

Análises isoenzimáticas em somaclones de bananeira Berlim
Costa, Deivid Almeida da¹; Camara, Terezinha Rangel²; Martins, Luiza Suely
Semen³; Willadino, Lilia³.

¹Pesquisador do Centro de Tecnologias Estratégicas para o Nordeste – CETENE. Rua Prof. Luiz Freire, 01. Cidade Universitária. Recife-PE. CEP 50740-540. e-mail: costa.deivid@gmail.com; ²Professora do Depto de Química -(UFRPE), e-mail: tkrcamara@pq.cnpq.br .³Professora do Depto de Biologia UFRPE, e-mail: lilia@pq.cnpq.br.

INTRODUÇÃO

As cultivares comerciais de bananeira produzem frutos por partenocarpia, de modo que os cultivos subseqüentes são normalmente produzidos a partir de brotações que surgem do rizoma da planta mãe. O uso de vitroplantas obtidas por gemação *in vitro* é uma dos principais avanços no cultivo da bananeira na última década. Entre as plantas cultivadas em larga escala, a bananeira é a mais largamente propagada *in vitro* atingindo cerca de 50 milhões de plantas por ano (CIRAD, 2007). Quando se utiliza a micropropagação para a propagação clonal em massa, é esperado que os clones individuais apresentem o mesmo genótipo da planta mãe. Entretanto, variantes genéticas resultantes do processo de cultivo *in vitro* foram detectados em várias culturas (Larkin & Scowcroft, 1981) e denominados de variantes somaclonais. A variação somaclonal é caracterizada por apresentar modificações genéticas propriamente ditas, e não apenas variações epigenéticas. A freqüência de variação somaclonal não pode ser prevista por ser dependente de vários fatores. Entre estes fatores destacam-se a espécie, o tipo de explante, a composição do meio de cultura, as condições físicas do cultivo *in vitro*, a duração entre os sucessivos subcultivos e o número de subcultivos. Os variantes somaclonais podem ser identificados por caracteres morfológicos, bioquímicos, fisiológicos ou genéticos. Muitos trabalhos indicam que as variações podem ser detectadas pelo número de cromossomas, padrões isoenzimáticos e polimorfismo do DNA (RAPD). O presente trabalho visou examinar padrões isoenzimáticos (esterase, peroxidase e fosfatase) em clones de bananeira do genótipo Berlim (diplóide), provenientes de três anos de sucessivos subcultivos (45 dias entre subcultivos).

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas do genótipo diplóide Berlim, foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFRPE, no período de novembro de 2004 a abril de 2007, a partir de mudas *in vitro* obtidas do banco de germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical - CNPMF/EMBRAPA. A cada 45 dias as mudas foram subcultivadas em meio basal de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 6-benzilaminopurina (BAP) na concentração de 2,0 mg L⁻¹. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25°C ± 2°C com luz branca fria a 47,6 µmol m⁻² s⁻¹, com fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliados três sistemas isoenzimáticos: esterase (EST), peroxidase (PRX) e fosfatase ácida (ACP). Para as análises isoenzimáticas foram utilizadas amostras foliares de 8 clones do genótipo Berlin mantidos por três anos *in vitro*. O tecido

