



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

GABRIELA DE MORAIS GUERRA FERRAZ

Avaliação fisiológica e aplicação de ddPCR (*differential display* PCR) em genótipos diplóides (AA) de bananeira (*Musa ssp.*) submetidos ao estresse salino

RECIFE – PERNAMBUCO
FEVEREIRO – 2008

GABRIELA DE MORAIS GUERRA FERRAZ

Avaliação fisiológica e aplicação de ddPCR (*differential display* PCR) em genótipos diplóides (AA) de bananeira (*Musa ssp.*) submetidos ao estresse salino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Mestrado.

Comitê de orientação:

Dra. Luíza Suely Sêmen Martins

Dra. Lília Gomes Willadino

Dra. Eline Waked Ferreira Gomes

RECIFE – PERNAMBUCO
FEVEREIRO – 2008

FICHA DE AVALIAÇÃO

Avaliação fisiológica e aplicação de ddPCR (*differential display* PCR) em genótipos diplóides (AA) de bananeira (*Musa ssp.*) submetidos ao estresse salino

Gabriela de Moraes Guerra Ferraz

Local: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE,

Hora: 08 horas.

Data: 29 de Fevereiro de 2008.

Banca Examinadora:

1º Membro: Dra. Luíza Suely Semen Martins
Orientadora
Departamento de Biologia - UFRPE

2º Membro: Dra. Rosimar dos Santos Musser
Departamento de Agronomia - UFRPE

3º Membro: Dra. Vivian Loges
Departamento de Agronomia - UFRPE

4º Membro: Dra Angélica Virginia Valois Montarroyos
Departamento de Biologia - UFRPE

Suplente: Dr. Edson Ferreira da Silva
Departamento de Biologia - UFRPE

Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas. UFRPE.

“Não creia apenas no que seus olhos dizem. Tudo que mostram são limitações. Olhe também com o entendimento, descubra o que você já sabe e verá como voar (...) Devemos tentar ultrapassar as nossas limitações progressivas e pacientemente”

Richard Bach.

DEDICO

Aos meus pais Luiz e Lucy Guerra que sempre me incentivaram em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida... obrigada Senhor por ter sua mão a me segurar em todos os momentos,

Aos meus pais, Luiz e Lucy, pelos valores morais repassados, pelo amor incondicional e pelo incentivo para a realização dos meus sonhos, dando base para prosseguir nesta caminhada,

Ao meu marido, Marcus Vinícius Ferraz Gominho, pela compreensão, proteção, aconselhamento, carinho, por lutar ao meu lado todo o tempo, participando do meu dia a dia com uma alegria peculiar da sua personalidade. Obrigada pela liberdade e confiança a que me deposita, deixando-me a vontade para escolher o melhor para nos dois e o que gosto também,

À minha filha Júlia Maria, minha vidinha, pela sua chegada tão desejada, iluminada de amor e paz,

À minha orientadora, Dra. Luíza Suely Semen Martins, uma amiga que me fez despertar para as possibilidades da vida, obrigada pelo seu carinho, pelo apoio e aconselhamentos durante toda a execução do projeto .

Aos meus sogros, Cláudio Novaes Gominho e Maria Lúcia Ferraz Gominho (in memória), por entenderem a minha ausência e apoiarem as decisões tomadas,

Ao meu irmão João Alfredo Guerra e a Daniela Calabria (Dani), a minha irmã querida Juliana Guerra e a Maurício Fontes (Mau) por me darem tanto carinho e força moral, além de serem um exemplo de responsabilidade e dedicação no que fazem,

À minha cunhada, Dra. Luciana Ferraz Gominho, parceira de pesquisa, pela orientação dispensada sempre que houve necessidade,

Aos afilhados, Giovanna, Luiz Henrique e João Maurício e ao sobrinho Arthur, fontes inesgotáveis de energia e amor,

Aos professores do Curso de Melhoramento Genético de Plantas, em especial a Dra. Rosimar Musser e ao Dr. Edson Ferreira da Silva pelos conhecimentos e amizade construída no decorrer deste período,

Aos amigos que participaram comigo da turma de pós-graduação em Melhoramento genético de Plantas 2006.1, e a minha amiga de equipe Roberta Lane, que me ajudaram, de uma forma ou de outra, a encarar os desafios deste curso e concluí-lo com êxito,

Às minhas amigas Walminha, Camila e Tatiana sempre ao meu lado para ajudar... como é bom saber que posso contar com vocês,

Um agradecimento especial a Dra. Lília Willadino, a Dra. Eline Waked e ao Professor Edson Ferreira da Silva, pelos conhecimentos repassados,

À todos que compõem a equipe de genoma de IPA, coordenados por Dra. Vírginia , obrigada pela acolhida e pela amizade,

Ao Dr. Roberto de Melo Moura, meu padrinho, e a minha madrinha, Eliane Moura, pelo incentivo e apoio desde o início da minha vida acadêmica,

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa que permitiu a minha dedicação exclusiva a esta pesquisa e ao apoio financeiro que permitiu a execução do nosso projeto, proveniente do Banco do Nordeste,

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	xii
Introdução Geral	1
Capítulo I: Revisão de Literatura	10
1. Revisão de Literatura	
1.1 Aspectos da Planta	11
1.1.1 Características botânicas	11
1.1.2 Origem e distribuição geográfica	13
1.2 Importância Econômica	15
1.2.1 A bananicultura em Pernambuco	19
1.3 Salinidade	20
1.3.1 Salinidade dos solos	20
1.3.2 Efeitos da salinidade sobre as plantas	21
1.4 A biotecnologia na seleção de genótipos tolerantes a salinidade	22
1.4.1 Diferencial display PCR – ddPCR	23
Referências	26
Capítulo II: Avaliação fisiológica e molecular de genótipos diplóides (AA) de bananeira (<i>Musa ssp.</i>) submetidos ao estresse salino	32
Resumo	33
Introdução	36
Material e métodos	37
Resultados e discussão	39
Conclusões	48
Referências	49

Capítulo III: Utilização da técnica de ddPCR (differential display PCR) na identificação de genes expressos em diplóides (AA) de bananeira submetidos ao estresse salino	53
Resumo	54
Introdução	57
Material e métodos	59
Resultados	61
Discussão	63
Conclusões	65
Referências	65
CONCLUSÕES GERAIS	71
ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Revisão de Literatura

- Figura 1. Representação esquemática das principais características botânicas da bananeira (*Musa* sp.). 12
- Figura 2. Fruto de bananeira diplóide com desenvolvimento seminífero (Fonte: Arquivo pessoal) 13
- Figura 3. Zona de produção de banana tipo exportação no mundo. (Fonte: <http://chiquita.com>, adaptado de ALMEIDA et al, 2001) 15
- Figura 4. Produção em tonelada/ano de banana dos principais países exportadores, no período de 2002 a 2004. (Fonte: FAO, 2004) 16
- Figura 5. Principais países importadores de banana no período de 2002 a 2004. (Fonte: FAO, 2004) 17
- Figura 6. Esquema geral da técnica de ddPCR. O RNA é representado por linhas tracejadas e o mRNA é indicado pela cauda poli-A. O cDNA representado por linhas contínuas. O primer âncora é indicado por TTTTMN (5'- 3'), onde o M é G, A ou C e N é qualquer um dos quatro nucleotídeos usuais. (Fonte: LEMOS, 2003 adaptado) 25

Capítulo II: Avaliação fisiológica e molecular de genótipos diplóides (AA) de bananeira (*Musa* ssp.) submetidos ao estresse salino

- Figura 1. Relação do tamanho entre folhas de bananeiras dos genótipos 4253-03 (1) e Birmânia (2) submetidas ao controle (A) e ao estresse salino (B) 41
- Figura 2. Correlação entre Sódio e Cálcio em dezenove genótipos diplóides de bananeira submetidos a dois níveis de NaCl (0mM e 100mM). 43
- Figura 3. Sintomas de toxidez em tecido foliar de bananeira (genótipo Sowmuk) 46
- Figura 4. Dendrograma da análise de agrupamento dos sete genótipos diplóides de bananeira baseados em marcadores RAPD, obtido por meio do 48

programa NTSYS-pc, usando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Capítulo III: Utilização da técnica de ddPCR (differential display PCR) na identificação de genes expressos em diplóides (AA) de bananeira submetidos ao estresse salino

Figura 1. Avaliação da qualidade do RNA extraído dos genótipos (1) Kha Nai On, (2) Birmânia e (3) Sowmuk, visualizados por meio de gel de desnaturante de agarose 0,8%. 68

Figura 2. Visualização em gel de agarose a 2% da qualidade do cDNA após as reações de transcrição reversa. O teste com dois primers randômicos (OPA 13 e OPF 07) consistiu na otimização do protocolo onde foi utilizado RNA extraído do limbo foliar do genótipo Birmânia frente a quatro tratamentos: utilização de RNase H[®] (+) ou ausência desta enzima (-) e a utilização da enzima super script III (R) e com a ausência desta enzima (sem referência do R). 68

Figura 3. *Differential Display* do limbo foliar de genótipos de bananeira – G2 – Khai Nai On, G2- Birmânia e G15 – Sowmuk , (1) sem tratamento salino e (2) com tratamento salino, (A) primer A3/ OPAA12, (B) primer A3/ OPAA19, (C) primer A3/PRIMER 3, (D) primer A1/OPAA19 e marcador molecular de 1Kb. As regiões de bandas foram caracterizadas em (▲) super expressadas, (▼) supra expressadas, (▶) bandas formadas apenas sob tratamento salino. 69

