

EFEITO DO NaCl SOBRE O CRESCIMENTO E A MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE BANANEIRA¹

CRISTIANE ELIZABETH COSTA DE MACÊDO², PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO³, GIOCONDA EMANUELLA DINIZ DE DANTAS MOURA⁴, MAGDY AHMED IBRAHIM ALLOUFA⁴

RESUMO - A salinidade dos solos é um importante fator de estresse, ocorrendo em regiões semi-áridas e áridas do Nordeste brasileiro, onde a bananeira é cultivada. O efeito de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) foi estudado sobre a multiplicação e o crescimento *in vitro* de brotos de bananeira da variedade “Grand Naine”, visando a uma posterior seleção *in vitro*. Brotos de bananeira foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog) na ausência de T0=0 (controle) e na presença de três tratamentos contendo NaCl: T1= 50mM; T2=75mM e T3=100mM e subcultivados cinco vezes nos seus respectivos tratamentos. Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias e observado o número de brotos multiplicados por broto inoculado em cada tratamento, a altura e o número de folhas dos brotos inoculados e a produção de matéria fresca aos 0; 30; 60; 90; 120 e 150 dias após a exposição ao sal. Os resultados mostraram que a adição de NaCl ao meio de cultura afetou a multiplicação *in vitro*, e que o aumento da concentração do sal é proporcional à diminuição do número de brotos produzidos. A multiplicação *in vitro* de brotos de bananeira foi reduzida em cerca de 80% na dose de 50mM e em cerca de 90% nas doses de 75 e 100mM. Nos tratamentos submetidos a 75 e 100 mM de NaCl, houve redução do número de folhas e também no crescimento dos brotos iniciais e na produção de matéria fresca. A melhor dose de NaCl entre as testadas e sob as condições experimentais utilizadas, para a realização de uma posterior seleção, foi 50mM por ter apresentado efeitos intermediários nos caracteres avaliados.

Termos para indexação: Musa sp, estresse salino, multiplicação *in vitro*

THE EFFECT OF NaCl ON THE GROWTH AND MULTIPLICATION OF BANANEIRA (*MUSA SP*) *IN VITRO*

ABSTRACT - Soil salinity is an important factor of stress that occurs in many semi-arid and arid regions of Brazil where the bananeira is cultivated. The effect of different sodium chloride (NaCl) concentrations, *in vitro*, on the growth and shoot multiplication derived from explants of “Grand Naine” variety was studied. The shoot-tips of the bananeira were inoculated in MS media in the absence: T0=0 (control) and in the presence of three NaCl treatments: T1=50mM, T2=75mM e T3=100mM and sub cultured five times in the respective treatments. The subcultures were carried out every 30 days and the number of shoots multiplied on each inoculated shoot, length and total number leaves of inoculated shoot and production of fresh weight were observed at 0; 30; 60; 90; 120 e 150 days after salt exposition. The results showed that the presence of NaCl in the media affects the shoot's production *in vitro*. The increase of NaCl concentration in the media is proportional to the decrease in the number of shoots produced. The multiplication of bananeira's shoot reduced about 80% in the treatment T1, while the treatments T2 and T3 achieved 90% of reduction. On the other hand the two saline treatments 75 and 100 mM interfered at the same form in the growth of shoots, production of fresh weight, length and total number of leaves. Under experimental conditions the best dose among the different sodium chloride was 50 mM because this dose showed intermediary effects on the characters evaluated.

Index terms: Musa sp, salt stress, *in vitro* multiplication.

INTRODUÇÃO

A salinidade dos solos é um dos maiores estresses abióticos que limitam a produção agrícola nas regiões de climas árido e semi-árido (Lutts, 1996). Fatores como temperatura elevada, baixa pluviosidade, drenagem deficiente e irrigação má conduzida estão relacionados à ocorrência de salinidade. Anualmente, 10 milhões de hectares de terras irrigadas são abandonados devido aos problemas de salinização e/ou sodificação. O Nordeste brasileiro apresenta uma área potencial de irrigação estimada em 6 milhões de hectares e atualmente 25% dos perímetros irrigados existentes na região Nordeste estão salinizados (Brito, 2002).