vegetal foi macerado em almofariz, em banho de gelo, com 2,5 mL de tampão Scandalios (1969), 300 mg de sacarose e 300 mg de polivinilpirrolidona (PVP). Os homogenados foram centrifugados a 10.000 rpm, durante 1 minuto, a 4 °C, e o sobrenadante foi usado na identificação das isoenzimas. Do sobrenadante foram retirados 10 µL de cada amostra e aplicados nos poços dos géis de poliacrilamida a 7%. A migração eletroforética foi conduzida a 4 °C, a um potencial de 40V, até que a linha de frente atingisse 7,0 cm em direção ao pólo positivo. Após a corrida eletroforética os géis foram corados em soluções específicas e fotografados. O gel de acrilamida usado na corrida eletroforética foi preparado com tampão borato de lítio 0,2 M a pH 8,3; tampão Tris-citrato 0,2 M a pH 8,3; acrilamida estoque (acrilamida 95%, bisacrilamida 5% e H₂O destilada); Temed e persulfato de amônia. Para a resolução dos sistemas enzimáticos, foi adotada a metodologia proposta por Alfenas et al. (1998), com algumas modificações. Sistema peroxidase: a coloração ocorreu no escuro, à temperatura ambiente, por duas horas. Foram usados 0,065g de 3-amino-9-etilcarbazole; 5,0mL de dimetilformamida; 2,0 mL de CaCl₂; 4 gotas de H₂O₂ a 30%; 85 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. Sistema α-esterase e β-esterase: a coloração ocorreu no escuro durante 1 hora a 37°C. Fosfatase ácida: a coloração ocorreu no escuro durante 5 horas a 37°C, de acordo com o método de Scandalios (1969), modificado. Nas cubas, para as corridas eletroforéticas, foram usados: tampão borato de lítio 0,2 M, pH 8,3. Todos os géis, após a coloração, foram lavados e fixados em solução contendo álcool metílico + ácido acético + água destilada (1:1:1 v/v), por 20 minutos e, em seguida, fotografados e avaliados para a confecção dos zimogramas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três sistemas de isoenzimas utilizados, EST, PRX e ACP, geraram oito bandas nos oito somaclones avaliados (Figuras 1 e 2). Os somaclones foram selecionados ao acaso, de um conjunto de 178 somaclones de bananeira sem variações morfológicas aparentes após três anos de cultivo *in vitro*. Não foram detectadas alterações quanto ao número e posição das bandas em nenhum dos três sistemas. Em um trabalho similar realizado por Flores e colaboradores (2000) a avaliação de somaclones de morangueiro, sem variações morfológicas durante o cultivo *in vitro*, foi detectado o mesmo padrão de bandas do sistema EST para todos os genótipos. O sistema ACP, entretanto, apresentou polimorfismo e permitiu identificar variantes somaclonais. Durante o processo de micropropagação de abacaxi, Feuser et al. (2003) compararam o sistema de imersão temporária com o sistema estacionário no que se refere à indução de variação somaclonal. Somente a combinação entre os dados obtidos por análises isoenzimáticas e os obtidos por RAPD permitiram detectar que o sistema de imersão temporária induziu menor variação somaclonal do que o sistema estacionário. Vale salientar que na comparação dos oito somaclones de bananeira Berlim discutidos neste trabalho observou-se variação na intensidade das bandas de EST e PRX.

