



Variabilidade genética de genótipos de bananeira (*Musa* spp) submetidos ao estresse salino



Eline W. F. Gomes¹, Lilia Willadino², Luiza S. S. Martins², Sebastião de O. e Silva⁴ & Terezinha R. Câmara³

¹ UFRPE. Bolsista DCR - CNPq (Programa de Pós-graduação em Botânica-PPGB). CEP 52171-900 Recife, PE. Fone: (81) 33021366. E-mail: elinewaked@hotmail.com (Foto)

² UFRPE. Departamento de Biologia – Fisiologia Vegetal/Genética. CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil. Fone: (81) 3302-1366. E-mail: lilia@truenet.com.br; luizasemen@hotmail.com

³ UFRPE. Departamento de Química – Química Vegetal. CEP 52171-900. Recife, PE. Fone: (81) 3302-1366. E-mail: tcamara@novaera.com.br

⁴ EMBRAPA, Mandioca e Fruticultura - CNPMF, CP 007. CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. Fone: (75) 6212149. E-mail: ssilva@cnpmf.embrapa.br

Protocolo 58 - 2/4/2003 - Aprovado em 29/10/2004

Resumo: O Brasil é o segundo maior produtor mundial de bananas, sendo Pernambuco o estado que apresenta maior expansão da cultura na região do perímetro irrigado do Vale do São Francisco em cujas áreas, porém, são freqüentes os problemas de salinização do solo o que se pode tornar um fator limitante para a cultura. A utilização de cultivares tolerantes à salinidade apresenta-se como uma alternativa bastante viável; assim, identificar genótipos que se adaptem a solos salinos da Região Nordeste, é de fundamental importância para os programas de melhoramento. Este trabalho teve por finalidade utilizar marcadores moleculares, obtidos por amplificação de DNA via Reação em Cadeia polimerase (PCR) com iniciadores (primers) de RAPD, para determinar a variabilidade genética entre dez genótipos de banana (*Musa* spp): Pacovan, Nanicão, Caipira, FHIA18, Calcuttá, SN/2, Borneo, M-53, Microcarpa e Lidi, correlacionando-os com a tolerância ao estresse salino. Foram testados 25 primers. O iniciador D0142A07 gerou o maior número de loci polimórficos, enquanto o D0142B05 originou o menor. Em geral, o polimorfismo gerado com os marcadores de DNA mostrou que, apesar da base genética estreita, no caso das que são formadas pelo mesmo grupo genômico, os genótipos de bananeira apresentam variabilidade genética relativamente alta. As variedades que apresentaram maior tolerância ao estresse salino, como a Pacovan e SN/2, mostraram-se distantes geneticamente, quando comparadas com as mais sensíveis ao sal, como Calcuttá e Lidi.

Palavras-chave: salinidade, RAPD, banana

Genetic variability of banana (*Musa* spp) genotypes subjected to saline stress

Abstract: Brazil is the second largest banana producer. The State of Pernambuco has presented the greatest expansion of banana cultivation in the irrigated perimeters of the São Francisco Valley. In these areas, however, there are frequent problems with high salt content in the soil, which could turn out to be a major limiting factor to its cultivation. The utilization of cultivars tolerant to saline conditions is a rather viable alternative. Thus, identifying genotypes that adapt to the saline soil in the northeast region is fundamental for the genetic improvement. The objective of this study was to utilize molecular markers, obtained by the amplification of DNA via PCR with RAPD primers, in order to assess the genetic variability among ten banana genotypes (*Musa* spp): Pacovan, Nanicão, Caipira, FHIA18, Calcuttá, SN/2, Borneo, M-53, Microcarpa and Lidi, correlating their tolerance to saline stress. Twenty five primers were tested. The D0142A07 primer generated the greatest number of polymorphic loci, while the D0142B05 generated the lowest. In general, polymorphism generated with the DNA markers showed that, despite the narrow genetic base of those formed by the same genomic group, the banana genotypes exhibited a relatively high genetic variability. The varieties of higher tolerance to saline stress, such as Pacovan and SN/2, proved to be genetically distant when compared to the most salt sensitive, such as Calcuttá and Lidi.

Key words: salinity, RAPD, banana

INTRODUÇÃO

A cultura da bananeira (*Musa* spp) é de grande importância na economia mundial, razão por que é cultivada em mais de 100 países, apresentando produção anual superior a 64 milhões de toneladas. O Brasil é o segundo maior produtor de bananas, produzindo 6,4 milhões de toneladas de frutos numa área colhida de 624 mil hectares (FAO, 2002) e, entre as frutas tropicais, é a que apresenta o mais alto índice de consumo per capita. Na Europa, o consumo é de 9,0 kg por habitante ano enquanto no Brasil é de 20,0, sendo considerada a fruta de maior consumo entre os brasileiros (Souza & Torres Filho, 1999; Rosa Júnior, 2000).