Figura 4 *Differential Display* do limbo foliar de genótipos de bananeira – G2 – Khai Nai On, G2- Birmânia e G15 – Sowmuk , (1) sem tratamento salino e (2) com tratamento salino, primer A4/ OPAA19 e marcador molecular de 1Kb. 70

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Revisão de Literatura

Tabela 1. Comparação entre a área de produção do Brasil com a de alguns países produtores de banana.	17
--	----

Capítulo II: Avaliação fisiológica e molecular de genótipos diplóides (AA) de bananeira (*Musa ssp.*) submetidos ao estresse salino

Tabela 1. Relação dos genótipos avaliados, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura- (CNPMPF).	38
Tabela 2. Análise das variáveis altura (ALT), diâmetro do pseudocaule (PC), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de 19 genótipos provenientes do BAG de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura- CNPMPF submetidos a dois níveis de salinidade (0mM e 100mM de Na Cl).	40
Tabela 3. Peso da matéria fresca (MF) e seca (MS) em diplóides de bananeira submetidos a níveis de NaCl	42
Tabela 4. Teores médios de cloro (Cl ⁻), magnésio (Mg ²⁺), cálcio (Ca ²⁺), potássio (K ⁺) e sódio (Na ⁺) no limbo foliar, pseudocaule e raiz/rizoma de dezenove genótipos provenientes do BAG de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura- CNPMPF submetidos a dois níveis de NaCl	43
Tabela 5. Teores de potássio (K ⁺) e sódio (Na ⁺) no limbo foliar e raiz/rizoma de dezenove genótipos provenientes do BAG de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura- CNPMPF submetidos a 100mM de NaCl.	45

RESUMO

O Nordeste do Brasil, maior produtor nacional de banana, apresenta como fator limitante a grande extensão de solos salinos. A urgência no desenvolvimento de cultivares tolerantes a salinidade tem levado programas de melhoramento genético da cultura a classificar os genótipos diplóides de bananeira em tolerantes e sensíveis, por serem considerados materiais genéticos viáveis para polinização de cultivares triplóides e tetraplóides. De modo geral, o presente trabalho buscou caracterizar genótipos diplóides pertencentes ao grupo genômico AA de bananeira quanto a salinidade além de identificar genes diferencialmente expressos nos genótipos contrastantes. Na primeira fase desta pesquisa, foi avaliado o crescimento vegetativo e o acúmulo de íons inorgânicos em 19 genótipos diplóides (AA) de bananeiras submetidas a estresse salino. Os genótipos foram cultivados em casa de vegetação e submetidos à irrigação com água não salina (0 mM de NaCl) ou água salina (100 mM de NaCl) durante um período de 21 dias, quando foi coletado o experimento. Para a avaliação fisiológica, foram considerados os parâmetros de crescimento: área foliar, altura, nº de folhas, diâmetro do pseudocaule, peso da matéria fresca e peso da matéria seca; enquanto que a avaliação química observou a concentração dos íons sódio, potássio, cloro, magnésio e cálcio no limbo foliar, pseudocaule e raiz/rizoma. A adição de NaCl à solução de cultivo, provocou, de modo geral, redução no crescimento expresso pela altura, formação de novas folhas, área foliar, diâmetro do pseudocaule e produção de matéria fresca e seca, provavelmente devido a fatores 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. Na avaliação química, foi possível observar que a concentração dos íons foi preferencialmente no tecido radicular, reafirmando tratar-se de uma cultura moderadamente tolerante a salinidade. Os íons

sódio e cloro aumentaram significativamente frente ao incremento salino nas diferentes partes da planta, enquanto o potássio sofreu redução no limbo foliar e no pseudocaule, possivelmente por estar associado a competição com o íon sódio levando a conclusão de que o acúmulo diferencial de íons potencialmente tóxicos (sódio e cloro) e a manutenção do potássio, contribuem para a tolerância à salinidade em bananeira. A partir da análise fisiológica e por meio da sintomatologia de toxidez provocada pelo NaCl, foi possível observar que os efeitos foram menos intensos nos genótipos Birmânia e Khai Nai On, do que no Sowmuk, indicando possíveis plantas a serem utilizadas nos programas de melhoramento da cultura como tolerantes e sensível, respectivamente. Sete genótipos foram selecionados para caracterização por meio de marcadores moleculares RAPD, buscando-se relacionar as respostas fisiológicas ao estresse salino com a formação de grupos. Foram testados 16 *primers* randômicos. Os resultados moleculares mostram uma ampla variabilidade genética entre os sete genótipos estudados. A formação dos agrupamentos, em parte correspondeu aos dados obtidos na avaliação fisiológica, mantendo em um mesmo grupo os genótipos Birmânia e Khai Nai On. Estes genótipos que apresentaram maior tolerância ao estresse salino, quando comparados com a mais sensível ao sal (Sowmuk), mostraram-se distantes geneticamente, o que vem a demonstrar a possibilidade de utilização deste marcador molecular no estudo da diversidade genética para esta espécie. Para o estudo do genoma funcional, ou transcriptoma, o presente trabalho objetivou a detecção das possíveis alterações no padrão de genes expressos nos três genótipos diplóides (AA) de bananeira, Khai Nai On, Birmânia e Sowmuk, com respostas contrastantes quando na ausência e presença de alta concentração salina. A técnica de *Differential Display* PCR – ddPCR foi utilizada para identificar e comparar regiões de bandas de fragmentos de cDNA em gel de agarose. Um total de 43 fragmentos

de cDNA diferencialmente expressos foram gerados a partir da combinação de quatro *primers* âncoras e seis *primers* aleatórios. Dentre os transcritos, 30 foram expressos unicamente pelos genótipos Birmânia e Kha Nai On, e 13 apenas pelo genótipo Sowmuk. As regiões de bandas com maior consistência de formação, encontraram-se entre 4000 pb e 150 pb. Pelos resultados deste trabalho, foi possível identificar alguns fragmentos potencialmente envolvidos em respostas à condição de salinidade em bananeira. O isolamento, purificação e sequenciamento destes – Expressed sequence tags - ESTs poderá auxiliar no desenvolvimento de novos cultivares de bananeira, mais adaptados ao estresse salino, além de enriquecer a base de dados de bancos públicos de seqüências de genomas funcionais.

Palavras-chave: Banana, cDNA, estresse salino, RAPD, solos salinos.

ABSTRACT

The Northeast of Brazil, major national producer of bananas, presents as a major limiting factor the stretch of saline soil. The urgency in the development of tolerant cultivars to salinity has led to breeding programs with the aimed to differ the bananas cultivars in diploid genotypes tolerant and sensitive, to be considered viable genetic material for pollination of triploid and tetraploid cultivars. Generally, the present study aimed to characterize diploid genotypes belonging to the AA banana genomic group on salinity and identify genes differentially expressed in contrasting genotypes. At first, this research assessed the growth and accumulation of inorganic ions in 19 diploid genotypes (AA) of bananas subjected to salt stress. The genotypes were grown in a greenhouse and submitted to irrigation with no saline water (0 mM NaCl) or with saline water (100 mM NaCl) for a period of 21 days, when the experiment was collected. To the physiological evaluation, were considered the parameters of growth: leaf area, height, number of leaves, diameter of the pseudostem, weight of the tax burden of fresh and dry, while the chemical assessment observed the concentration of sodium ions, potassium, chloride, magnesium and calcium in limbo leaf, and root pseudostem / subroot. The addition of NaCl to the cultivar solution has, in general, reduced the growth expressed by height, formation of new leaves, leaf area, diameter of the pseudostem and production of fresh and dry materials. This reduction in growth probably due to factors such as: the toxic effect of ions that have been absorbed, the low osmotic and water potential of the cells as well as the use of metabolic energy in the process of osmotic adjustment. In assessing chemical factors, it was possible to observe that the ions concentration has been preferentially presented in root tissue, showing that it is a culture moderately tolerant to salinity. The sodium and chlorine ions increased significantly with the salt increase in different

parts of the plant, while potassium suffered reduction in the leaf lamina and the pseudostem probably because it is associated to the competition with the sodium ion leading to the conclusion that the differential accumulation of ions potentially toxic (sodium and chlorine) and the maintenance of potassium, contribute to the tolerance to salinity in banana. From the physiological analysis and by means of the toxicity symptoms caused by NaCl, it was possible to observe that the effects were less intense in Birmania and Khai Nai On genotypes, than in Sowmuk, its indicates the possibility of use of this plants in programmes for cultivars improvement as tolerant and sensitive, respectively. Seven genotypes were selected for characterization by means of molecular markers RAPD, with the aim to link the physiological responses to salt stress with the formation of groups. We tested 16 random primers. The results show a broad molecular genetic variability among seven genotypes studied. The formation of groups, in part is related to the data obtained in the physiological assessment, keeping in the same group the Birmania and Khai Nai On genotypes. These genotypes that showed higher tolerance to salt stress, when compared to the more salt-sensitive genotype (Showmuk), became distant genetically, so, it can be noticed the possibility of use of this molecular marker in the study of genetic diversity for this species. For the genome functional study, or transcriptoma, this study aimed the detection of possible changes in the pattern of genes expressed in the three diploid genotypes (AA) of banana, Khai Nai On, Burma and Sowmuk with contrasting results when in the absence and presence of high salt concentrations. The Differential Display PCR - ddPCR technique was used to identify and compare regions of bands from fragments of cDNA on agarose gel. A total of 43 fragments of differentially expressed cDNA was generated from the combination of four primers anchors and six random primers. Among the transcripts, 30 were once expressed by the genotype Burma and Kha Nai On, and 13 only by Sowmuk genotype. The

regions of bands with greater consistency of formation, is between 4000 bp and 150 bp. By the results of this research, it was possible to identify some fragments potentially involved to the condition of salinity in banana. The isolation, purification and sequencing of these - Expressed sequence tags - ESTs can assist in the development of new varieties of banana, more adapted to salt stress, in addition to enriching the database of public functional sequences of genomes banks.