Os efeitos mais marcantes da salinidade sobre a planta refletem-se em alterações no potencial osmótico, na toxicidade iônica e no desequilíbrio da absorção dos nutrientes, provocando a redução generalizada do seu crescimento, com sérios prejuízos para a atividade agrícola (Távora et al., 2001). Entretanto, os limites de tolerância ao sal não são estanques. A resposta vegetal a condições de salinidade está relacionada à expressão de vários genes (Zhu, 2001), e cada espécie apresenta um grau de tolerância ao sal que depende da concentração e da natureza dos sais dissolvidos, de fatores climáticos, absorção de água e nutrição vegetal. Entre as espécies sensíveis ao sal, está a bananeira, que vem sendo amplamente cultivada em regiões áridas e

semi-áridas com o uso da irrigação. No Estado do Rio Grande do Norte (RN), esta espécie é cultivada pelos produtores rurais para seu uso familiar e comercial (Moura et al., 2003). A área de plantio desta fruteira de subsistência, para o pequeno agricultor, apresenta uma sensível diminuição em todo o Estado do Rio Grande do Norte devido à presença de sais no solo. As práticas de recuperação de solos com problemas acentuados de sais, em sua maioria, são onerosas e demoradas; daí uma maior necessidade de identificar culturas e cultivares tolerantes à salinidade (Araújo Filho et al., 1995). A seleção e a criação de variedades mais tolerantes aos sais são alternativas viáveis para contornar esse obstáculo imposto à bananicultura.

Programas de melhoramento genético da bananeira visando a uma maior resistência à salinidade são necessários para aumentar a produtividade dessa cultura e possibilitar a sua ocupação em áreas salinizadas que são constantemente abandonadas, sobretudo na região Nordeste. Variantes somaclonais (mutantes), fonte de variabilidade genética obtida *in vitro*, associada a uma pressão de seleção, vêm sendo largamente utilizadas como alternativa visando ao melhoramento de diferentes espécies face à salinidade (Purohit et al., 1998; Ulisses et al., 2000). Entretanto, antes de se realizar uma seleção *in vitro*, é necessário conhecer o grau de resistência da espécie estudada devido ao fator de estresse, determinando-se as doses do agente seletivo a serem adicionadas ao meio de cultura.

¹ (Trabalho 180/2004). Recebido: 22/11/2004. Aceito para publicação: 27/06/2005.

² Departamento de Biologia Celular e Genética – Centro de Biociências - Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Natal –RN, Câmpus Universitário, 59072-970; cristianemacedo@ufrnet.br

³ Embrapa Algodão, caixa Postal 174, 58107-720 Campina Grande – PB. pbarroso@cnpa.embrapa.br

⁴ Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia – Centro de Biociências - Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Natal –RN, Câmpus Universitário, 59072-970. allouffa@digicom.br (Prof. Magdy Alloufa), gioconda@hotmail.com.br (Estudante Graduação)

O objetivo deste trabalho foi, portanto, determinar a melhor dose de NaCl para realizar uma posterior seleção *in vitro* de plantas de bananeira mais tolerantes à salinidade. A dose escolhida não deveria provocar a morte dos brotos, mas induzir o aparecimento de sintomas visíveis da toxidez do sal, permitindo identificar aqueles possivelmente mais tolerantes pela ausência ou menor intensidade dos sintomas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os brotos de bananeiras obtidos a partir de explantes (gemas apicais retiradas dos ápices caulinares dos rizomas) da variedade "Grand Naine" foram inoculados em meio de cultura básico constituído pelos sais e vitaminas de Murashige & Skoog (1962), suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 g L⁻¹ de mioinositol e 5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminapurina (BAP); na ausência (T0 = controle) e na presença de 3 concentrações distintas de NaCl (T1=50; T2=75 e T3=100mM). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e geleificado com 6 g L⁻¹ de ágar-ágar antes da autoclavagem e, em seguida, distribuído igualmente em frascos (25 mL de meio/ frasco de 300 mL), em condições assépticas, na capela de fluxo laminar. Os níveis de NaCl que fizeram parte dos tratamentos, foram determinados com base na equivalência da condutividade elétrica (CEs) que mede o nível de salinidade no solo. Como no experimento o substrato utilizado tratava-se de meio sólido, usaram-se diferentes concentrações (g. L⁻¹) de NaCl equivalentes as suas respectivas CEs.