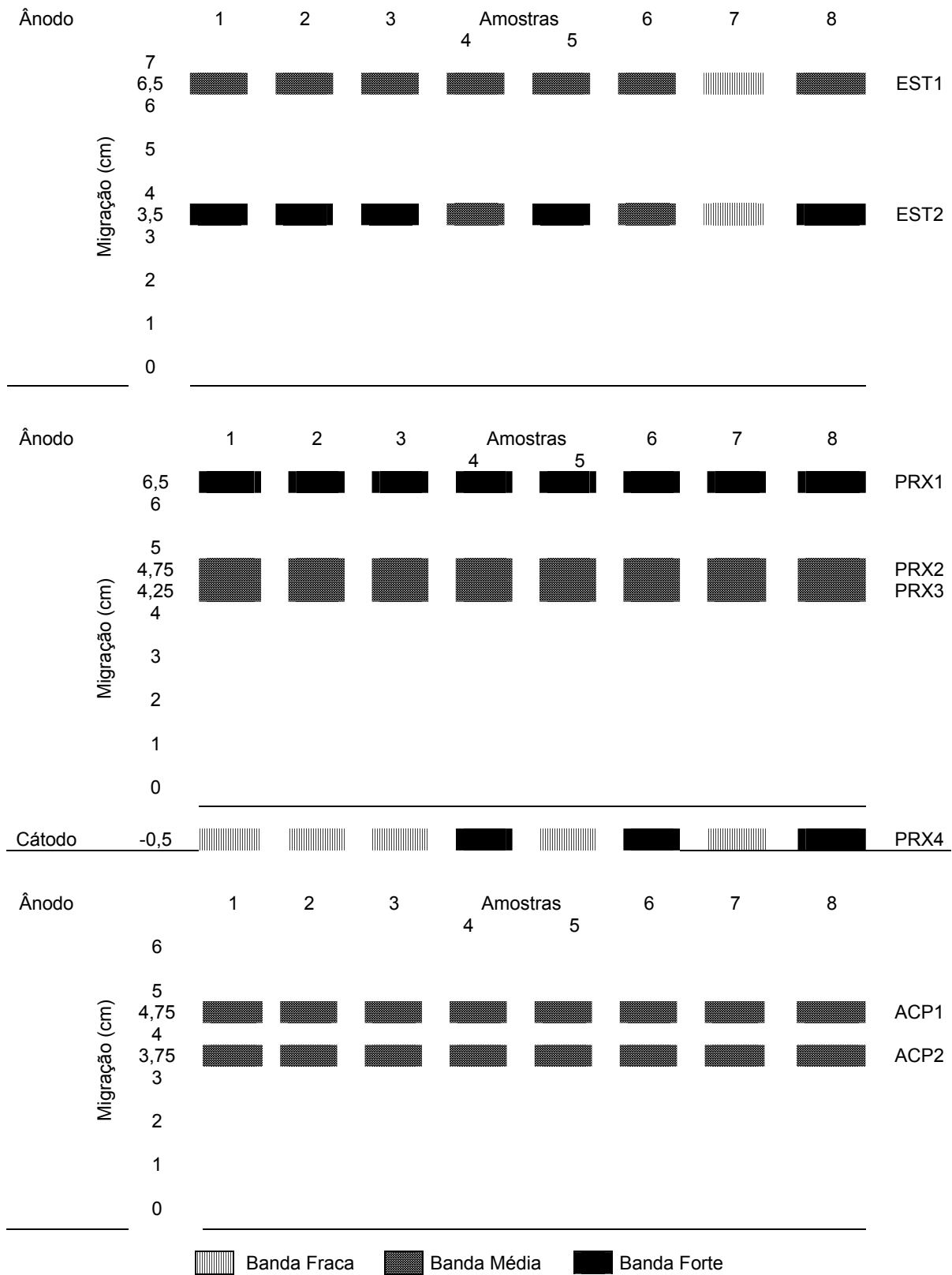


Figura 1 Zimogramas dos sistemas esterase, peroxidase e fosfatase ácida de amostras de oito somaclones de bananeira diplóide Berlim cultivadas *in vitro* durante três anos.

