

## SELEÇÃO *IN VITRO* DE GEMAS DE BANANEIRA 'NANICÃO' TOLERANTES À SALINIDADE

Cláudia Ulisses<sup>1</sup>; Terezinha Rangel Camara<sup>2\*</sup>; Lilia Willadino<sup>3</sup>; Isabelle Meunier<sup>4</sup>; Paulo Sérgio Gomes da Rocha<sup>5</sup>; Cynthia Albuquerque<sup>1</sup>

<sup>1</sup>VERDE VITRO - Biotecnologia Vegetal - UFRPE, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n - CEP: 52171-950 - Recife, PE.

<sup>2</sup>Depto. de Química - Lab. de Cultura de Tecidos Vegetais - UFRPE.

<sup>3</sup>Depto. de Biologia - Lab. Cultura de Tecidos Vegetais - UFRPE.

<sup>4</sup>Depto. de Ciência Florestal - UFRPE.

<sup>5</sup>Bolsista PIBIC.

\*Autor correspondente <tcamara@novaera.com.br>

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do cloreto do sódio (NaCl) sobre o cultivo *in vitro* de gemas de bananeira cv. Nanicão (AAA) e selecionar as que se mostrassem tolerantes ao estresse imposto. As gemas foram cultivadas em meio nutritivo de Murashige e Skoog (MS) com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e suplementado com diferentes níveis de NaCl (0, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 mM) durante 60 dias (Fase I). As gemas sobreviventes foram transferidas para o mesmo meio nutritivo MS, sem NaCl, e cultivadas durante 30 dias (Fase II). Em seguida, as gemas foram submetidas, durante 90 dias, aos tratamentos com 80 e 100 mM NaCl (Fase III). Foram selecionadas 100 gemas nessa última fase as quais, logo em seguida, foram colocadas em meio nutritivo sem NaCl, suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP para induzir o enraizamento. As gemas submetidas à concentração de 120 mM de NaCl na Fase I, não sobreviveram ao tratamento. A regeneração de plantas foi fortemente inibida em todas as concentrações com NaCl. Por outro lado, as concentrações de 20 a 80 mM de NaCl provocaram um aumento generalizado no número e tamanho das gemas. Das cem gemas selecionadas a partir dos tratamentos de 80 e 100 mM de NaCl foram regeneradas 80 plantas em meio sem NaCl. O enraizamento não foi significativamente afetado pelo pré-tratamento salino. Palavras-chave: *Musa* sp., variação somaclonal, salinidade

### **IN VITRO SELECTION OF SALT TOLERANT 'NANICÃO' BANANA BUDS**

**ABSTRACT:** This work aims to evaluate the effect of NaCl and to make selections of banana cv. Nanicão (AAA) *in vitro*. Buds were grown on MS medium with 2.5 mg L<sup>-1</sup> BAP and supplemented with different NaCl concentrations (0; 20; 40; 60; 80; 100 and 120 mM), for 60 days (Phase I). Survivor buds were transferred to salt-free media and grown for 30 days (Phase II). Afterwards they were submitted to MS media containing 80 or 100 mM NaCl, during 90 days (Phase III). One hundred buds were selected from the last phase and then, placed on NaCl-free medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA and 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP for rooting. All buds died when submitted to 120 mM NaCl. Plant regeneration was highly inhibited by all NaCl concentrations. On the other hand, concentrations from 20 to 80 mM NaCl increased bud number and length. Buds were selected from treatments with 80 and 100 mM NaCl, and 80 plants were regenerated in media without NaCl. Rooting was not affected by saline pre-treatment.