Os frascos contendo os brotos foram levados à sala de incubação, submetidos a um fotoperíodo de 12 h, sob iluminação de

2000 LUX e a uma temperatura em torno de 25°C. Os brotos foram então cultivados durante cento e cinquenta dias e, a cada trinta dias, os mesmos foram subcultivados nos respectivos tratamentos (0; 50; 75 e 100 mM de NaCl).

Avaliações mensais baseadas no número de brotos produzidos por broto inicial inoculado, altura (medida da base da inserção das folhas até a folha de maior comprimento do broto) e número de folhas do broto inicial e produção total de matéria fresca (peso do broto inicial mais brotos produzidos) foram feitas aos 0; 30; 60; 90 e 150 dias depois de iniciada a exposição ao sal. 150 dias após a inoculação, foi calculada a taxa de sobrevivência dos brotos nos diferentes tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento por blocos casualizados, com 2 repetições e doze brotos por unidade experimental. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância. O teste de Tukey foi realizado sempre que o teste *F* verificou diferenças significativas entre os tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de NaCl ao meio de cultura afetou de forma geral o crescimento, expresso pela altura, formação de novas folhas, multiplicação *in vitro* e a produção de matéria fresca dos brotos (Figura 1A-D). Sessenta dias após a inoculação, os brotos submetidos ao estresse salino apresentaram sintomas de toxidez tais como: folhas amareladas ou completamente necrosadas. Ao final de 150 dias, e na presença de 50; 75 e 100 mM de NaCl, a sobrevivência dos brotos iniciais foi comprometida, sendo a mesma reduzida cerca de 50%, nas

