuou-se a revelação específica das proteínas para cada sistema isoenzimático. Foram analisados os sistemas peroxidase (POX), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT). Os protocolos de revelação foram baseados nos trabalhos de Poulik (1957) para POX e GOT, e de Scandalios (1969) para EST e ACP. Posteriormente, avaliou-se o número, a intensidade e a mobilidade relativa das bandas isoenzimáticas reveladas para a definição dos padrões das amostras utilizadas. Os valores de mobilidade relativa das bandas foram calculados dividindo-se a distância percorrida pela molécula protéica, desde o ponto de aplicação da amostra até a linha de frente, sendo o resultado multiplicado por 100 (Alfenas et al., 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 12 plantas submetidas ao cultivo em solo salino com CEe de 14,0 dS m⁻¹, não sobreviveram por mais de 7 dias ao tratamento salino. Por outro lado, das 9 plantas mantidas em solo com CEe de 7,0 dS m⁻¹, apenas três sobreviveram, das quais 2 provinham da seleção *in vitro* com 80 mol m⁻³ de NaCl e uma era proveniente da seleção com 100 mol m⁻³ de NaCl (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos clones sobreviventes após 30 dias de cultivo em solo salino (7,0 dS m⁻¹) e não salino (0,2 dS m⁻¹)

Genótipos	Pressão de Seleção <i>in vitro</i> (mol m ⁻³ NaCl)	CEe* (dS m ⁻¹)
A	80	0,2
B	100	0,2
C	80	0,2
D	80	7,0
E	80	7,0
F	100	0,2
G	100	7,0
T (controle)	0	0,2

* CEe: Condutividade elétrica do extrato saturado do solo

Alguns clones apresentaram sintomas de estresse salino e osmótico, tais como amarelecimento das bordas do limbo foliar e murcha das folhas, após 25 dias de cultivo em solo com a CEe de 7,0 dS m⁻¹. Esses sintomas foram bastante reduzidos no clone G, o qual foi procedente da pressão de seleção *in vitro* com 100 mol m⁻³ de NaCl.

No que se refere à análise dos sistemas isoenzimáticos ACP e GOT, não se constatou atividade nas amostras das plantas que sobreviveram ao tratamento salino com CEE de 7,0 dS m⁻¹, nem naquelas do tratamento com 0,2 dS m⁻¹. O sistema EST revelou-se com baixa intensidade de coloração, comportamento que conflita com os resultados de Bhat et al. (1992a) que observaram adequada resolução desse sistema em cultivares triplóides de bananeira, provenientes do cultivo *in vivo*, em ausência de NaCl. Esses resultados divergentes podem estar relacionados a variações resultantes do próprio processo de cultivo *in vitro*, fato este também comentado por Freitas (1997).

O sistema peroxidase apresentou atividade em todas as amostras analisadas, fenômeno também constatado por Bhat et al. (1992b) em bananeira triplóide cultivada *in vitro*. Jarret & Litz (1986) também apontam o sistema peroxidase como aquele de melhor resolução, permitindo distinguir entre diferentes grupos genômicos e entre cultivares de bananeira. Esse sistema isoenzimático pode ser utilizado, também, como indicador fisiológico de plantas estressadas por fatores bióticos ou abióticos (Lagrimini et al., 1990; Sherf & Kolattukudy, 1993). No presente trabalho, a presença de bandas de mobilidade catódica (POX 1 e POX 2) foi detectada exclusivamente nos somaclones selecionados *in vitro*, como tolerantes ao NaCl (Figura 1). A expressão específica de uma banda de peroxidase em genótipo tolerante à salinidade, também foi constatada em *Setaria italica* (Sreenivasulu et al., 1999). Além da presença de bandas de peroxidase exclusivas, é freqüente observar-se o aumento da atividade das peroxidases em cultivares tolerantes, como relatado para *Setaria italica* (Sreenivasulu et al., 1999) e *Morus alba* (Sudhakar et al., 2001). Trabalhos realizados com

suspensões celulares de *Licopersicon esculentum* adaptadas ao NaCl registraram o aumento da atividade das peroxidases inclusive no meio de cultura (Sancho et al., 1996). O incremento da atividade das enzimas peroxidases é fundamental no controle da ação de espécies de oxigênio reativas responsáveis pelo desequilíbrio metabólico decorrente de danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, comuns em condições de estresse salino (Dionisio-Sese & Tobita, 1998; Sreenivasulu et al., 1999; Yoshimura et al., 2000).