Keywords: Banana, cDNA, salinity stress, RAPD, saline soils.

INTRODUÇÃO GERAL

A bananeira (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea, pertencente à classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, superordem Lilianaes, ordem Zingiberales, família Musaceae (CRONQUIST, 1981; BELALCÁZAR CARVAJAL, 1991), sendo esta família dividida em três subfamílias: Heliconoideae, Strelitzoideae e Musoideae. A subfamília Musoidea apresenta dois gêneros, Ensete e Musa. O gênero Musa, ao qual pertencem as bananeiras com frutos comestíveis, está subdividido nas seções Australimusa, Callimusa, Rhodoclamys e (Eu)musa. A seção (Eu)musa é a mais importante por abranger maior número de espécies de bananas comestíveis e apresentar ampla dispersão geográfica. Inclui as espécies *Musa balbisiana* (Colla), *Musa acuminata* (Colla) e *Musa halabanensis* (TEZENAS DU MONTCELL, 1988).

O centro de origem da maior parte do germoplasma de bananeira é o continente asiático. Outros centros secundários ocorreram na África Oriental, em algumas ilhas do Pacífico e uma considerável diversidade genética na África Ocidental (CHAMPION, 1967). Os cultivares encontrados nestas regiões evoluíram de espécies selvagens e apresentam três níveis cromossômicos, existindo diplóides com $2n = 22$ cromossomos, triplóides com $3n = 33$ cromossomos e tetraplóides com $4n = 44$ cromossomos (SHEPHERD, 1984). Cruzamentos interespecíficos entre *M. acuminata* Colla (grupo genômico A) e *M. balbisiana* Colla (grupo genômico B), originaram a maioria dos genótipos de bananeiras comerciais. Hoje a classificação adotada em todo o mundo, segue os estudos desenvolvidos por Simmonds e Shepherd (1955), que apontam para grupos genômicos diplóides AA e AB; triplóides AAA, AAB e ABB e tetraplóides AAAA, AAAB, AABB e ABBB.

A banicultura é uma atividade de importância econômica em todo o mundo, estando presente em quase todos os países tropicais e subtropicais. O Brasil, como país tropical, apresenta-se como segundo maior produtor mundial, ficando atrás apenas do Equador, com uma produção de 6,73 mil toneladas por ano, representando aproximadamente 10% da produção mundial, em uma área colhida de 507.000 ha (FAO, 2006). O consumo per capita no Brasil é de, aproximadamente, 24,5 kg/hab/ano, sendo a produção destinada, praticamente, ao mercado interno. A banana, atualmente, corresponde a segunda fruta mais consumida no país, perdendo apenas para a laranja, desempenhando papel altamente relevante no agronegócio brasileiro, além de representar um importante valor social ao melhorar a dieta alimentar da população mais carente e contribuir na fixação de mão de obra no meio rural (PEREIRA e GASPAROTTO, 2005).

A principal região produtora de banana é a Região Nordeste, responsável por 34% da produção nacional, seguida das Regiões Norte (26%), Sudeste (24%), Sul (10%) e Centro-Oeste (6%) (BORGES, 2003). O Estado de Pernambuco, sexto na produção brasileira, tem cerca de 38.000 ha plantados (CORDEIRO, 2003), porém, no nordeste parte dos solos, mais precisamente nas áreas irrigadas das zonas semi-áridas, encontra-se com teores de sais elevados, devido ao manejo inadequado e ao uso de água de irrigação de má qualidade, o que provoca efeitos deletérios no rendimento da cultura (BORGES e CINTRA, 1998).

A salinidade do solo é tida mundialmente como um dos sérios problemas abióticos da agricultura. De acordo com a FAO (2004), em nível global, o problema da salinidade já ocorre em 397 milhões de hectares. Anualmente, 10 milhões de hectares de terras irrigadas são abandonados devido aos problemas de salinização e/ou sodicidade (MACÊDO et al., 2005). Fatores ambientais que favorecem a elevada evapotranspiração, o uso de água de má qualidade aliada a um sistema inadequado de drenagem, estão relacionados à salinização dos solos. O Nordeste Brasileiro apresenta uma área potencial para irrigação estimada em 6 milhões de hectares onde, segundo Brito (2002), 25% dos perímetros irrigados existentes desta região estão salinizados. Por exemplo, no perímetro irrigado de São Gonçalo-PB, cerca de 40% da área irrigada já estão afetadas por sais. Já o Município de Custódia/PE apresenta 70% do perímetro irrigado salinizado. Na região do pólo Petrolina-PE/Juazeiro-BA, que conta com seis perímetros irrigados, em uma área de 38.917 ha, tem-se observado que, aproximadamente, 20% dessa área apresentam reduções na produção agrícola e diminuição da área total irrigada devido à salinização do solo (MOURA, 2000). As práticas de recuperação de solos com problemas acentuados de sais, em sua maioria, são onerosas e demoradas; daí uma maior necessidade de identificar cultivares tolerantes à salinidade (ARAÚJO FILHO et al., 1995).

O alto teor de sal presente no solo dificulta, ou mesmo, torna impossível, a sobrevivência da maior parte das espécies vegetais. Poucas espécies, como as halófitas, desenvolveram adaptações secundárias que tornou possível sua sobrevivência em ambientes com níveis de salinidade equivalentes àqueles encontrados nas águas do mar. Essas espécies de plantas toleram uma concentração máxima de sal em torno de 100 mM. Um dos efeitos mais marcantes da salinidade sobre as plantas classificadas glicófitas, é a inibição do crescimento.

São observadas redução da altura, da área foliar e do acúmulo de matéria fresca e seca na parte aérea e raízes (GOMES et al., 2006). Esses efeitos podem ser resultantes da redução na fotossíntese, respiração, transpiração, translocação e um desbalanço hídrico e/ou iônico na planta (MARCHNER, 1992).

Segundo Zhu (2001), a resposta vegetal às condições de salinidade está relacionada à expressão de vários genes, onde 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.

O melhoramento genético da bananeira em todo o mundo enfoca, sobretudo, os aspectos de resistência a pragas e doenças (CROUCH et al., 1998). O melhoramento genético da bananeira visando tolerância à salinidade é necessário para aumentar a produtividade dessa cultura e possibilitar a sua ocupação em áreas salinizadas que são constantemente abandonadas, sobretudo na região Nordeste do Brasil. Uma das estratégias para promover esta reincorporação de áreas salinizadas e o aumento da produtividade consiste no desenvolvimento e na seleção de genótipos tolerantes a salinidade (SHANNON, 1997; GOMES et al., 2006)

A aplicação cada vez maior da biotecnologia vem contribuindo no desenvolvimento de novas cultivares que mantenham as características agrônomicas e de mercado, e que apresentem novos valores de interesse para a agroindústria bananeira como, por exemplo, tolerância à salinidade, proporcionando maior produtividade da cultura em áreas salinizadas (GOMES et al., 2002). Neste contexto, as técnicas moleculares poderão levar ao conhecimento do genoma funcional de características de interesse, cuja fonte de genes se encontram nas espécies de *Musa* sp. principalmente aquelas provenientes da *Musa acuminata*.

Alguns métodos têm sido utilizados para analisar a expressão gênica diferencial, dentre estes destacam a *library subtraction* (biblioteca de subtração), ddPCR – *differential display* PCR (apresentação diferencial) e DNA *Microarrays* (micro arranjos de DNA) (FREEMAN et al, 2000). Dessas três técnicas, o DNA *Microarrays* é a que fornece a maior quantidade de informações, entretanto por ser bastante onerosa, devido a alta tecnologia empregada, o seu uso é limitado em muitos laboratórios. A técnica de *library subtraction* e a *differential display*, mesmo

gerando um número menor de informação que a anterior, apresenta custo baixo, quando comparado a outras técnicas de estudo de expressão gênica, e é de fácil implementação (CASAGRANDE et al., 2001). A técnica de ddPCR, descrita inicialmente por Liang e Pardee (1992), promoveu grande avanço nos estudos de expressão gênica em eucariotos, permitindo análises comparativas, isolamento e caracterização de novos genes relacionados aos mais variados processos biológicos (WILKINSON et al., 1995; WILKINS et al., 1998; CASAGRANDE et al., 2001). Esta metodologia foi usada com sucesso no isolamento de genes diferencialmente expressos em plantas envolvendo vários eventos fisiológicos, tais como: identificação de genes envolvidos na interação planta patógeno (BENITO et al., 1996) e respostas ao estresse hídrico e salino (CASAGRANDE et al., 2001; LONG-XI e SETTER, 2003).