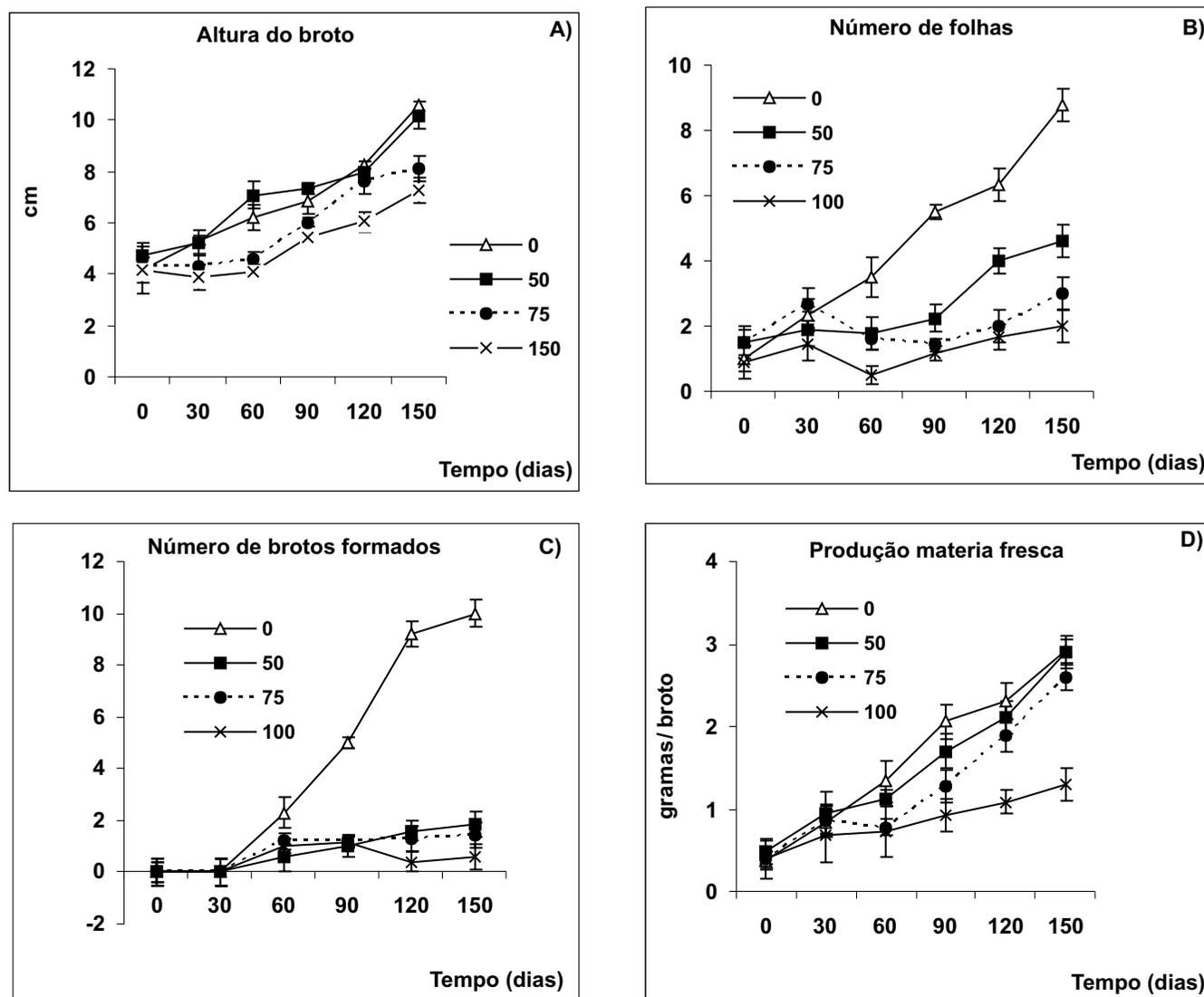


FIGURA 1 - Altura do broto inicial (A), número de folhas do broto inicial (B), número médio de brotos produzidos por broto inoculado (C) e produção de matéria fresca (D), em diferentes intervalos de tempo, na ausência (0 = controle) e em presença de NaCl no meio de cultura (50; 75 e 100 mM).

três concentrações de NaCl testadas em relação ao controle (Figura 2). De acordo com Zeng et al. (2002), geralmente a taxa de sobrevivência decresce com o aumento da salinidade. No caso da bananeira, a mortalidade foi significativa, independentemente do aumento da concentração de NaCl.

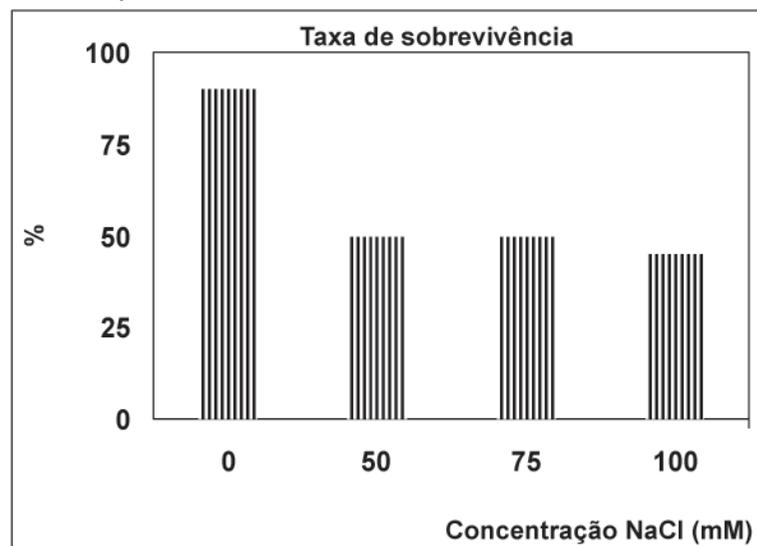


FIGURA 2 - Taxa de sobrevivência de brotos iniciais de bananeira, 150 dias após a inoculação, na ausência (0 = controle) e em presença de NaCl no meio de cultura (50; 75 e 100 mM).

TABELA 1 – Análise de variância das médias obtidas para os caracteres: altura do broto, número de folhas, número de brotos formados e produção de matéria fresca, 150 dias após o cultivo *in vitro*, na ausência (0) e presença de diferentes tratamentos de NaCl: T1= 50; T2 = 75 e T3= 100 (em Mm). ($p < 0,05$).