A diversidade na intensidade de coloração e na quantidade de bandas observadas neste trabalho é decorrente, provavelmente, de variações somaclonais ocorridas durante o processo de seleção *in vitro*. Tais diferenças confirmam a eficiência do processo seletivo utilizado *in vitro*, proporcionando o aumento de variabilidade gênica (Evans & Sharp, 1986) em clones de bananeira. A obtenção de variante somaclonal a partir de pressão de seleção *in vitro* já foi registrada para outras espécies, como a cultivar Andro flax de *Linum usitatissimum* (Rowland et al., 1989) que apresenta maior tolerância a ambientes salinos, e a cultivar GAC102 de *Sorghum bicolor* (Duncan et al., 1991) com tolerância a solos ácidos.

CONCLUSÕES

1. A pressão de seleção *in vitro* com 80 e 100 mol m⁻³ de NaCl, promoveu a tolerância de plantas de bananeira nãicão ao cultivo, por 30 dias, em solo com CEE de 7,0 dS m⁻¹.
2. Dentre os sistemas analisados o peroxidase foi o mais sensível às variações decorrentes da pressão de seleção *in vitro* com NaCl.
3. A presença de bandas anódicas do sistema isoenzimático peroxidase registrou-se exclusivamente em plantas oriundas de gemas submetidas à pressão de seleção com NaCl.

LITERATURA CITADA

- Alfenas, A.C.; Peters, I.; Brune, W. Eletroforese de proteínas isoenzimas de fungos e essências vegetais. Viçosa: UFV, 1991. 243p.
- Anuário Estatístico Brasileiro. Rio de Janeiro: IBGE, 1997. np.
- Bhat, K.V.; Bhat, S.R.; Chandel, K. P.S. Survey of isoenzyme polymorphism for clonal identification in *Musa*. I Esterase, acid phosphatase and catalase. Journal of Horticultural Science, Ashford Kent, v.67, p.501-507, 1992a.
- Bhat, K.V.; Bhat, S.R.; Chandel, K.P.S. Survey of isoenzyme polymorphism for clonal identification in *Musa*: II. Peroxidase, superoxide dismutase, shikimate dehydrogenase and malate dehydrogenase. Journal of Horticultural Science, Ashford Kent, v.67, p.737-743, 1992b.
- Dionisio-Sese, M.L.; Tobita, S.; Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. Plant Science, Strasbourg, v.135, p.1-9, 1998.
- Duncan, R.R.; Washom, R.M.; Miller, D.R.; Voigt, G.E.; Hanning, G.E.; Timm D.; Nabors, M.W. Registration of GAC 102: Acid soil tolerant hegari regenerant. Crop Science, Madison, v.31, p.1396-1397, 1991.