A bananeira é cultivada em todos os Estados brasileiros, sobressaindo-se o Pará como maior produtor, com 771.500 t de frutos, seguido por São Paulo (640.000 t) e Bahia (517.270 t). Pernambuco ocupa a sexta posição, com 360.000 t de bananas produzidas (IBGE, 2002).

Em Pernambuco, a região do perímetro irrigado do Vale do São Francisco apresenta maior expansão da cultura, com 5.500 ha cultivados e uma estimativa, para o ano 2005, de 9.000 ha (França, 1998); no entanto, essas áreas são propícias à salinidade devido ao manejo deficiente do conjunto água-solo, assim como à qualidade da água e, ainda, às condições de alta evaporação e baixa pluviosidade características da região. A salinidade dos solos é um dos fatores limitantes da cultura da bananeira em virtude da diminuição do potencial osmótico da solução do solo e/ou dos efeitos tóxicos de alguns constituintes iônicos sobre os diversos processos fisiológicos das plantas (Marschner, 1990). A utilização de cultivares tolerantes a tais condições tem-se mostrado uma alternativa viável para a utilização de áreas salinizadas, por se tratar de uma opção de baixo custo e retorno imediato ao agricultor.

O programa de melhoramento genético do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical da EMBRAPA, objetiva desenvolver genótipos produtivos, resistentes a pragas e doenças, e com ciclo precoce, mediante cruzamentos entre genótipos diplóides (AA), que contribuem com genes de resistência às diversas doenças e com características agrônomicas favoráveis, além de genótipos triplóides (AAB) atualmente cultivados no Brasil (Silva et al., 1999). Segundo Silva (2000) os avanços em programas de melhoramento de bananeira por hibridação, seja para obtenção de híbridos comerciais triplóides ou tetraplóides, dependem basicamente da qualidade dos parentais diplóides, em virtude de seu papel fundamental na incorporação de valores agrônomicos. Desta forma, identificar genótipos tolerantes à salinidade é de fundamental importância para cruzamentos que visem à obtenção de variedades adaptadas aos solos salinos da Região Nordeste.

A tolerância à salinidade é uma característica controlada por grande número de genes (herança poligênica) que interagem e contribuem, individualmente, com pequeno efeito no fenótipo (Hurkman, 1992; Jain, 1993; Zhu, 2000). Nestas condições, a identificação de marcadores ligados a esta característica, torna-se tarefa difícil, levando-se em conta que a bananeira apresenta um genoma de 537 a 615 Mpb (Lysák, 1999); entretanto, pesquisas em que se utilizaram marcadores moleculares de

DNA na caracterização genética de variedades, possibilitam identificação de germoplasma, seleção de progenitores, predição de heterose, mapeamento de caracteres quantitativos e exploração de loci homólogos em outras espécies, através do mapeamento comparativo, o que permitirá, em trabalhos futuros, mapear os genes ligados à tolerância a salinidade em bananeira.

Nos últimos dez anos, técnicas que possibilitam fazer-se distinção diretamente a nível de DNA, têm permitido, também, que se identifique a variabilidade genética dentro do estoque gênico de espécies cultivadas e avaliar a diversidade disponível em bancos de germoplasma. A técnica que se baseia na detecção de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), usando-se oligonucleotídeos decâmeros (dez bases), desenvolvida por Williams et al. (1990), Welsh & Mc Clelland (1990) e Caetano-Anollés et al. (1991), tem-se mostrado eficiente na identificação da variabilidade genética em diversos grupos de plantas, motivo pelo qual vem sendo usada como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento. Esta técnica é também aplicada para obtenção de mapas genéticos (Carrel, 1999; Lagoda, 1999) e identificação de marcadores moleculares úteis na seleção (Milach, 1998). As vantagens do uso desta tecnologia residem no fato de existir um número praticamente ilimitado desses marcadores, os quais não estão sujeitos a efeitos pleiotrópicos, epistáticos ou ambientais apresentando, assim, vantagens em relação a outros marcadores, como os isoenzimáticos ou morfológicos e podem ser determinados em qualquer tipo de tecido ou estágio de desenvolvimento da planta.

A caracterização molecular da diversidade genética pode fornecer dados úteis ao melhorista para a seleção de indivíduos em programas de melhoramento, possibilitando cruzamentos de materiais divergentes, objetivando-se a maximização da distância genética com a finalidade de recombinar genes, ou complexos gênicos, reunindo-os em novas combinações gênicas favoráveis. Marcadores RAPD foram usados por Gawel & Jarret (1991), Bhat & Jarret (1995), Carneiro (1997) e Paz (2000), dentre outros autores, com vistas a se detectar variabilidade genética entre grupos genômicos de *Musa* spp.