Caracteres	Comp. Tratam. 0 X 50 mM		Comp. Tratam. 0 X 75 mM		Comp. Tratam. 0 X 100 mM	
	Fcal	Prob	Fcal	Prob	Fcal	Prob
Altura do broto	0,79	0,400	1,03	0,340	6,03	0,04*
Número de folhas	4,69	0,060	15,83	0,004*	18,80	0,002*
Número de brotos formados	3,59	0,05*	14,11	0,005*	9,81	0,01*
Produção de matéria fresca	0,07	0,790	1,06	0,330	5,51	0,04*

Analisando-se a Figura 1A, observa-se que, com relação à altura dos brotos de bananeira, houve redução de suas médias à medida que se aumentou a concentração de NaCl no meio de cultura, sendo tal efeito mais evidente nas concentrações mais elevadas do sal. A elevação dos níveis de NaCl implica a redução do crescimento devido a diversos fatores, tais como: o efeito tóxico dos íons que foram absorvidos; o baixo potencial osmótico e hídrico das células; bem como a utilização de energia metabólica no processo de ajustamento osmótico. Resultados semelhantes foram encontrados em monocotiledôneas, como espécies de grama (Alshammery et al., 2004) e também em dicotiledôneas, como tomateiro (Romero-Aranda et al., 2001), e plantas de feijão (Gouia et al., 1994). A semelhança de tais resultados mostra que a redução do crescimento nos vegetais é uma resposta geral causada pela presença de sal no meio. Sob alta salinidade, a expansão celular pode ser reduzida pela acumulação de sais na parede celular, que pode reduzir o turgor e, conseqüentemente, o crescimento.

Com relação ao número de folhas, não só houve diferenças significativas entre os tratamentos salinos e o controle, como também foi observada menor produção do número de folhas em brotos submetidos a diferentes concentrações de NaCl no final do experimento, quando comparados ao controle (Figura 1B). Esses dados estão de acordo com os encontrados na literatura. Gouia et al. (1994), trabalhando

com feijão, e Romero-Aranda et al. (2001), em seus trabalhos com tomateiro, verificaram que o número de folhas é reduzido em proporção à concentração de NaCl. Essa redução pode ser devida à incapacidade de a planta produzir novas folhas mais rápido que a senescência (Muscolo et al., 2003), além da morte das folhas mais velhas por necrose de seus tecidos. No presente trabalho, não se pode descartar a possibilidade de esses diferentes eventos fisiológicos acontecerem concomitantemente ou individualmente, tudo dependerá do ou dos mecanismos de resistência ao sal que a bananeira possua na sua carga genética.

Apesar de a adição de NaCl ao meio de cultura afetar a multiplicação *in vitro*, os brotos iniciais conseguiram emitir novos brotos. Contudo, a capacidade de multiplicação em relação ao controle foi reduzida em cerca de 80% na dose de 50mM e em cerca de 90% nas doses de 75 e 100mM (Figura 1C). Dentre os prejuízos causados pelo estresse salino, estão o retardo ou a inibição no aparecimento das gemas e atrofiamento das mesmas, sendo, portanto, um efeito comum aos vegetais expostos ao sal.

A produção total de matéria fresca (broto inicial + brotos produzidos) foi afetada em relação ao controle, havendo decréscimo com o aumento da concentração salina (Figura 1D). Resultados semelhantes foram encontrados com tomateiro e com plantas de feijão (Cramer & Lips, 1995; Gouia et al., 1994). A redução da massa está positivamente correlacionada à redução do número de folhas, que leva à redução da área fotossintética e formação insuficiente de carboidratos para o crescimento (Muscolo et al., 2003). Neste trabalho, a redução da produção de matéria fresca está, provavelmente, relacionada não só à redução no número de folhas como também à redução na altura dos brotos. Sabe-se que a salinidade afeta reações metabólicas, como assimilação de CO₂, síntese de proteínas, respiração, reações enzimáticas e conversão de fitormônios (Shannon, 1997). Esses efeitos causam, entre outros, redução de disponibilidade de energia para manter o crescimento da planta a níveis satisfatórios (Munns & Termaad, 1986). Em suma, a adição de NaCl ao meio de cultura resultou em efeitos deletérios ao crescimento e à multiplicação *in vitro* de brotos de bananeira. Os efeitos foram menos intensos na dose de 50mM e maiores e similares entre si quando 75 e 100mM de NaCl foram adicionados ao meio de cultura.