Muitos genes são expressos pelas plantas em resposta ao estresse salino (herança poligênica), tornando-se difícil de serem estudados em melhoramento genético clássico, o que dificulta o desenvolvimento de cultivares tolerantes, principalmente no que se refere a bananicultura (HASEGAWA et al., 2000). A biologia molecular, que assume papel chave na identificação dos genes envolvidos, mostra também que a indução ou a inibição de genes em resposta ao estresse leva a ativação de vias biossintéticas de compostos químicos e de complexos protéicos, cuja função é auxiliar ou mediar os mecanismos de defesa da planta. Algumas moléculas sintetizadas como consequência do estresse têm sido caracterizadas em diversas espécies, tais moléculas atuam como compostos osmoprotetores na célula vegetal (ZHU, 2001). A identificação de genes envolvidos nas respostas ao estresse salino irá permitir elaborar novas estratégias de melhoramento genético e de transgenia direcionada intra e interespecífica, uma vez que serão identificados e compreendidos rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas ao estresse salino.

Esta pesquisa, faz parte do projeto **Seleção de genótipos de bananeira tolerantes à salinidade, assistida por variáveis fisiológicas e biotecnológicas**, financiado pelo BNB/FUNDECI, no qual foram avaliados setenta e seis genótipos diplóides, triplóides e tetraplóides, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da tolerância à salinidade dos materiais vegetais diplóides de bananeiras (AA) e utilização da técnica de ddPCR

(*differential display* PCR) visando a identificação e caracterização funcional de genes de tolerância ao estresses salino em banana (*Musa* spp.)

REFERÊNCIAS

ARAÚJO FILHO, J.B.; GHEYI, H.R.; AZEVEDO, N.C.; SANTOS, J.G.R. Efeitos da salinidade no crescimento e no teor de nutrientes em cultivares de bananeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.19, 1995. p.417.

BELALCÁZAR CARVAJAL, S.L. El cultivo del plátano en trópico. Cali, Colombia: **ICA**, 1991. 375p.(ICA.Manual de Assistência Técnica, 50).

BENITO, E.P., PRINS, T., VAN KAN, J.A.L. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], n. 32, 947-957, 1996.

BORGES, A.L. Cultivo da banana para o agropólo Jaguaribe-Apodí, Ceará. Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF, Sistema de produção, n. 5, 2003. Versão eletrônica. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaJuazeiro/importancia.htm>> Acessado dia: 28/09/2006.

BORGES, A.L.; CINTRA, F.L.D. Queima das folhas de bananeira no Nordeste do Brasil. **EMBRAPA/CNPMF**. Documentos 35/91, 1998.16p.

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.

CASAGRANDE, E. C. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v.13, n.2, p.168-184, 2001.

CHAMPION, J. **Les bananiers et leur culture; Tome I: Botanique et genetique.** Paris: IFAC, 1967. 214p.

CORDEIRO, Z. J. M. Cultivo da banana para o pólo Petrolina Juazeiro. **EMBRAPA** Mandioca e Fruticultura – CNPMF, Sistema de produção, n. 10, 2003. Versão eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaJuazeiro/importancia.htm> acessado dia: 28/09/2006.

CRONQUIST, A. The divisions and classes of plants. **Botanical Review**, New York, v. 26, n. 4, p. 425-482, 1981.

CROUCH, J. H.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Perspectives on the application of biochemistry to assist the genetic enhancement of plantain and banana. **Electronic Journal Biotechnology**, [S.l.], v.1, p.1-12. 1998.

FAO. Statistics. Agricultural. Production. Crops. Primary. Disponível em: <<http://www.fao.org> > Acesso em fevereiro de 2004.

FREEMAN, W. M.; ROBERTSON, D. J.; VRANA, K. E. Fundamentals of DNA Hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques**, New York, v. 29, p.1042-1055, 2000.

GOMES, E. W. F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. S.; CÂMARA, T. R. Variedades de bananeira tratadas com água salinizada em fase inicial de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.Suplem, p. 31-36, 2006.

GOMES, E. W. F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. S.; CÂMARA, T. R.; SILVA, S. O. Banana genotypes under salt stress: tolerance and sensitivity. **Infomusa**, Montpellier, v. 11, n. 2, p. 13-18, 2002.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, JIAN-KANG; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Plant Molecular Biology**, [S.l.],

n. 51, p. 463-492, 2000.

LIANG, P.; PARDEE A. B. *Differential Display* of eukaryotic messenger RNA by means of the Polymerize Chain Reaction. **Science**, [S.l.], v. 257, p. 967-971, 1992.

LONG-XI, YU ; SETTER, T.L. Comparative transcriptional profiling of placenta and endosperm in developing maize kernels in response to water deficit¹, **Plant Physiology**, Califórnia, v. 131, p. 568–582, 2003.

MACEDO, C. E. C.; BARROSO, P. A. V.; MOURA, G. E. D. D. Efeito do NaCl sobre o crescimento e a multiplicação *in vitro* de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 27, n. 2, p.194-197, 2005.

MARCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 4ed., Belfast: The Universities Press, 674p, 1992.

MOURA, R.F. Efeito das lâminas de lixiviação de recuperação do solo e da salinidade da água de irrigação sobre os componentes de produção e coeficiente de cultivo da beterraba. 2000. 211f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2000.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L. Contribuição para o reconhecimento das sigatokas negra e amarela e das doenças vasculares da bananeira. 1ª. ed., Manaus: **EMBRAPA** Amazônia Ocidental, 2005. 1CD-ROM.

SHANNON, M.C. Adaptation of plants to salinity. Adv. **Agronomy**, Madson, v. 60, p.76-199. 1997.

SHERPHERD, K. Banana: taxonomia e morfologia. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA**, 1, Jaboticabal, SP, Anais... Jaboticabal, SP: FCAVJ/UNESP, 1984. p. 50-74.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The Journal of the Linnean Society of London**, London, v.55, p.302-312, 1955.

TEZENAS DU MONTCEL, H. *Musa acuminata* subsp. *banksii* status and diversity. In: **WORKSHOP ON IDENTIFICATION OF GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS MUSA**, INIBAP, Montpellier, 1988, p 12.

WILKINS, T. A.; TURLEY, R. B.; TROLINDER, N.; KOONCE, L.; DEVER, J.; RAJASERKARAN, K.; ZIPF, A.; NEPOMUCENO, A. L. Cotton biotechnology workshop: The rudiments of cotton transformation and biotechnology. pp. 96-99. In: **NATIONAL COTTON COUNCIL**, ED. PROCEEDINGS. BELTWIDE COTTON CONFERENCE. San Diego, CA, 1998.

WILKINSON, J. Q.; LANAHAN, M. B.; CONNER, T. W.; KLEE, H. J. Identification of RNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction *Differential Display*. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], v. 27, p.1097-1108, 1995.

ZHU, J. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.6, n.2, p.66 - 71, 2001.

**CAPÍTULO I:
REVISÃO DE LITERATURA**

1.1 Aspectos da planta

1.1.1 Características botânicas

A bananeira (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea e apresenta sistema radicular fasciculado, ausência de câmbio vascular e flores tipicamente trímeras, pertencendo à classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, superordem Lilinae. A presença do perigônio colorido e ovário ínfero permitem classificá-la na ordem Zingiberales, família Musaceae (CRONQUIST, 1981; BELALCÁZAR CARVAJAL, 1991), sendo esta família dividida em três subfamílias: Heliconoideae, Strelitzoideae e Musoideae. A subfamília Musoidea apresenta dois gêneros, *Ensete* e *Musa*. O gênero *Musa*, ao qual pertencem as bananeiras com frutos comestíveis, está subdividido nas seções Australimusa, Callimusa, Rhodoclamys e (Eu)musa. A seção (Eu)musa é a mais importante por abranger maior número de espécies de bananas comestíveis e apresentar ampla dispersão geográfica. Inclui as espécies *Musa balbisiana* (Colla), *Musa acuminata* (Colla) e *Musa halabanensis* (TEZENAS DU MONTCELL, 1988). Trata-se de uma planta alógama, monóica, e apresenta a inflorescência em forma de uma espiga simples, terminal, que emerge do centro das bainhas foliares, protegidas por uma grande bráctea, comumente denominada de coração ou mangará. As flores da bananeira apresentam ovário ínfero trilocular e cinco estames. Ovários bem desenvolvidos e estames carnosos não funcionais são encontrados em flores femininas enquanto que nas flores masculinas é encontrado ovário atrofiado e estames com anteras bem desenvolvidas. Os grãos de pólen apresentam coloração branca amarelada, inviável em grande parte dos cultivares, ao contrário do que ocorre com espécies selvagens (MOREIRA, 1999; SILVA, et al., 2002) (Figura 1).

A ráquis apresenta, no decorrer do seu desenvolvimento, duas partes, sendo a primeira constituída de flores femininas, onde se originam os frutos, e a segunda, posicionada na extremidade, com flores masculinas. As flores femininas sofrem antese antes das flores masculinas e, com isso, quando os grãos de pólen das flores masculinas estão viáveis para a polinização, os ovários das flores femininas já não estão mais receptivos, sendo possível a autofecundação apenas nos casos entre perfilhos diferentes de uma mesma planta (MOREIRA, 1999) (Figura 1).