Howell et al. (1994) investigando a aplicabilidade de marcadores moleculares RAPD na caracterização de nove genótipos de *Musa* com genomas AA, AAA, AAB, ABB e BB, verificaram alto grau de polimorfismo e constataram que apenas um dos primers usados seria suficiente para caracterizá-los demonstrando, assim, que nem sempre é necessário se utilizar grande número de iniciadores para avaliar a diversidade genética em germoplasma de bananeira.

Com o presente estudo, objetivou-se utilizar marcadores moleculares obtidos por amplificação de DNA via PCR, com iniciadores (primers) de RAPD, para identificar a variabilidade genética entre dez genótipos de banana (*Musa* spp) correlacionando-os com tolerância ao estresse salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de plantio e genótipos avaliados

Implantaram-se dois experimentos para se avaliar o efeito fisiológico-químico de três níveis de NaCl (0, 50 e 100 mM) em

genótipos de bananeira, em casa-de-vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O primeiro, envolvendo os genótipos: Calcuttá (diplóide selvagem do grupo genômico AA, muito utilizado em programas de melhoramento); as variedades comerciais Pacovan (triplóide do grupo genômico AAB e pertence ao subgrupo Prata) e Nanicão (triplóide AAA, pertencente ao subgrupo Cavendish); Caipira (triplóide AAA) e FHIA 18 (tetraplóide AAAB) que são cultivares indicadas pela EMBRAPA em virtude das suas características agrônomicas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. No segundo experimento foram avaliados os genótipos diplóides (AA) Calcuttá, Borneo, Lidi, SN⁰/2, Microcarpa e M-53 (Tabela 1) e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

Tabela 1. Genótipos diplóides AA provenientes do banco ativo de germoplasma de bananeira da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura e suas respectivas origens

Nome do Genótipo	Origem	Características*
Calcuttá	Jamaica	DS S
Borneo	Jamaica	DS S
Lidi	Honduras	DS P
SN ⁰ /2	Nova Guiné	DS P
Microcarpa	Tailândia	DS P
M-53	Equador	DM P

* Características: DS - Diplóide Simples; DM - Diplóide Melhorado; S - Produz Semente; P - Partenocárpico

As mudas, provenientes de cultura de tecido e adquiridas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de banana do Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura Tropical, da EMBRAPA, foram plantadas em sacos de polietileno contendo 10 kg de areia lavada. A condutividade elétrica da solução nutritiva dos três tratamentos foi monitorada e mantida na faixa de aproximadamente 1,3-1,7; 6,5-6,8 e 11,3-11,7 dS m⁻¹, correspondendo às concentrações de 0, 50 e 100 mM de NaCl. Utilizou-se irrigação por gotejamento (0,6 L por planta dia) com solução nutritiva composta de 742 mg L⁻¹ de fertilizante solúvel (marca Kristalon com 3% N, 11% P₂O₅, 38% K₂O, 4% MgO, 11% S e micronutrientes) e Nitrato de Cálcio (marca Barco Viking com 15,5% N e 19% Ca) na dose de 840 mg L⁻¹ do produto. Após 21 dias de tratamento avaliaram-se os seguintes parâmetros: área foliar e teores de Na⁺ e Cl⁻ no limbo foliar, pseudocaule e raízes+rizoma.

Análises de RAPD

Extração de DNA: A coleta das terceiras folhas das plantas foi feita aos 21 dias após a diferenciação dos tratamentos. Cerca de 300 mg do limbo foliar foram congelados a -80 °C e macerados em almofariz de porcelana, em nitrogênio líquido, segundo metodologia adaptada de Doyle & Doyle (1990). Ao material macerado adicionaram-se 800 µL de tampão de extração (contendo CTAB 5%; NaCl 5M; EDTA 0,5M; Tris-HCl 1,0M, pH 8,0; PVP 1%; β-mercaptoetanol e H₂O). As amostras foram aquecidas a 65 °C, em banho-maria, durante 40 min efetuando-se, em seguida, duas lavagens com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para remoção de proteínas, em centrifuga, durante 5 min, a 14.000 rpm; posteriormente, recuperou-se a

fase aquosa e se adicionou álcool isopropílico na proporção de 2/3 do volume inicial, para precipitação dos ácidos nucleicos. Após 2 h de repouso a solução foi centrifugada durante 10 min, a 14.000 rpm, cujo precipitado seco foi ressuspenso em 300 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM ajustado a pH 8,0) contendo RNase (40 µg mL⁻¹), a 37 °C, por 30 min. O DNA foi então reprecipitado, adicionando-se-lhe NaCl 5M na proporção 1:10 (NaCl : DNA ressuspenso) e 2/3 do volume de isopropanol, incubado a -20 °C, durante 3 h para, em seguida, ser centrifugado durante 10 min, a 14.000 rpm. O precipitado de DNA seco foi outra vez ressuspenso em tampão TE. A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram avaliadas pela eletroforese de 10 µL de solução de cada amostra, em um minigel de agarose a 0,8%, e a 80 V, pelo tempo de 30 min, corado com Brometo de etídio e visualizado em ultravioleta.