Como a dose a ser escolhida não deve provocar a morte total dos brotos, mas induzir o aparecimento de sintomas visíveis da toxidez do sal, permitindo identificar aqueles mais tolerantes pela ausência ou menor intensidade dos sintomas, a dose de 50mM de NaCl seria a indicada para ser usada na seleção *in vitro* de plantas de bananeira mais tolerantes à salinidade.

CONCLUSÕES

As doses de NaCl adicionadas ao meio de cultura afetam negativamente o comportamento de brotos da bananeira Grand Naine cultivados *in vitro*. Os efeitos foram intermediários em 50mM e máximos em 75 e 100mM do sal. A dose indicada, entre as testadas e sob as condições experimentais utilizadas, para a realização do “screening” de somaclones mais tolerantes à salinidade, foi 50mM de NaCl.

REFERÊNCIAS

- ALSHAMMERY, S. F.; QIAN, Y. L.; WALLNER, S. J. Growth response of four turfgrass species to salinity. **Agriculture Water Management**, California, v.66, n.2, p.97-111, 2004.
- ARAÚJO FILHO, J. B.; GHEYI, H.R.; AZEVEDO, N. C. Tolerância da bananeira à salinidade em fase inicial de desenvolvimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.7, p. 989-997, 1995.
- BRITO, L.K.F.L. **Avaliação da resposta in vitro de duas variedades de abacaxizeiro (Ananas comosus (L.) Merr) a um segundo cultivo na presença de NaCl**. 2002. 63f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2002.

- CRAMER, M.D.M.; LIPS, S.H. Enriched rizosphere CO₂ concentration can ameliorate the influence of salinity on hydroponically grown tomato plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.94, p.425 - 432, 1995.
- GOUIA, H.; GHORBAL, M. H.; TOURAINE, B. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO₃ reduction rate within whole plants salt sensitive bean and salt tolerant cotton. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, s. n., p. 1.409 – 1.418, 1994.
- LUTTS, S. **Etude des mecanismes de resistance a la salinite chez le riz (*Oryza sativa* L.): variation somaclonale e strategie d'amelioration par utilisation des cultures *in vitro***. 1996. 379 f. These (doctorat) - Universite catholique de Louvain, Belgique, 1996.
- MOURA, G.E.D.; BENTO, D.M.; MARTINS, K.; MACEDO, C.E.C.; ALOUFA, M.A.I. Efeito do NaCl sobre a multiplicação *in vitro* de bananeiras da variedade Grand naine. In: ENCONTRO NACIONAL DE BIÓLOGOS, 5., 2003, Natal-RN. **Livro de resumos ...** v.1, p.74.
- MUNNS, R.; TERMAAD, A. Whole-plant responses to salinity. **Journal Plant Physiology**, Rockville, v.131, p.143 - 160, 1986.
- MURASHIGE T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.
- MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; SIDARI, M. Effects of salinity on growth, carbohydrate metabolism and nutritive properties of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hoscht). **Plant Science**, Limerick, v.164, p.1.103 – 1.110, 2003.
- PUROHIT, M.; PANDE, D.; ALI, G.; SRIVASTAVA, P.S. *In vitro* technology in the evaluation of salt tolerance. **Physiology Molecular Biology Plants**, Limerick, v.4, p.107-120, 1998.
- ROMERO-ARANDA, R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, Limerick, v.160, p.265 – 272, 2001.
- SHANNON, M. C. Adaptation of plants salinity. **Advances in Agronomy**, Newark, v.60, p. 75 – 120, 1997.
- TÁVORA, F. J. A. F. et al. Crescimento e relações hídricas em plantas de goiabeira submetidas a estresse salino com NaCl. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Cruz das Almas, v.23, n.2, p.441-446, 2001.
- ULISSES, C.; CÂMARA, T. R.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ROCHA, P. S. G.; ALBUQUERQUE, C. Seleção *In vitro* de gemas de bananeira “Nanicão” resistentes à salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p.667 – 670, 2000.
- ZENG, L.; SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameter. **Euphytica**, Dordrecht, v. 127, p.235 – 245, 2002.
- ZHU, J. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.6, n.2, p.66 – 71, 2001. (Footnotes)