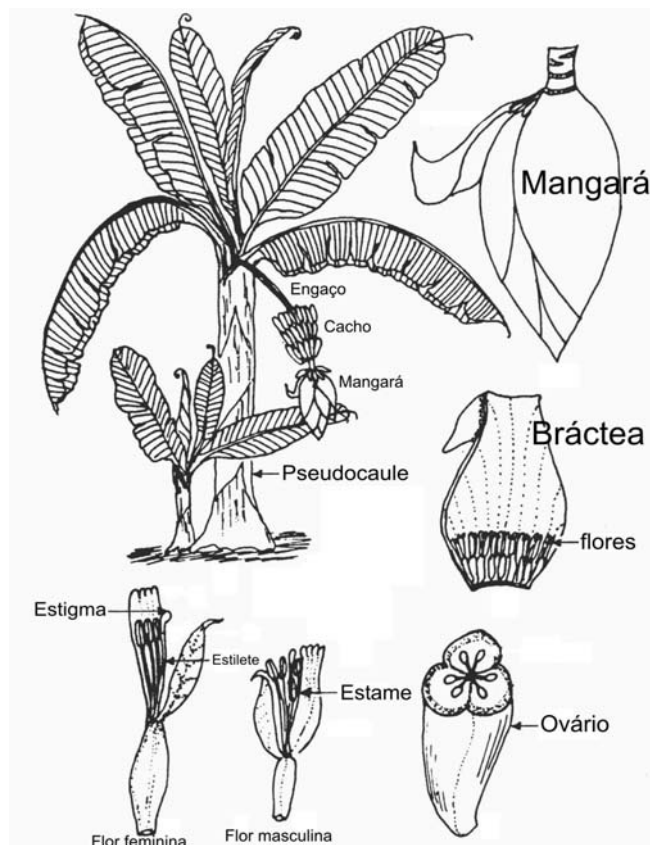


Figura1. Representação esquemática das principais características botânicas da bananeira (*Musa sp.*).

Os frutos de banana mostram duas vias de desenvolvimento: partenocárpico ou seminífero. As bananas seminíferas, ou seja, aquelas que apresentam sementes, geralmente, são diplóides ($2n=22$) selvagens, podendo ser disseminada por sementes ou por meio vegetativo (Figura 2), enquanto que as bananas de interesse comercial cuja cultivares não apresentam sementes, geralmente triplóides ($2n=33$), são propagadas exclusivamente por meio vegetativo, por meio de estruturas popularmente denominadas de “chifre”, “chifrinho” e “chifrão”, ou mesmo por meio de mudas desenvolvidas a partir de gema do caule subterrâneo ou rizoma. Devido a intensa seleção agrônômica desta cultura, hoje grande parte dos cultivares de interesse comercial não apresenta sementes em seus frutos, dificultando o aumento natural da variabilidade genética da bananeira (SHEPHERD et al., 1984; SILVA et al., 2003).



Figura 2. Fruto de bananeira diplóide com desenvolvimento seminífero. (Fonte: Arquivo pessoal)

Uma fonte secundária de diversidade são as mutações que ocorrem de forma natural, originando novas cultivares, uma vez que a propagação se dá de forma vegetativa (RAVEN et al., 2001). Assim sendo, além da classificação considerando seu grupo genômico, foi estabelecido o termo subgrupo para denominar um complexo de cultivares, originados a partir de mutações de um único cultivar original, como no caso do grupo genômico AAA, subgrupo Cavendish e do grupo AAB, subgrupos Prata e Terra (SILVA et al., 2002).

1.1.2 Origem e distribuição geográfica

Banana é uma palavra oriunda das línguas serra-leonesa e liberiana, incorporada pelos portugueses à sua língua. Esta cultura tem como centro de origem, da maior parte do germoplasma, o continente asiático. Outros centros secundários ocorreram na África Oriental, em algumas ilhas do Pacífico e uma considerável diversidade genética na África Ocidental (CHAMPION, 1967). Alguns documentos apontam a existência de banana em Uganda há mais de 2.000 anos, com base em estudos feitos em fitólitos, cristais de sílica hidratada absorvidos pelas

raízes (MOREIRA e CORDEIRO, 2006). Os cultivares encontrados nestas regiões evoluíram de espécies selvagens e apresentam três níveis cromossômicos, existindo diplóides com $2n = 22$ cromossomos, triplóides com $3n = 33$ cromossomos e tetraplóides com $4n = 44$ cromossomos (SHEPHERD et al., 1984). Cruzamentos interespecíficos entre as diplóides selvagens *M. acuminata* Colla (grupo genômico A) e *M. balbisiana* Colla (grupo genômico B), originaram a maioria dos genótipos de bananeiras comerciais. Hoje a classificação adotada em todo o mundo, segue os estudos desenvolvidos por Simmonds e Shepherd (1955), que apontam para grupos genômicos diplóides AA e AB; triplóides AAA, AAB e ABB e tetraplóides AAAA, AAAB, AABB e ABBB.

A História da chegada da bananicultura nas Américas ainda é bastante discutida. Relatórios de viagem de Cristóvão Colombo mostram que quando chegou às Antilhas em 1492, encontrou os índios comendo bananas. Ainda conforme seu relatório de viagem os Incas tinham a banana na sua alimentação básica. No que se refere a introdução da banana no Brasil, é certo afirmar que as bananeiras existem desde antes do seu descobrimento por Pedro Álvares Cabral. As primeiras informações de que os indígenas já conheciam e plantavam a banana, datam de 1500, as quais foram escritas por Pero Vaz de Caminha ao descrever o que vira por ocasião da chegada deles em nossas terras, as quais foram publicadas em 1780, no livro "O tratado" por Pero de Magalhães Gândavo (MOREIRA e CORDEIRO, 2006)

Atualmente, a bananicultura encontra-se amplamente distribuída por quase todos os países, havendo um maior incremento na produtividade nos países tropicais e subtropicais, sendo o Equador o maior produtor mundial, responsável pelo maior percentual de exportação desta fruta, seguido da Costa Rica (FAO, 2006) (Figura 3). Os referidos países estão localizados próximos à linha do equador, onde predomina um clima quente, fator este favorável para a produção de bananas com alto padrão de qualidade (ALMEIDA et al., 2001).

No Brasil, a bananicultura é cultivada em todos os Estados, desde a faixa litorânea até os planaltos do interior. A Região Sudeste apresenta o maior percentual de produtividade, 33%, sendo representado pelo Estado de São Paulo: Registro, Itariri, Eldorado, Miracatú, Sete Barras, Cajati, Pedro de Toledo e Jacupiranga; seguido pelo norte de Minas Gerais: Janaúba, Jaíba, Pirapora, Montes Claros e Itacarambi; o Norte de Santa Catarina: Corupá, Massaranduba, Jaraguá do Sul,

Guaramirim, Praia Grande, Luis Alves e Schroeder e o Nordeste: Petrolina e Juazeiro (CENTEC, 2004).

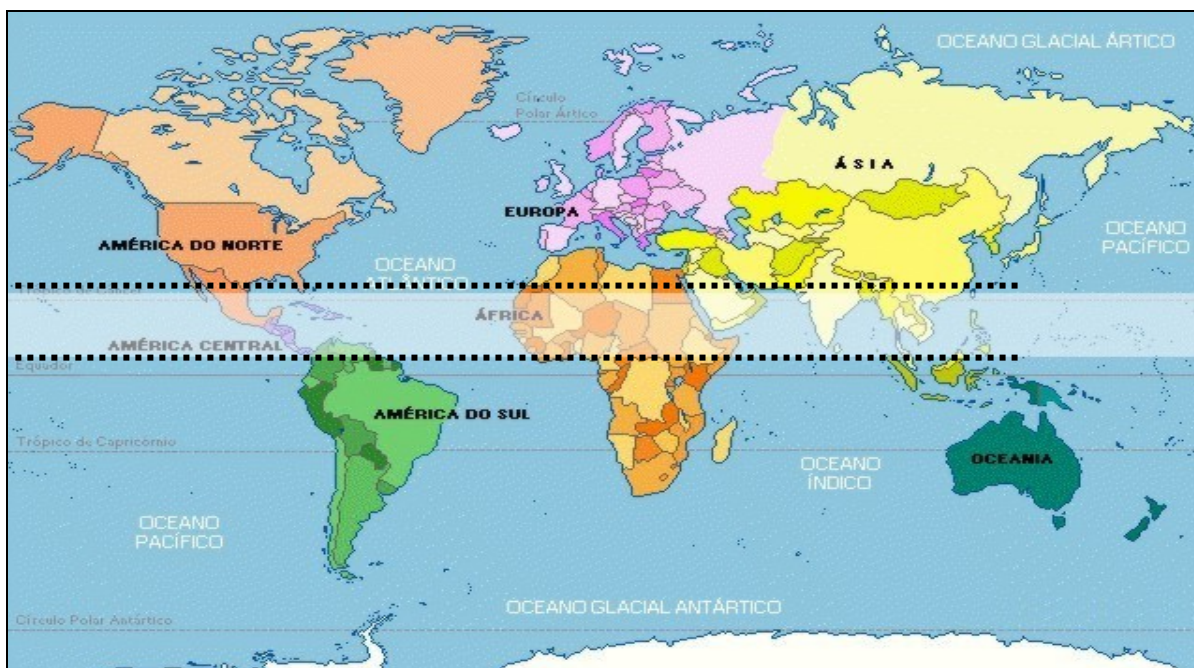


Figura 3. Zona de produção de banana tipo exportação no mundo. (Fonte: <http://chiquita.com>, adaptado de ALMEIDA, et al., 2001.