Key words: *Musa* sp., somaclonal variation, salinity

### **INTRODUÇÃO**

O cultivo da bananeira em regiões áridas e semi-áridas é feito, normalmente, com o uso de irrigação. Aproximadamente, 13% do território brasileiro localiza-se em áreas caracterizadas como semi-áridas, e destas, 52% encontram-se no Nordeste (SUDENE, 1977). Nas áreas irrigadas do semi-árido nordestino, os teores de sais na água de irrigação, a intensa evaporação e a deficiência de drenagem provocam problemas de salinidade nos solos, reduzindo o crescimento e desenvolvimento das plantas (Macêdo, 1988). Já na década de 70, os perímetros irrigados do Nordeste brasileiro apresentavam aproximadamente 25% de suas áreas salinizadas (Goes, 1978). Alguns perímetros, como o de Custódia-PE, estão com mais de 95% de sua área comprometida pela salinidade do solo (Macêdo, 1988). Atual-

mente, as zonas fisiográficas do Agreste e do Sertão são responsáveis por quase metade da produção de banana do Estado de Pernambuco (Anuário Estatístico do Brasil, 1997). Considerando-se que as práticas de recuperação de solos salinos são, em sua maioria, onerosas e demoradas, é fundamental a utilização de culturas e/ou cultivares tolerantes a essas condições de salinidade (Araújo Filho et al., 1995).

A cultura de tecidos é uma ferramenta que pode ser empregada em programas de melhoramento genético, uma vez que permite a ampliação da variabilidade genética por meio da indução de variação somaclonal e posterior seleção *in vitro* (Ferreira et al., 1998).

O presente trabalho teve como objetivos selecionar *in vitro* gemas de bananeira 'Nanicão' (*Musa* spp., grupo AAA) tolerantes à salinidade e avaliar o efeito do NaCl sobre o desenvolvimento das mesmas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Gemas de bananeira da cultivar 'Nanicão' (*Musa* spp., grupo AAA), medindo aproximadamente 5 mm de comprimento, foram cultivadas *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina). Foram estabelecidos seis tratamentos salinos, os quais consistiram da adição de NaCl ao meio de cultura de modo a compor os seguintes níveis de salinidade: 20, 40, 60, 80, 100 e 120 mM, além de um tratamento controle, desprovido de NaCl. As gemas permaneceram em cultura durante 60 dias, passando por um subcultivo a cada 30 dias (Fase I). As gemas que sobreviveram à Fase I foram transferidas para o mesmo meio básico MS sem NaCl, onde permaneceram durante 30 dias (Fase II). Em seguida, metade das gemas foi inoculada em meio MS acrescido com 80 mM de NaCl e a outra metade em meio com 100 mM de NaCl (Fase III). A Fase III teve a duração de 90 dias, sendo as gemas subcultivadas a cada 30 dias. A cada subcultivo das Fases I, II e III, avaliaram-se a capacidade de multiplicação (número) e crescimento (tamanho) das gemas e a regeneração das mesmas (número de plantas). Ao final da Fase IV, foram determinados os números de gemas, de plantas, de folhas e de raízes, além do tamanho das gemas e da altura do pseudocaule.

O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas (2.000 lux) e temperatura de 27±2°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento nas Fases I e II e 20 repetições na Fase III. A unidade experimental foi constituída por uma gema inoculada em tubo de ensaio, com 10 mL de meio. Os dados coletados em cada uma das fases do experimento foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As gemas selecionadas a partir dos tratamentos com 80 e 100 mM de NaCl (Fase III) foram transferidas para meio de enraizamento *in vitro*, contendo os sais e compostos orgânicos do meio MS, acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, sem adição de NaCl. A fase de enraizamento teve duração de 45 dias, nas condições de crescimento já citadas. Após o período experimental, foram avaliadas as variáveis de crescimento referidas anteriormente e os resultados obtidos foram normalizados pela transformação  $\sqrt{x + 0,5}$ . Os dados transformados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 60 dias de cultivo, nos tratamentos de 20, 40, 60 e 80 mM de NaCl, houve um aumento generalizado no tamanho e no número de gemas emitidas, em detrimento da regeneração de plantas, quando comparado ao tratamento controle. O efeito inibidor sobre a regeneração de plantas foi observado em todos os níveis

de salinidade. No tratamento com 100 mM de NaCl, observou-se, ademais, redução no tamanho das gemas quando comparado aos demais tratamentos salinos (Figura 1). A concentração de 120 mM, correspondente a 0,70% de NaCl, provocou necrose em 85% das gemas, após 20 dias de tratamento. Esse efeito agravou-se com a duração do tratamento, alcançando a totalidade das gemas aos 60 dias de cultivo, demonstrando o efeito tóxico do NaCl nesta concentração. O mesmo foi observado em calos de batata-doce cultivados em concentrações superiores a 0,34% de NaCl (Castro & Andrade, 1998).