Reações de amplificação: Na rotina das análises utilizaram-se volumes finais de 25 µL, que continham os seguintes componentes: DNA (2,5 ng µL⁻¹); cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (0,1 mM); MgCl₂ (2,0 mM); Tris-HCl (10 mM), pH 8,3; um oligonucleotídeo iniciador (0,4 mM) (Gibco BRL) e uma unidade e meia de Taq polimerase (Williams et al., 1990, com modificações). Foram empregados 25 oligonucleotídeos iniciadores, conforme a Tabela 2.

As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador M.J. Research, Inc. (USA) PCR, modelo PTC-

Tabela 2. Relação dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) e suas seqüências

Primers	Seqüências
D0142A 01	AGTCAGCCAC
D0142A02	GTGATCGCAG
D0142A03	CAATCGCCGT
D0142A04	TCGGCGATAG
D0142A05	CAGCACCCAC
D0142A06	TTCCGAACCC
D0142A07	GACCGCTTGT
D0142A08	AGGTGACCGT
D0142A09	CFGCTGGGAC
D0142A10	GTGTGCCCCA
D0142A11	TCAGGGAGGT
D0142B01	GAGCCCTCCA
D0142B02	AGCGTGTCTG
D0142B03	CTGACGTCAC
D0142B04	TGCCCGTCGT
D0142B05	TCGGACGTGA
D0142B06	AGACGTCCAC
D0142B07	ACGCGCATGT
D0142B08	CTGACCAGCC
D0142B09	GGAAGTCGCC
D0142B10	GAAACACCCC
D0238C02	AATCGGGCTG
D0238C03	GAACGGACTC
D0238C04	AAAGCTGCGG
D0238C05	GACGGATCAG

100, utilizando-se um programa composto por 40 ciclos de uma etapa de desnaturação a 94 °C, durante 15 s, uma etapa de anelamento do iniciador ao DNA molde a 35 °C, por 30 s, e uma etapa de extensão a 72 °C, pelo tempo de um minuto; por fim, utilizou-se um ciclo final de 72 °C, por 7 min. Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese, a 100 V por 4 h, em gel de agarose 1,2%, contendo 10 µg mL⁻¹ de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com câmera Polaroid.

Os produtos de amplificação (bandas de DNA) foram tabulados conforme a presença (1) ou ausência (0). As similaridades genéticas entre os genótipos foram estimadas através do coeficiente de Dice (equivalente ao índice de Nei & Li, 1979), no programa NTSYS – pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versão 1,70, Exeter software, N.Y., USA). O dendrograma foi construído no programa NTSYS – pc usando-se a opção UPGMA (“Unweighted Pair – Group Method, Arithmetic Average”).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos vinte e cinco primers testados, vinte e três forneceram produtos nítidos de amplificação (D0142A01, D0142A02, D0142A03, D0142A04, D0142A05, D0142A06, D0142A07, D0142A08, D0142A09, D0142A10, D0142B01, D0142B02, D0142B03, D0142B04, D0142B05, D0142B06, D0142B07, D0142B08, D0142B09, D0142B10, D0238C02, D0238C03, D0238C04) e foram considerados neste trabalho para o cálculo de similaridade genética entre os genótipos. O padrão eletroforético obtido com primers de RAPD é ilustrado na Figura 1.

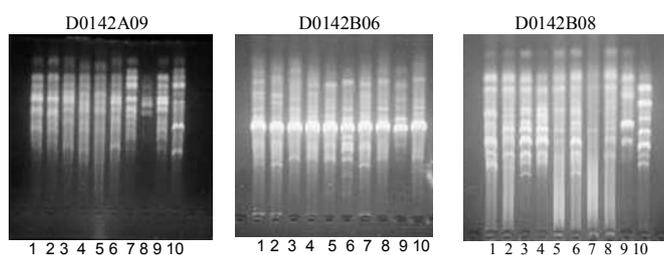


Figura 1. Padrões eletroforéticos obtidos pela amplificação do DNA em genótipos de *Musa* spp: Pacovan (1), Nanicão (2), Caipira (3), FHIA18 (4), SN/2 (5), Borneo (6), Microcarpa (7), M-53 (8), Calcuttá (9) e Lidi (10)

Primeiro experimento: Caracterização dos genótipos Calcuttá, Pacovan, Nanicão, Caipira e FHIA 18

Foram amplificadas 354 regiões de bandas das quais 7 (1,9%) loci monomórficos e 347 (98,1%) polimórficos obtendo-se, em média, 15,4 loci por primer. O iniciador D0142A07 originou o maior número de loci polimórficos, no total de 22, enquanto o iniciador D0142B05 gerou apenas 7 loci polimórficos.