1.2 Importância Econômica

A bananicultura é uma atividade de importância econômica e social em todo o mundo, estando presente em quase todos os países tropicais e subtropicais. Segundo a Unctad (2003), em 2000 um total 123 países produziram bananas, porém tanto a importação quanto a exportação concentram-se em poucos países. Cerca de 98% da produção mundial se dá em países em desenvolvimento, sendo os países desenvolvidos o destino habitual das exportações. A análise estatística da FAO (2004) aponta para a conservação desta tendência, mostrando o Equador, com produção de 4.500 toneladas/ano, como o principal exportador mundial, seguido da Costa Rica, Colômbia, Filipinas, Panamá e Guatemala (Figura 4).

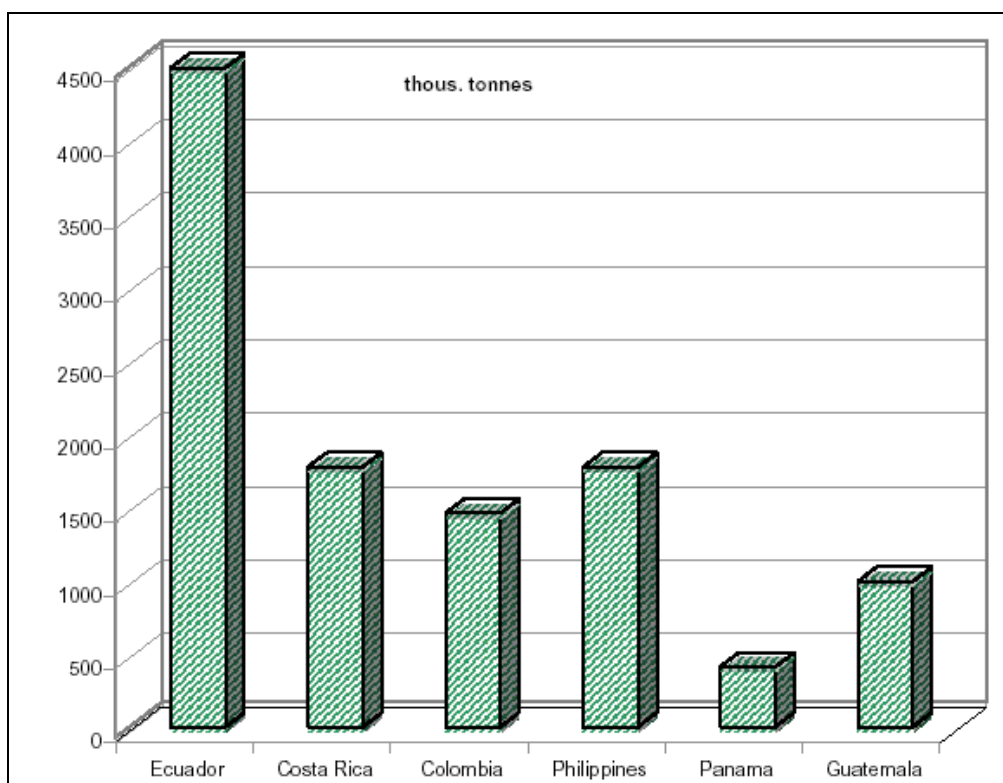


Figura 4. Produção em tonelada/ano de banana dos principais países exportadores, no período de 2002 a 2004. (Fonte: FAO, 2004).

Os principais países importadores desta fruta são os Estados Unidos, União Européia, Japão, Rússia e China responsáveis por cerca de 79% do valor mundialmente comercializados pelo período de 2002 a 2004 (FAO, 2004) (Figura 5).

Segundo a FAO (2006), o Brasil no ano de 2004 apresentava-se como segundo maior produtor mundial, com produção de 6,730 mil toneladas por ano, representando aproximadamente 10% da produção mundial, em área colhida de 8.511 mil km². A produtividade média brasileira ainda é baixa, apenas 13,5 t/ha⁻¹, diante do desempenho dos outros países que lideram o mercado global, como a Costa Rica, com produtividade de 46,6 t/ha (FAO, 2006) em área plantada de 50 mil km², o que representa o triplo da produtividade alcançada pelo Brasil em área 170,22 vezes menor (MOREIRA e CORDEIRO, 2006) (Tabela 1).

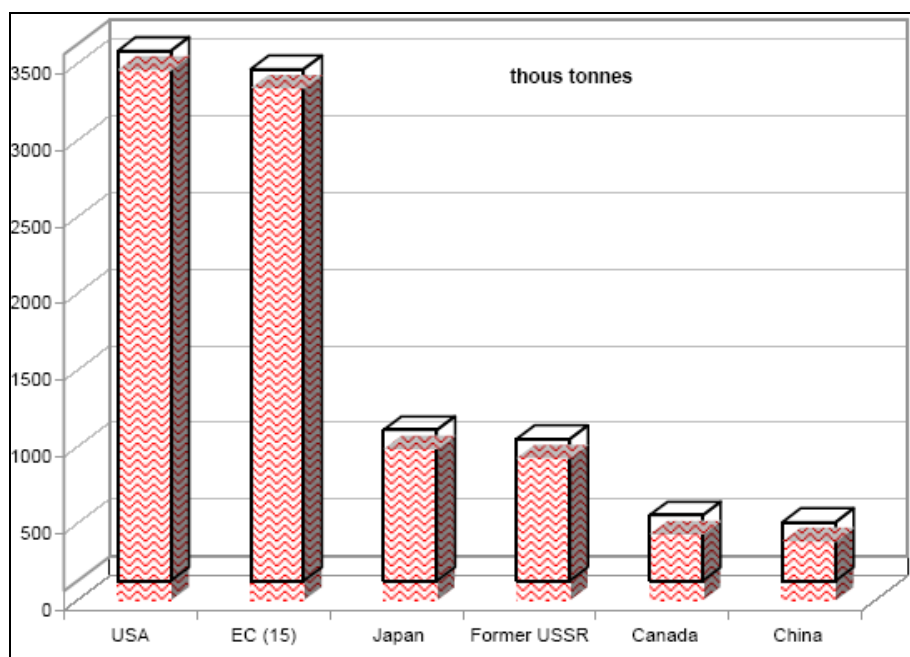


Figura 5. Principais países importadores de banana no período de 2002 a 2004. (Fonte: FAO, 2004)

Tabela 1. Comparação entre a área de produção do Brasil com a de alguns países produtores de banana

PAÍS	ÁREA DE PRODUÇÃO	COMPARAÇÃO COM A ÁREA DO BRASIL
Brasil	8.511 mil km ²	
Índia	3.287 mil km ²	2,58 vezes menor
México	1.972 mil km ²	4,31 vezes menor
Colômbia	1.138 mil km ²	7,47 vezes menor
Venezuela	916 mil km ²	9,32 vezes menor
Equador	283 mil km ²	30,07 vezes menor
Honduras	112 mil km ²	75,99 vezes menor
Costa Rica	50 mil km ²	170,22 vezes menor

(Fonte: Adaptado de MOREIRA e CORDEIRO, 2006).

O consumo *per capita* no Brasil é de, aproximadamente, 24,5 kg/hab/ano. A produção é destinada, praticamente, ao mercado interno. A banana em 2001 foi a segunda fruta mais consumida no país, perdendo apenas para a laranja. Apesar

desta posição no *ranking*, no mesmo ano a bananicultura foi a sétima em faturamento. Em 2002, frente a novas tecnologias, a banana foi a fruta mais exportada pelo Brasil, demonstrando a grande importância sócio econômica desta fruta para o agronegócio nacional. Um outro papel da banana, é a contribuição nutricional que permite melhorar a dieta alimentar da população mais carente e contribuir na fixação de mão-de-obra no meio rural (PEREIRA e GASPAROTTO, 2005).

O Brasil tem exportado cerca de 10% da sua produção, sendo o valor restante destinado ao mercado interno. Este baixo índice de exportação está relacionado a desqualificação do produto para o mercado europeu e norte americano, pois não atende às exigências dos mesmos, principalmente em relação às qualidades organolépticas da banana. No Brasil, a região Sudeste apresenta um maior potencial tecnológico para o desenvolvimento de bananas tipo exportação. No entanto, devido a fatores abióticos, tais como temperatura e luminosidade, há uma maior ocorrência de “chilling”, ou seja, escurecimento da casca da banana devido a temperaturas baixas, fazendo com que grande parte da produção não esteja com padrão de qualidade tipo exportação (CENTEC, 2004). A região nordeste apresenta temperatura e luminosidade favoráveis à cultura da banana, principalmente nos vales dos grandes rios do nordeste, pois além do clima ideal, a maior proximidade do mercado exportador seria um fator decisivo. Entretanto, a região ainda não possui tecnologias de produção, pós-colheita, comercialização e transporte ideal para o mercado internacional de banana, exceto a região do Vale do Rio Açú, no Rio Grande do Norte, onde se encontra um pólo de produção de banana de altíssima qualidade para esses mercados, comandado pela multinacional Del Monte. (MOREIRA e CORDEIRO, 2006).