Diversos autores constataram a redução do crescimento em calos embriogênicos em função do aumento dos níveis de NaCl em mono e dicotiledôneas (Reddy & Vaidyanath, 1986; Castro & Andrade, 1998; Camara et al., 1998; Willadino et al., 1996; Bezerra, 1997 e Bajaj, 1986). Segundo Greenway & Munns (1980), Prisco (1980) e Why & Gorham (1983), a elevação dos níveis de NaCl implica na redução do crescimento devido a diversos fatores, dentre os quais pode-se destacar: o efeito tóxico devido aos íons que foram absorvidos; o baixo potencial osmótico e hídrico das células; bem como a utilização de energia metabólica no processo de ajustamento osmótico (bombeamento de íons e produção de compostos orgânicos). No presente trabalho, observou-se, sobre tudo, o efeito inibidor do NaCl no processo de regeneração das plantas. Trabalhos envolvendo o cultivo *in vitro* de bananeira em condições de salinidade são bastante escassos, embora a sensibilidade da cultura ao sal já tenha sido registrada em campo (Doorenbos & Kassam, 1979; Lahav & Turner, 1983; Israeli et al., 1986).

Com a supressão do NaCl (Fase II), observou-se que as gemas provenientes dos tratamentos com 20 a 80 mM de NaCl continuaram apresentando uma emissão de gemas superior às gemas previamente cultivadas em 100 mM de NaCl (Figura 2). Esse comportamento pode estar relacionado a um efeito acumulativo do NaCl nas gemas, quando sujeitas a doses elevadas desse sal, por um período relativamente longo. As gemas provenientes dos tratamentos com 20, 40

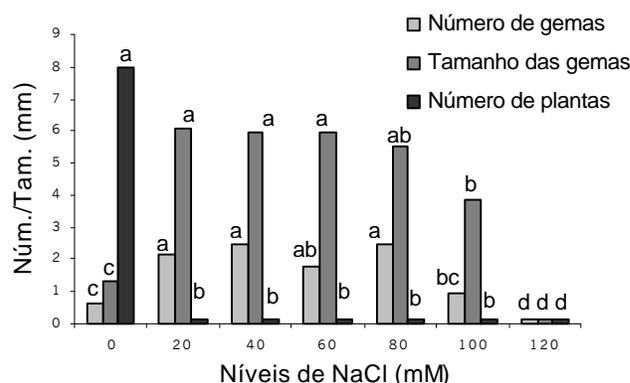


Figura 1 - Número e tamanho de gemas e regeneração de plantas a partir de gemas de bananeira após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes níveis de NaCl (Fase I). Barras referentes a uma mesma variável, com a mesma letra, não apresentam diferença significativa a 5%, pelo teste de Tukey.

e 60 mM de NaCl apresentaram formação de parte aérea (pseudocaule e folhas) e raízes. Entretanto, os maiores percentuais de regeneração foram observados nas gemas provenientes do tratamento não salino (Figura 3). Resultados contrastantes foram obtidos por Binh et al. (1992), ao observarem maior regeneração de plantas em calos de arroz quando os mesmos eram submetidos a um pré-tratamento salino (1,5% NaCl). Por outro lado, quando esses calos foram cultivados em meio de regeneração com NaCl houve uma redução na capacidade de regeneração de plantas, sugerindo que o excesso de NaCl nos tecidos pode interferir neste processo. No presente experimento, o efeito deletério do pré-tratamento salino foi mais severo no que se refere à formação de raízes. Apenas 40% das plantas

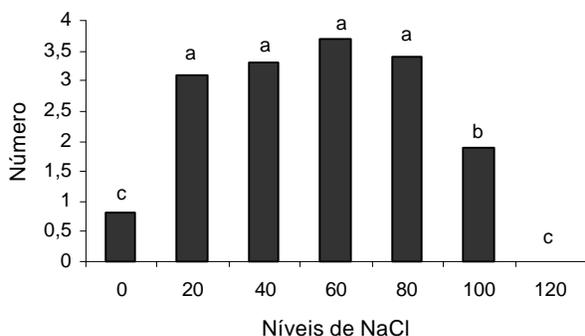


Figura 2 - Número médio de gemas de bananeira aos 30 dias de cultivo sem NaCl, após 60 dias de tratamento salino (Fase II). Barras com a mesma letra não apresentam diferença significativa a 5%, pelo teste de Tukey.