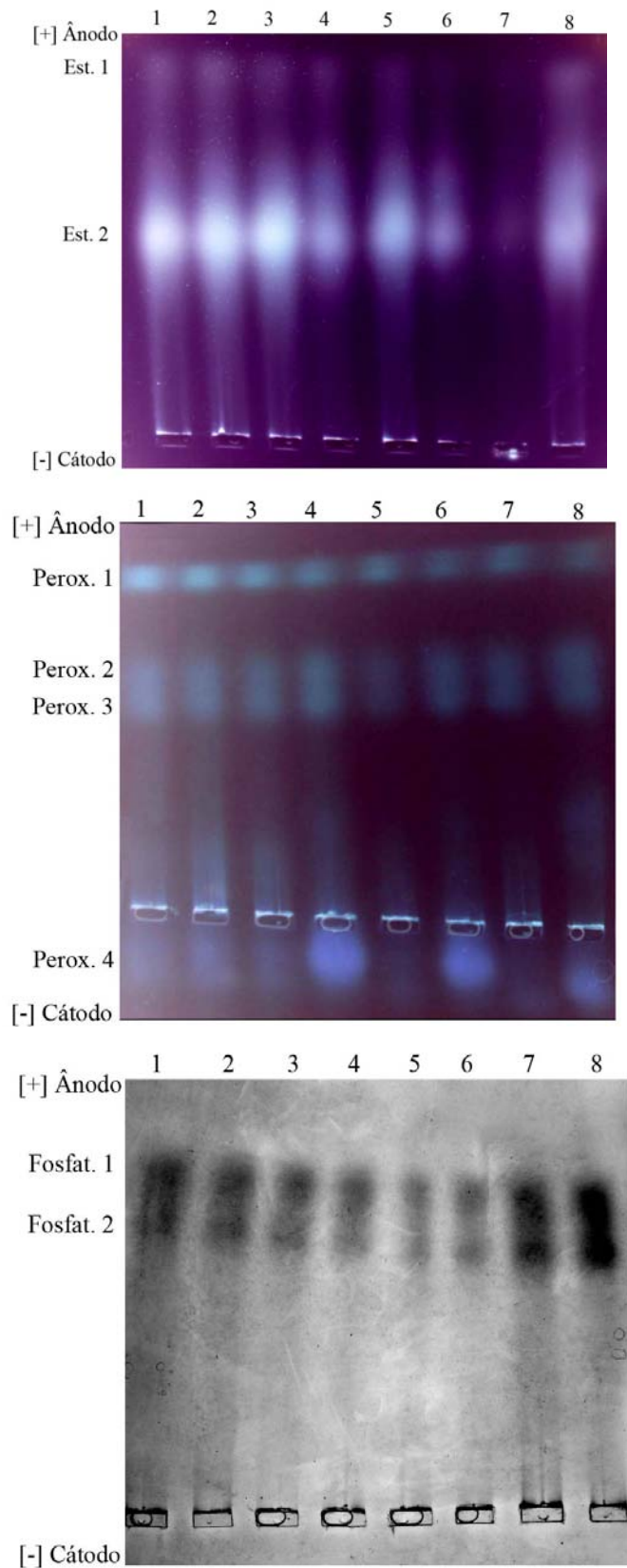


Figura 2. Géis eletroforéticos de isoformas de esterase, peroxidase e fosfatase ácida de amostras de oito somaclones de bananeira diplóide Berlim cultivadas *in vitro* durante três anos.

A ausência de variação somaclonal detectável pelos sistemas isoenzimáticos pode ser consequência do pequeno número de sistemas avaliados uma vez que as variações ocorrem ao acaso e, portanto, nenhum sistema pode ser considerado mais eficiente do que outro. Além do exposto, é importante frisar que as análises de enzimas detectam apenas alterações genéticas que modificam a estrutura (Alfenas et al., 1991) e/ou a carga elétrica das proteínas, em regiões do DNA que correspondem a um número limitado de genes que codificam para as enzimas (Torggler et al., 1995), não cobrindo, portanto, todo o genoma. Por outro lado, estudos baseados no DNA possibilitam a detecção de alterações genéticas, em regiões codificadoras ou não codificadoras. Desta forma, estudos neste sentido devem ser realizados visando confirmar e caracterizar possíveis alterações genéticas nos diversos clones avaliados neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.

CIRAD Disponível em http://www.cirad.fr/fr/le_cirad/index.php Acesso em 15/04/2007.

FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Genetic fidelity of micropropagated pineapple plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.221-227, 2003.

FLORES, R.; ROCHA, B.G.; PETERS, J.A.; AUGUSTIN, E.; FORTES, G.R.L. Análises isoenzimáticas em somaclones de morangueiro c.v. Vila Nova. **Ciência Rural**, v.30, p.993-997, 2000.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Applied Genetic**, v.60, p.547-554, 1981.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

SCANDALIOS, J. G., Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, p. 37-79, 1969.