Apesar desta carência tecnológica na bananicultura, no ano de 2003, o Nordeste do Brasil possuía 33% da área cultivada com banana, seguida pelo Sudeste com 28%, região Norte com 22%, sul com 9% e centro oeste com 8%. No entanto o Estado que apresentou maior produção foi São Paulo seguido do Estado da Bahia, Santa Catarina, Minas Gerais e Pará (AGRIANUAL, 2006).

1.2.1 A bananicultura em Pernambuco

A bananicultura foi introduzida no Estado de Pernambuco pelos portugueses com mudas da cultivar Nanica, vindas de São Tomé e ou de Cabo Verde, entre 1530 e 1550, visando um meio de sustentação dos índios escravizados, uma vez que estes já estavam acostumados a consumir banana. No entanto, as plantações de banana nunca chegaram a ser grandes plantios devido, principalmente, a indústria açucareira, sendo Pernambuco considerado a capital açucareira do Brasil (MOREIRA e CORDEIRO, 2006).

Atualmente, a produção de banana concentra-se em duas regiões de Pernambuco: Zona da Mata Sul, cuja principal cultura é a cana-de-açúcar, destacando-se nesta região os municípios de Maraial, Cortês, São Benedito do Sul, Água Preta, Amaraji e Ribeirão; e Zona da Mata Seca ou Mata Norte, destacando-se os municípios de São Vicente Ferrer, Vicência, Machados e Macaparana. Os plantios da Zona da Mata Sul tem como principal característica a utilização de cultivares, predominando a cultivar Pacovan, do subgrupo Prata. Na Zona da Mata Norte, os cultivos são mais diversificados, pois existem plantios de Nanica, Nanicão, do subgrupo Cavendish, e um pouco de Comprida do subgrupo Terra. Uma das principais características da bananicultura é a predominância de pequenos e médios produtores, característica esta observada nos bananais tanto da Zona da Mata Sul quanto na Mata Norte, sendo que nesta última há uma melhoria tecnológica e tratos culturais dos bananais realizados por mão-de-obra especializada. O transporte é realizado por caminhões principalmente para a CEASA (Recife), onde é feita a climatização. As pesquisas com a cultura começaram a ser feitas pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), depois de 1970, principalmente em propriedades particulares (MOREIRA e CORDEIRO, 2006).

A Região do Vale do São Francisco representa uma área promissora para o desenvolvimento da bananicultura, uma vez que apresenta um maior potencial tecnológico, além da presença de profissionais com maior qualificação e conhecedores do mercado externo. Empresas agroindustriais encontram-se em processos de testes visando o mercado europeu utilizado a cultivar Pacovan. Segundo dados do IBGE (2001), Petrolina (PE) e Juazeiro (BA), representaram 1% da produção nacional de banana, numa área de 4 mil hectares, o que corresponde a apenas 1% da área plantada com banana no Brasil.

O Estado de Pernambuco, sexto na produção brasileira, tem cerca de 38.000 ha plantados (CORDEIRO, 2003), porém, no Nordeste parte dos solos, mais precisamente nas áreas irrigadas das zonas semi-áridas, dentre elas Petrolina, encontra-se com teores de sais elevados, devido ao manejo inadequado e ao uso de água de irrigação de má qualidade, o que provoca efeitos deletérios no rendimento da cultura (BORGES e CINTRA, 1998)

1.3 Salinidade

1.3.1 Salinidade dos solos

Os solos contêm, em geral, nutrientes inorgânicos apresentando uma proporção variada dos cátions K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} e dos ânions Cl^- , SO_4^{-4} e HCO_3^- . A acidez ou a alcalinidade dos solos é decorrente do excesso destes íons, que promovem a redução do potencial osmótico da solução do solo e um aumento da condutividade elétrica, levando a uma indisponibilidade da absorção da planta de alguns nutrientes essenciais tais como ferro, manganês, cobre e zinco. De modo geral, solos variam amplamente de pH, e muitas plantas apresentam uma estreita faixa de tolerância nesta escala (RAVEN et al., 2001).

A salinidade dos solos pode ser originada por fatores naturais e por componentes antrópicos, sendo este último provocado pelo uso indiscriminado da irrigação, seja por meio de métodos inadequados, uso de água de baixa qualidade ou mesmo por drenagem insuficiente (RICHARDS, 1974). Entre os fatores naturais podemos citar o material constituinte do solo e o clima (FISHER e TURNER, 1978).

Dos atuais 230 milhões de hectares irrigados no Brasil, 45 milhões de hectares estão salinizados. Anualmente, uma grande porcentagem de terras irrigadas são abandonadas devido aos problemas de salinização e/ou sodicidade (GOMES et al., 2006). Diante da necessidade crescente de alimento, somado a diminuição gradativa de áreas cultiváveis devido, principalmente, a salinidade dos solos, surge a necessidade da incorporação da tolerância à este estresse abiótico em plantas cultivadas tradicionalmente (ARAÚJO FILHO et al., 1995; RAVEN et al., 2001)

No Nordeste, os solos predominantes são os bruno-não-cálcicos, planossolos, planossolo-solódicos e solonetz-solodizados. Estes solos apresentam como características o baixo potencial de drenagem, devido ao teor e qualidade de argila no horizonte B, e a alta quantidade de sais presentes, o que favorecem o processo de salinização. Somado a constituição dos solos, tem-se a evapotranspiração, que é a perda total de água que ocorrem por meio da transpiração das superfícies das plantas e evaporação do solo. No Nordeste Brasileiro, a dimensão do problema de salinização tem assumido proporções assustadoras, apresentando uma área potencial de irrigação estimada em 6 milhões de hectares, destes 25% estão salinizados (BRITO, 2002; GOMES et al., 2002, SUASSUNA, 2002). No perímetro irrigado de São Gonçalo-PB, cerca de 40% da área irrigada estão afetadas por sais. Já o Município de Custódia/PE apresenta 70% do perímetro irrigado salinizado. Na região do pólo Petrolina-PE/Juazeiro-BA, que conta com seis perímetros de irrigação, numa área de 38.917 ha, tem-se observado que, aproximadamente, 20% dessa área apresentam reduções na produção agrícola e diminuição da área total irrigada devido à salinização do solo (MOURA, 2000).

1.3.2 Efeitos da salinidade sobre as plantas

Diversos tipos de estresses abióticos afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas por provocarem alterações em seu metabolismo e expressão gênica (KIZIS et al., 2001). A salinidade do solo, um dos fatores abióticos que causa estresse nas plantas, é encarada mundialmente como um dos sérios problemas para a agricultura (ZHU, 2001). Em ambientes que apresentam uma alta concentração de sódio, a solução ao redor das raízes, frequentemente, tem uma concentração de solutos maior do que o das células vegetais fazendo com que a água se mova para fora das raízes por osmose.

Um outro problema a ser observado é a passagem de íons sódio na planta, de modo preferencial aos íons potássio, privando a planta de um elemento essencial, envolvido na osmose e balanço iônico da mesma, bem como inibindo alguns sistemas enzimáticos (RAVEN et al., 2001). Poucas espécies, como as halófitas, desenvolveram adaptações secundárias que tornou possível sua sobrevivência em ambientes com níveis de salinidade equivalentes àqueles

encontrados nas águas do mar. Essas espécies de plantas toleram uma concentração máxima de sal em torno de 100 mM (SERRANO, 1996).

Um dos efeitos mais marcantes da salinidade sobre as plantas é a inibição do crescimento. São observadas redução da altura, da área foliar e do acúmulo de matéria fresca e seca na parte aérea e raízes (GOMES et al., 2006). Vários trabalhos têm corroborado com os efeitos acima relatados variando em menor ou maior grau, de acordo com a espécie, o cultivar e as formas de cultivo. Esses efeitos podem ser resultantes da redução na fotossíntese, respiração, transpiração, translocação e um desbalanço hídrico e/ou iônico na planta (MARCHNER, 1992).

1.4 A biotecnologia na seleção de genótipos tolerantes a salinidade

A resposta vegetal às 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, nutrição vegetal e características genéticas. Entre as espécies sensíveis ao sal, está a bananeira, que vem sendo amplamente cultivada em regiões áridas e semi-áridas do nordeste brasileiro com o uso da irrigação.

O melhoramento genético da bananeira em todo o mundo enfoca, sobretudo, os aspectos de resistência a pragas e doenças (CROUCH et al., 1998). 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. Uma das estratégias para promover a reincorporação de áreas salinizadas, e o aumento da produtividade consiste no desenvolvimento e na seleção de genótipos tolerantes ao sal (SHANNON, 1997, GOMES et al., 2006).

A avaliação da tolerância à salinidade dos materiais vegetais diplóides de bananeiras (AA), que são fonte de material genético dos programas de melhoramento, permitirá a identificação dos genótipos que melhor se adaptam às condições de solo salino da região. Neste contexto, a biotecnologia está cada vez mais presente no desenvolvimento de novas variedades que mantenham as características agrônômicas e de mercado, e que apresentem características

melhoradas de interesse para a agroindústria bananeira como, por exemplo, tolerância à salinidade (GOMES et al., 2002). Uma das áreas moleculares mais promissoras consiste no estudo de genomas funcionais, também denominado de transcriptomas, que levam ao conhecimento dos genes relacionados as características de interesse dos organismos.