De acordo com os dados gerados entre os genótipos testados, tomados 2 a 2 (Tabela 3), o par mais próximo geneticamente foi o tetraplóide FHIA 18 e o triplóide Nanicão, com grau de similaridade 0,764 (76,4%), enquanto os mais distantes foram o diplóide Calcuttá e o triplóide Pacovan, com grau de similaridade 0,467 (46,7%).

Tabela 3. Similaridades genéticas entre os genótipos: Nanicão, Pacovan, Caipira, Calcuttá e FHIA 18, estimadas através do coeficiente de Dice

Genótipos	Pacovan	Nanicão	Caipira	FHIA 18	Calcuttá
Pacovan	-				
Nanicão	0,578	-			
Caipira	0,627	0,667	-		
FHIA 18	0,587	0,764	0,738	-	
Calcuttá	0,467	0,545	0,505	0,564	-

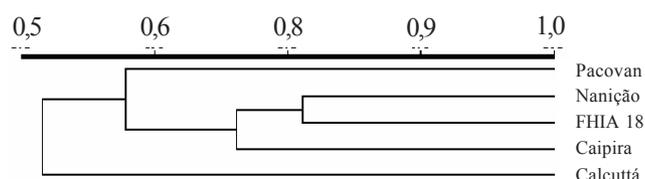


Figura 2. Dendrograma dos genótipos de *Musa* spp, construído a partir dos produtos de amplificação obtidos com os primers de RAPD, usando-se o método de agrupamento UPGMA

O dendrograma construído permitiu a identificação de dois grupos, um formado pelo genótipo Calcuttá e o outro composto pelos três subgrupos: Pacovan; Nanicão e FHIA 18; Caipira (Figura 2).

Correlacionando-se os dados do efeito do NaCl nas variedades estudadas (Tabelas 4 e 5) constata-se que a análise de agrupamento separou os genótipos Pacovan, Nanicão, FHIA 18 e Caipira, do genótipo Calcuttá, mais sensível à salinidade e que apresentou elevada redução da área foliar (49,64%) e o maior teor de sódio e cloro nas folhas, no tratamento com 100 mM. Esta variedade apresentou, também, teor de sódio nas folhas, oito vezes superior ao controle, demonstrando ausência de habilidade em regular a concentração de sódio neste órgão.

Com relação ao cloro, ocorreu aumento da concentração deste íon em todos os genótipos, em função do incremento da salinidade, com destaque para o diplóide Calcuttá que apresentou a mais alta concentração de cloro quando submetido ao tratamento com 100 mM. As variedades Pacovan, Caipira e FHIA 18 mantiveram os mais baixos níveis deste ânion nas

Tabela 4. Área foliar de cinco genótipos de bananeira submetidos a três níveis de NaCl, na fase inicial de desenvolvimento¹

NaCl (mM)	Caipira	Pacovan	Calcuttá	FHIA	Nanicão
	Área foliar (cm ²)				
0	2,676 aB	5,134 aA	3,992 aA	4,778 aA	5,389 aA
50	2,259 abB	3,724 bAB	2,853 bAB	2,458 bAB	4,094 bA
100	2,003 bB	3,650 bA	2,010 bB	2,325 bB	2,926 cAB

¹ Os valores seguidos da mesma letra minúscula na mesma coluna ou maiúscula na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade

Tabela 5. Teores de sódio e cloro no limbo foliar, pseudocaule e raízes + rizoma em cinco genótipos de bananeira, submetidos a três níveis de NaCl¹

Variedades	Limbo Foliar			Pseudocaule			Raízes + rizoma		
	NaCl (mM)								
	0	50	100	0	50	100	0	50	100
	Na ⁺ (g kg ⁻¹)								
Caipira	3,5aB	5,1bA	6,5cA	1,6aB	10,4aA	15,4aA	2,9bB	8,8aA	12,9aA
Pacovan	3,2aB	5,3bA	6,3cA	2,1aB	9,2abA	10,8bA	4,6aB	10,0aA	15,4aA
Calcuttá	3,8aC	18,1aB	28,0aA	1,6aC	7,9bB	13,8aA	2,9bB	9,2aA	15,4aA
FHIA	3,4aB	5,5bA	5,8cA	0,8bB	6,7bA	7,9bA	2,9bB	8,8aA	11,7aA
Nanicão	3,5aC	5,8bB	14,9bA	1,7aB	12,1aA	12,5aA	4,7aB	13,3aA	16,7aA
	Cl ⁻ (g kg ⁻¹)								
Caipira	3,3aB	40,6aA	42,2bcA	4,0aB	53,4aA	62,1aA	3,5aB	41,4aA	49,7aA
Pacovan	3,9aB	31,4aA	34,3cA	4,8aB	37,6bA	42,6aA	5,7aB	41,8aA	45,9aA
Calcuttá	4,9aC	35,2aB	66,2aA	3,1aB	44,3abA	49,3aA	5,3aB	45,1aA	50,5aA
FHIA	5,6aB	29,9aA	38,1cA	3,5aB	48,0abA	46,8aA	4,0aB	38,5aA	43,4aA
Nanicão	4,3aB	37,7aA	58,8abA	6,1aB	62,9aA	57,9aA	3,1aB	46,7aA	45,1aA