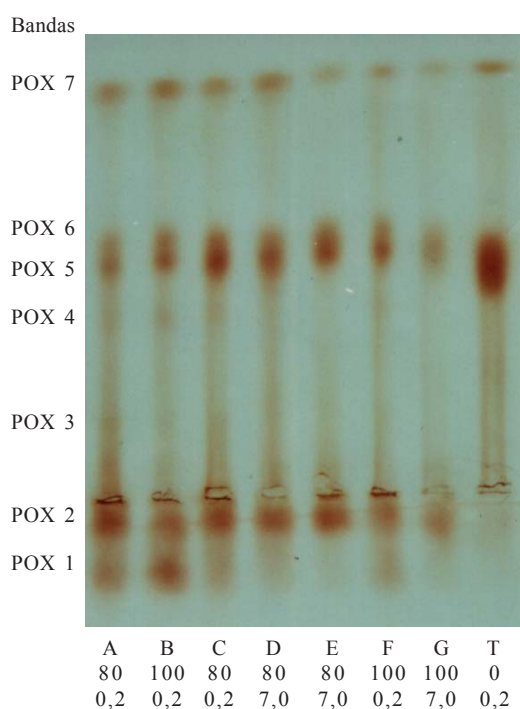


Figura 1. Padrões eletroforéticos de peroxidase (POX) do tecido foliar de plantas de bananeira provenientes de gemas submetidas à pressão de seleção *in vitro* com NaCl (80 e 100 mol m⁻³), e cultivadas em solo salinizado (CEE de 7,0 dS m⁻¹) e não salinizado (CEE de 0,2 dS m⁻¹)

- Evans, D.A.; Sharp, W.R. Somaclonal and gametoclonal variation. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. (Ed.). Handbook of plant cell culture. New York: MacMillan Publishing, v.4, p.97-132, 1986.
- Freitas, N.S.A., Avaliação de *Pennisetum purpureum* Schum. e seus híbridos com *P. americanum* (L.) Leeke, mediante padrões isoenzimáticos e variáveis morfofisiológicas. Recife: UFRPE, 1997. 102p. Dissertação Mestrado
- Israeli, Y.; Lahav, E.; Nameri, N. The effect of salinity and sodium absorption ratio in the irrigation water on growth and productivity of bananas under drip irrigation conditions. Fruits, Paris, v. 41, p.297-302, 1986.
- Jarret, R.L.; Litz, R.E. Isoenzymes as genetic markers in bananas and plantains. Euphytica, Dordrecht, v.35, p.539-549, 1986.
- Lagrimini, L.M.; Bradfords, S.; Rothstein, S. Peroxidase: Induced wilting in transgenic tobacco plants. The Plant Cell, Baltimore, v.2, p.7-18, 1990.
- Poulik, M.D. Starch gel eletrophoresis in a discontinuous system buffers. Nature, London, v.180, p.1477-1479, 1957.
- Rowland, G.G.; McHughen, A.; Bhatti, R.S. Andro flax. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v.69, p.911-913, 1989.
- Sancho, M.A.; Forchetti, S.M.; Pliego, F.; Valpuesta, V.; Quesada, M.A. Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, v.44, p.161-167, 1996.
- Scandalios, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. Biochemical Genetics, New York, v. 3, p.33-39, 1969.
- Sherf, B.A.; Kolattukudy, P.E. Developmentally regulated expression of the wound-and pathogen-responsive tomato anionic peroxidase in green fruit. Plant Journal, Stuttgart, v.3, p.829-933, 1993.
- Skirvin, R.M.; McPheeters, K.D.; Norton, M. Sources and frequency of somaclonal variation. Journal of Horticultural Science, Ashfort Kent, v.29, p.513-519, 1994.
- Sreenivasulu N.; Ramanjulu, S.; Ramachandra-Kini, K.; Prakash, H. S.; Shekar-Shetty, H.; Savithri, H. S.; Sudhakar, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. Plant Science, Strasbourg, v.141, p.1-9, 1999.
- Sudhakar, C.; Lakshmi, A.; Giridarakumar, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science, Strasbourg, v.161, p.613-619, 2001.
- Ulisses, C.; Camara, T.R.; Rocha, P.S.G. da; Willadino, L.; Albuquerque, C.C.; Meunier, I. Seleção in vitro de gemas de bananeira Nanicão tolerantes à salinidade. Scientia Agrícola, Piracicaba, v.57, p.667-670, 2000.
- Yoshimura, K.; Yabuta, Y.; Ishikawa, T.; Shigeoka, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology, Rockville, v.123, p.223-233, 2000.