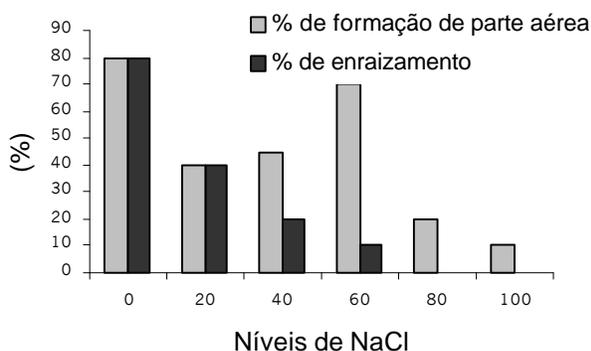


Figura 3 - Percentagem de formação de parte aérea e de enraizamento de plantas de bananeira em meio não salino (Fase II), provenientes de gemas cultivadas em diferentes níveis de NaCl (Fase I).

provenientes de gemas submetidas a 20 mM de NaCl enraizaram. Esse percentual caiu para 20 e 10%, respectivamente, nas gemas pré-tratadas com 40 e 60 mM de NaCl, e foi nulo para as plantas formadas a partir de gemas cultivadas a 80 e 100 mM de NaCl (Figura 3).

Na Fase III, quando as gemas foram submetidas aos níveis de 80 e 100 mM de NaCl, não houve diferença entre os tratamentos salinos no que se refere ao número e ao tamanho das gemas (Figura 4). Quanto ao controle, ocorreu a formação de plantas em detrimento da emissão e crescimento das gemas. Portanto, o comportamento dos explantes nessa fase, foi similar ao da Fase I.

Em relação ao enraizamento *in vitro* das plantas regeneradas a partir de gemas provenientes dos tratamentos com 0, 80 e 100 mM de NaCl, não houve diferença entre tratamentos (TABELA 1). Vale salientar que na fase de enraizamento, estabeleceu-se um balanço hormonal entre auxina (0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA) e citocinina (1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) no meio nutritivo, para que ocorresse o desenvolvimento do sistema radicular. Outros autores (Grando et al., 1993; Bajaj, 1986) também relataram a necessidade do balanço hormonal entre auxinas e citocininas para a regeneração de plantas. O sistema radicular das plantas regeneradas provenientes de tratamentos salinos apresentou raízes curtas, grossas, rígidas e ausência de raízes secundárias.

Ao final do presente experimento, foi possível a regeneração de 80 plantas provenientes de gemas selecionadas *in vitro* quanto à tolerância à salinidade.

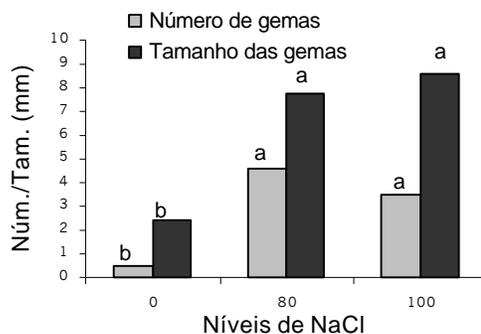


Figura 4 - Número e tamanho de gemas de bananeira aos 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS sob diferentes níveis de NaCl (Fase III). Barras referentes a uma mesma variável, com a mesma letra, não apresentam diferença significativa a 5%, pelo teste de Tukey.

TABELA 1 - Gemas (número e tamanho) e plantas regeneradas (número de plantas, de folhas e raízes, e altura do pseudocaule) provenientes de diferentes níveis de NaCl, cultivadas durante 45 dias em meio de enraizamento sem NaCl.