¹ Os valores da mesma coluna seguidos da mesma letra minúscula em cada variável ou na mesma linha, seguidos da mesma letra maiúscula, não apresentam diferença significativa, pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade

folhas, no mesmo tratamento. Em função da transpiração, tende a ocorrer acúmulo de íons nas folhas, sobretudo quando o genótipo não possui mecanismos de exclusão dos íons tóxicos. O mecanismo geralmente envolve a compartimentalização dos íons a nível de órgão (raiz) ou a nível celular (vacúolo). Quando a acumulação de íons excede a capacidade de tolerância da planta, ocorrem danos, como cloroses e necroses. Esses sintomas foram observados principalmente na Calcuttá, que sofreu os maiores danos nas folhas e as maiores concentrações de Na⁺ e Cl⁻ no limbo foliar. No que se refere aos teores de sódio e cloro nas raízes+rizoma e no pseudocaule, praticamente não houve diferença significativa entre os genótipos quando considerado o mais alto nível de NaCl (100 mM).

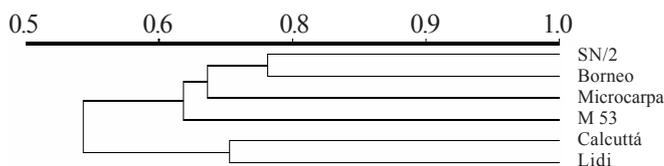
Segundo experimento: Caracterização dos genótipos Diplóides Calcuttá, Borneo, Lidi, SN/2, Microcarpa e M-53

Os primers utilizados amplificaram 393 loci gênicos, sendo 37 (9,4%) monomórficos e 356 (90,6%) polimórficos. Os iniciadores D0142A04 e D0238C03 geraram maior número de loci polimórficos, no total de 9 loci.

A análise da matriz de similaridade genética e do dendrograma (Tabela 6 e Figura 3) permitiu que se identificassem dois grupos entre os seis acessos avaliados. Grupo I, formado pelos genótipos SN/2, Borneo, Microcarpa e M-53, e grupo II, composto por Calcuttá e Lidi. O grupo II associa os acessos que se apresentaram menos tolerantes ao NaCl, enquanto o grupo I reúne acessos mais tolerantes ao estresse salino. O maior e o menor grau de similaridade genética foram observados entre os acessos Borneo e SN/2 (72,6%) e entre

Tabela 6. Similaridades genéticas entre os genótipos: SN/2, Borneo, Microcarpa, M-53, Calcuttá e Lidi, estimadas através do coeficiente de Dice

	SN/2	Borneo	Microcarpa	M53	Calcuttá	Lidi
SN/2	-					
Borneo	0,726	-				
Microcarpa	0,660	0,679	-			
M-53	0,675	0,623	0,646	-		
Calcuttá	0,573	0,545	0,559	0,512	-	
Lidi	0,590	0,547	0,533	0,580	0,691	-

Figura 3. Dendrograma dos genótipos de *Musa spp*, construído a partir dos produtos de amplificação obtidos com os primers de RAPD, usando-se o método de agrupamento UPGMA

Calcuttá e M-53 (51,2%), respectivamente. Os genótipos Calcuttá e Borneo, ambos originários da Jamaica (Tabela 1), mostraram baixa similaridade genética (54,5%), cujo resultado sugere que os acessos se originam de diferentes locais de coleta.

Cada um dos dois grupos formados pela análise de agrupamento, contém genótipos que compartilham características químicas e fisiológicas. Quanto ao efeito da salinidade sobre o crescimento (Tabela 7), constata-se que o

Tabela 7. Área foliar de seis genótipos de bananeira submetidos a três níveis de NaCl¹

NaCl (mM)	SN/2	Borneo	Calcuttá	Microcarpa	M-53	Lidi
	Área foliar (cm ²)					
0	6,233 aA	5,029 aAB	6,280 aA	5,100 aAB	3,520 aB	5,013 aAB
50	5,135 abA	4,020 abABC	4,404 abAB	3,800 abABC	2,303 abC	3,217 abBC
100	2,924 bAB	2,634 bAB	3,405 bA	2,507 bAB	1,297 bB	1,889 bB

¹ Os valores seguidos da mesma letra minúscula para uma mesma coluna ou maiúscula para uma mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade

grupo I associou os acessos mais tolerantes ao estresse salino e, conseqüentemente, os que apresentaram no tratamento com 50 mM, menores reduções de área foliar (Borneo e SN/2); o grupo II é formado pelos genótipos mais sensíveis à presença do NaCl que apresentaram as maiores reduções de área foliar.

Quanto ao acúmulo de íons (Tabela 8) constatou-se, no tratamento com 100 mM, que no grupo II se associaram os genótipos (Calcuttá e Lidi) que acumularam mais sódio e cloro no limbo foliar e, ainda, apresentaram sintomatologia de clorose e queima nas folhas. No pseudocaule essas duas variedades apresentaram novamente os maiores teores de sódio, quando submetidas a 100 mM de NaCl.

O alto grau de polimorfismo, detectado com os marcadores de RAPD, está de acordo com os observados por Shepherd et al. (1986), Gawel & Jarret (1991), Howell et al. (1994), Carneiro (1997) e Paz (2000), dentre outros. Bhat & Jarret (1995) afirmaram que a ampla variabilidade entre diplóides selvagens do grupo AA pode ser atribuída ao efeito de repetidas seleções ou mutações nos clones cultivados, que têm resultado em genoma de *Musa acuminata*, significativamente diferente daquele encontrado em seus ancestrais diplóides. Jarret & Gawell (1995), usando a técnica de RAPD na caracterização de clones de plátanos e na avaliação da diversidade genética entre diplóides de *M. acuminata*, concluíram que esta técnica pode disponibilizar informações sobre vários aspectos da diversidade genética em germoplasma de bananeira.

Considerando-se o nível de ploidia dos genótipos estudados no primeiro experimento (Figura 1), vê-se que o dendrograma separou o diplóide AA dos demais com nível de ploidia maior. Dos três acessos triplóides, Nanicão (AAA) e Caipira (AAA) se agruparam, apresentando similaridade genética em torno de 66,7% atribuída, provavelmente, à presença do mesmo grupo genômico acuminata (A) presente nos materiais. Quando se comparam os triplóides Pacovan (AAB) com Caipira (AAA) ou Nanicão (AAA), observa-se

diminuição no grau de similaridade, indicando que o grupo genômico balbisiana (B), presente na Pacovan, diferencia os genomas das mesmas. A formação de grupos distintos na análise de agrupamento dos genótipos diplóides AA do segundo experimento é função, provavelmente, de mutações existentes nesses genomas, fixadas pelo processo de seleção natural ou resultante de processos de melhoramento genético.

CONCLUSÕES

1. Em geral, o polimorfismo gerado com os marcadores de DNA mostrou que, apesar da base genética estreita, no caso das que são formadas pelo mesmo grupo genômico, os genótipos de bananeira apresentam variabilidade genética relativamente alta.

2. As variedades que apresentaram maior tolerância ao estresse salino, quando comparadas com as mais sensíveis ao sal, mostraram-se distantes geneticamente.

LITERATURA CITADA

- Bhat, K.V.; Jarret, R.L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germplasm. Genetic Resources and Crops Evolution, Netherlands, v.42, n.2, p.328-332, 1995.
- Caetano-Anollés, G.; Bassam, B.J.; Gresshoff, P.M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio Technology, Oxford, v.9, p.553-557, 1991.
- Carneiro, M.S. Aplicabilidade de marcadores “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) para monitoramento da variação somaclonal em bananeira do subgrupo Cavendish. Cruz das Almas: UFBA, 1997, 61p. Dissertação Mestrado

Tabela 8. Teores de íons na folha, pseudocaule e raízes + rizoma em seis genótipos diplóides de bananeiras, submetidos a três níveis de NaCl¹

Variedades	Limbo Foliar			Pseudocaule			Raízes + Rizoma		
	NaCl (mM)								
	0	50	100	0	50	100	0	50	100
	Na ⁺ (g kg ⁻¹)								
Lidi	3,0aC	11,8aB	23,2aA	1,9aC	10,1aB	18,4aA	4,0aB	6,2aB	13,2aA
Microcarpa	3,8aB	7,0aAB	10,2bA	1,6aC	5,0bB	10,7bA	4,0aB	7,5aB	10,0aA
Calcuttá	3,7aC	11,7aB	26,0aA	1,6aC	10,3aB	18,6aA	3,4aB	8,7aA	11,3aA
Borneo	3,5aA	5,0aA	7,8bA	1,3aC	8,1abB	11,5bA	4,3aB	6,2aB	11,3aA
SN/2	3,0aA	5,0aA	6,4bA	1,6aC	8,2abB	12,5bA	4,0aB	8,8aA	10,8aA
M-53	3,4aA	5,6aA	7,8bA	1,3aC	8,4abB	12,3bA	3,4aB	7,9aA	11,5aA
	Cl ⁻ (g kg ⁻¹)								
Lidi	10,6aC	35,0aB	51,5aA	9,5aB	36,6aA	47,1aA	12,4aB	33,5aA	36,6aA
Microcarpa	11,0aB	31,6aA	32,5bA	7,4aB	36,0aA	41,9aA	5,6aB	29,1aA	27,9aA
Calcuttá	8,0aC	34,3aB	55,9aA	6,8aB	36,3aA	47,3aA	3,9aB	44,7aA	45,9aA
Borneo	10,3aB	22,9aAB	29,2bA	7,9aB	34,8aA	43,4aA	9,9aB	32,8aA	32,9aA
SN/2	6,7aC	19,8aAB	30,9bA	6,5aB	25,4aAB	41,0aA	4,4aB	35,3aA	43,4aA
M-53	9,2aB	21,0aAB	24,8bA	8,0aB	24,6aAB	32,9aA	9,9aB	41,6aA	42,8aA