Tratamentos (Níveis de NaCl)	Número de gemas	Tamanho das gemas	Número de folhas	Número de raízes	Altura do pseudocaule	Número de plantas regeneradas
mM		mm			cm	
0	0,85 a	12,1 a	1,57 a	3,44 a	3,13 a	20 c
80	0,86 a	14,2 a	1,48 a	3,28 a	2,49 a	50 a
100	0,81 a	13,5 a	1,39 a	2,62 a	2,36 a	30 b

Médias seguidas da mesma letra, dentro de cada coluna, não diferem a 5% pelo teste de Tukey. Para análise estatística os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ .

## CONCLUSÕES

Os tratamentos com 80 e 100 mM de NaCl permitiram a seleção *in vitro* de gemas de bananeira cv. Nanicão tolerantes à salinidade.

A presença de NaCl no meio nutritivo inibiu a regeneração de plantas de bananeira cv. Nanicão, em todos os níveis salinos testados (20 a 120 mM).

## AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE, v.2, p.117, 1997.
- ARAÚJO FILHO, J.B. de; GHEYI, H.R.; AZEVEDO, N.C. de. Tolerância da bananeira à salinidade em fase inicial de desenvolvimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.989-997, 1995.
- BAJAJ, Y.P.S. **Biotecnology in agriculture and forestry**: crops. Berlin: Springer Verlag. 1986. 242p.
- BEZERRA, J.S. Cultivo *in vitro* de milho (*Zea mays* L.) e sua relação com estresse salino. Recife, 1997. 112p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- BINH, D.Q.; HESZKY, L.E.; GYULAI, G.; CSILLAG, A. Plant regeneration of NaCl-pretreated cell from long-term suspension culture of rice (*Oryza sativa*) in high saline conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.75-82, 1992.
- CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, J.M.; RODRIGUEZ, P.; SANTOS, M.A. Efeito da putrescina e do estresse salino em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, p.153-156, 1998.
- CASTRO, O.F. de A.; ANDRADE, A.G. Indução e comportamento de calos de batata-doce em meio salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.21-27, 1998.
- DOORENBOS, J.; KASSAM, A.H. **Yield response to water**. Rome: FAO, 1979. 193p. (Irrigation and Drainage. Paper, 33).
- FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p.21-43.
- GOES, E.S. O problema de salinização e drenagem em projetos de irrigação do Nordeste, e ação da pesquisa com vistas a seu equacionamento. In: REUNIÃO SOBRE SALINIDADE EM ÁREAS IRRIGADAS, Fortaleza, 1978. **Anais**. Fortaleza, 1978. p.31-32.
- GRANDO, M.F.; EICHLER, L.; TANABE, C.R.; SANTOS, J.F. dos; SANTOS, C.M. dos. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, p.139-144, 1993.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.149-190, 1980.
- ISRAELI, Y.; LAHAV, E.; NAMERI, N. The effect of salinity and sodium adsorption ratio in the irrigation water, on growth and productivity of bananas under drip irrigation conditions. **Fruits**, v.41, p.297-302, 1986.
- LAHAV, E.; TURNER, D.W. **Fertilizing for high yield**: banana. Berne: International Potash Institute, 1983. 62p. (Bulletin, 7)
- MACÊDO, L. de S. **Salinidade em áreas irrigadas**. João Pessoa: EMEPA, 1988. p.1-11. (Comunicado Técnico, 38)
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do estresse salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v.3, p.85-91, 1980
- REDDY, P.J.; VAIDYANATH, K. *In vitro* characterization of salt stress effects and the selection of salt tolerant plants in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, p.757-760, 1986.
- SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE - SUDENE. **Relatório anual**. Recife: SUDENE, 1977. 82p.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T.; BOGET, N.; CLAPAROLS, I.; TORNE, J.M. Polyamine and free amino acid variations in NaCl-treated embryogenic maize callus from sensitive and resistente cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v.146, p.179-185, 1996.
- WHY, J.R.G.; GORHAM, J. Aspects of salt and drought tolerance in higher plants. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A. (Ed.) **Genetic engineering of plants, an agricultural perspective**. New York: Plenum Press, 1983. p.355-370.

Recebido em 11.02.00