¹Os valores da mesma coluna seguidos da mesma letra minúscula em cada variável ou na mesma linha seguidos da mesma letra maiúscula, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade

- Carrel, F. Genome mapping and genetic analysis of the black leaf streak resistance in bananas. Infomusa, Montpellier, v.8, n.1, p.20-22, 1999.
- Doyle, I.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant from fresh tissue. Focus, Rockville, v.12, p.13-15, 1990.
- FAO. Statistics. agricultural. production. Crops. Primary. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso junho 2002.
- França, J.G.E. de. Situação atual e perspectiva das áreas irrigadas no Estado de Pernambuco. Petrolina: EMBRAPA, 1998. 121p.
- Gawel, N.; Jarret, R.L. Cytoplasm diversity in bananas and plantains. Euphytica, Dordrecht, v.52, n.3, p.19-23, 1991.
- Howell, E.C.; New Bury, H.J.; Swennwn, R.L.; Whitters, L.A.; Ford-Lloyd, B.V. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasms. Genome, New York, v.37, n.2, p.328-332, 1994.
- Hurkman, W.J. Effect of salt stress on plant gene expression: a review. Plant and Soil, Dordrecht, v.146, n.12, p.145-151, 1992.
- IBGE. Estatística. Agricultura. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso maio 2002.
- Jain, S.; Nainawatee, H.S.; Jain, R.K.; Chowdhury, J.B. Salt tolerance in *Brassica juncea* L> II: salt-stress induced changes in polypeptide pattern of *in vitro* selected NaCl-tolerance plants. Euphytica, Wageningen, v.65, n.2, p.107-112, 1993.
- Jarret, R.L.; Gawel, N. Molecular markers, genetic diversity and systematics in *Musa*. In: GOWEN, S. Bananas and plantains: London: Chapman & Hall, 1995. p.66-83.
- Lagoda, P. Mapping and genomics. The study of the Musaceae: mapping and genomics. Infomusa, Montpellier. v.8, n.1, p.6-8. 1999.
- Lysák, M.A.; Doleze Lová, M.; Horry, J.P.; Swennen, R.; Dolezel, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. Theoretical and applied genetics, New York, v.98, n.8, p.1344-1350, 1999.
- Marschner, H. Mineral nutrition of higher plants. 4.ed. Belfast: University Press, 1990. 674p.
- Milach, S.C.K. Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. Ed.Sandra Cristina Kothe Milach. Porto Alegre, 1998. 141p.
- Paz, O.P. Caracterização de germoplasma de bananeira com RAPD. Cruz das Almas: UFBA, 2000, 67p. Dissertação Mestrado
- Rosa Júnior, C.D.R.M. Bananeira. Cultivo sob condição irrigada. Recife: SEBRAE/PE, 2000. 51p.
- Shepherd, K.; Dantas, J.L.L.; Alves, E.J. Melhoramento genético da bananeira. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.12, n.72, p.11-19, 1986.
- Silva, S. de O. Melhoramento genético de bananeira. Simpósio Brasileiro de Melhoramento de Fruteiras 2, 2000, Viçosa; Anais... Bruckner, C.H. (ed). Viçosa: UFV, DFT; 2000. p.20-48.
- Silva, S. de O.; Carvalho, P.C.L. de; Shepherd, K.; Alves, E.J.; Oliveira, C.A.P. de; Carvalho, J.A.B.S. Catálogo de germoplasma de bananeira (*Musa spp*). Cruz das Almas, BA: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 1999. 152p. Documento, 90.
- Souza, J.S.; Torres Filho, P. Aspectos socioeconômicos. In: Alves, E.J. (ed). A cultura da banana. Aspectos técnicos socioeconômicos e agroindustriais. Brasília, D.F.: Embrapa -SP, 1999. p.507-524
- Welsh, J.; Mc Clelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrar primers. Nucleic Acids Research, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.
- Williams, J.K.G.; Kubeli, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, Oxford, v.18, p.6531-6535. 1990.
- Zhu, J.K. Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. Plant Physiology, Rockville, v.124, n.3, p.941-957, 2000.