1.4.1 Differential display PCR - ddPCR

Segundo Micklos et al. (2005), os genes são transcritos em moléculas de RNAs mensageiros (mRNA), traduzidos em proteínas e essas transportadas para locais específicos dentro da célula de um determinado tecido ou organismo. Enquanto alguns genes codificam para proteínas que são expressas em todas as células de um indivíduo (genes constitutivos), outros codificam proteínas que são expressas apenas em algumas células, ou em determinado período de desenvolvimento, ou em resposta a algum estímulo externo (genes tecido-específico).

A técnica de ddPCR- *differential display* PCR, desenvolvida por LIANG e PARDEE (1992), torna possível o estudo de mRNA transcritos em qualquer tipo celular ou tecido em particular, sob diferentes condições bióticas e abióticas. Este método apresenta como uma das principais vantagens, não depender de um conhecimento prévio da seqüência ou da abundância dos clones de cDNA.

Trata-se de uma técnica extensivamente utilizada, principalmente, pelo fato de poder ser executada em qualquer laboratório equipado com os reagentes e equipamentos padrões de Biologia Molecular. Essa estratégia tem sido utilizada com sucesso, por exemplo, em estudos efetuados na identificação de genes envolvidos na interação planta-patógeno (BENITO E VAN KAN, 1996) e em respostas ao estresse hídrico e salino (CASAGRANDE et al., 2001; LONG-XI e SETTER, 2003).

A técnica de ddPCR, consiste na avaliação do mRNA expresso diferencialmente que poderá ser detectado em gel de sequenciamento convencional, após transcrição pela transcriptase reversa e amplificação do DNA complementar (cDNA) por PCR, utilizando oligonucleotídeos adequados. Os genes diferencialmente expressos, amplificados por PCR, são analisados lado a lado num

gel de sequenciamento de DNA, sendo as bandas identificadas e recuperadas do gel para posterior sequenciamento (JACKSON e ERLANDER, 1996) (Figura 6).

Plantas submetidas a solos salinos, expressam grandes quantidades de genes, uma vez tratar-se de uma herança poligênica, apresentando grande dificuldade do estudo de tal herança por meio do melhoramento genético tradicional (HASEGAWA et al., 2000). A biologia molecular assume papel fundamental no estudo de tais heranças buscando o entendimento das vias biossintéticas de compostos químicos e de complexos protéicos, cuja função é auxiliar ou mediar os mecanismos de defesa da planta.

A aplicação da técnica de ddPCR em plantas submetidas ao estresse salino levará ao entendimento de quais vias metabólicas estão envolvidas nos processos de adaptação e tolerância destas plantas à salinidade e a elaboração de novas estratégias de melhoramento genético utilizando a transgenia direcionada intra e interespecificamente.

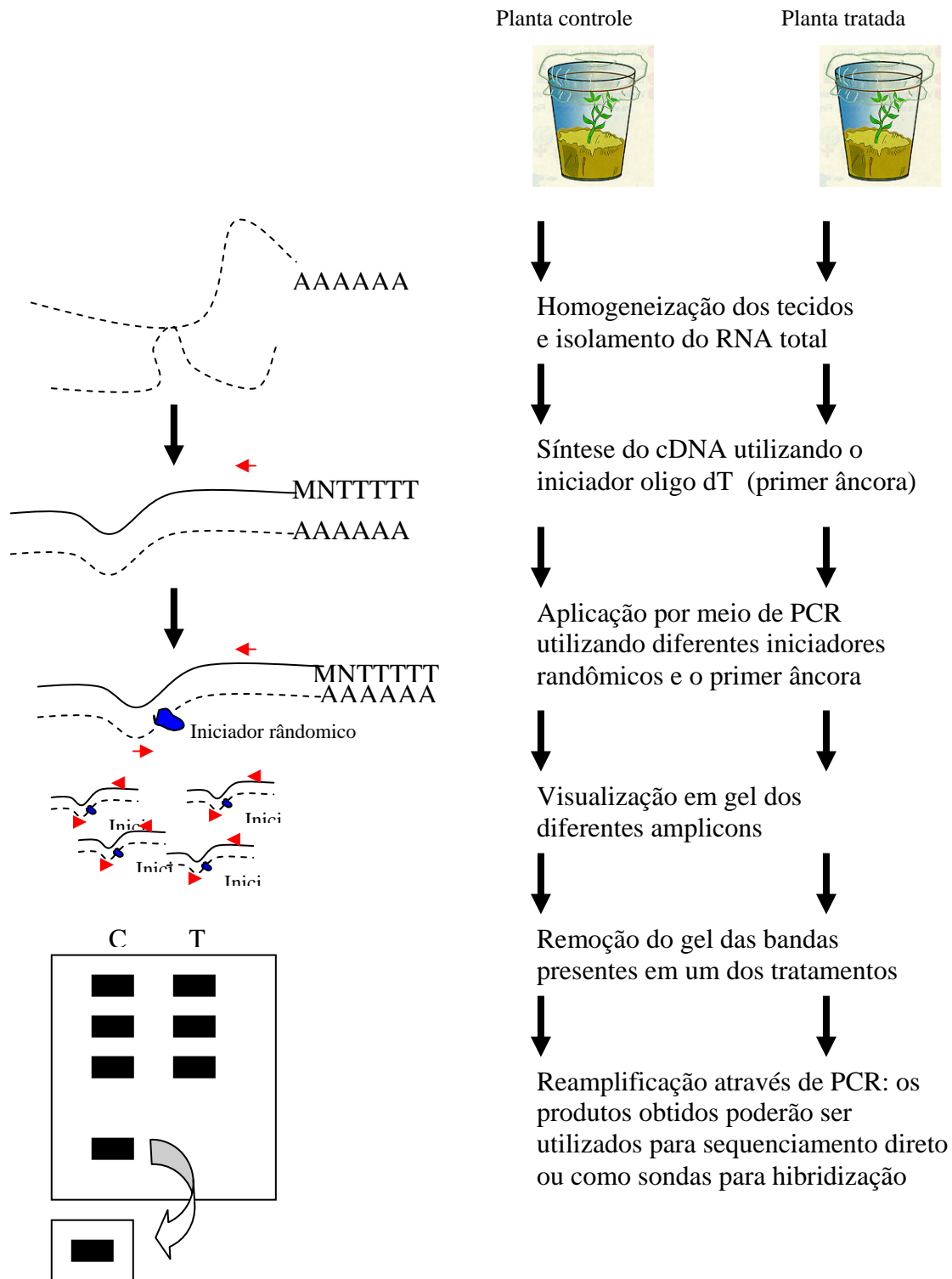


Figura 6. Esquema geral da técnica de ddPCR. O RNA é representado por linhas tracejadas e o mRNA é indicado pela cauda poli-A. O cDNA representado por linhas contínuas. O primer âncora é indicado por TTTT MN (5'- 3'), onde o M é G, A ou C e N é qualquer um dos quatro nucleotídeos usuais. (Fonte: LEMOS, 2003 adaptado)

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Banana. São Paulo: **FNP-Consultoria e Agroinformativos**, 2006. p. 195-199.

ALMEIDA, C. O.; SOUZA, J. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; BORGES-INÁCIO, E. S. Mercado Mundial. IN: MATSURA, F.C.U.; FOLEGATTI, M.I.S. (editores técnicos) Banana. Pós-colheita. **EMBRAPA Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas,BA)** – Brasília: Embrapa Informações tecnológicas, 2001. 71p.

ARAÚJO FILHO, J.B.; GHEYI, H.R.; AZEVEDO, N.C.; SANTOS, J.G.R. Efeitos da salinidade no crescimento e no teor de nutrientes em cultivares de bananeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.19, p.417, 1995.

BELALCÁZAR CARVAJAL, S.L. El cultivo del plátano en trópico. Cali, Colombia: **ICA**, 1991. 375p.(ICA.Manual de Assistência Técnica, 50).

BENITO, E.P., PRINS, T., VAN KAN, J.A.L. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], n. 32, 947-957, 1996.

BORGES, A. L.; CINTRA, F. L. D. Queima das folhas de bananeira no Nordeste do Brasil. **EMBRAPA/CNPMPF**. Documentos 35/91, 1998.16p.

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.

CASAGRANDE, E. C. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v.13, n.2, p.168-184, 2001.

CENTEC – INSTITUTO CENTRO DE PESQUISA TECNÓLOGICO. Produtor de bananas. 2. ed.rev. Edições Demócrito Rocha; Ministério da Ciência e Tecnologia, 2004. 64p.

CHAMPION, J. **Les bananiers et leur culture; Tome I: Botanique et genetique.** Paris: IFAC, 1967. 214p.

CORDEIRO, Z. J. M. Cultivo da banana para o pólo Petrolina-Juazeiro. **EMBRAPA** Mandioca e Fruticultura – CNPMF, Sistema de produção, n. 10, 2003. Versão eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaJuazeiro/importancia.htm> acessado dia: 28/09/2006.

CRONQUIST, A. The divisions and classes of plants. **Botanical Review**, New York, v.26, n. 4, p. 425-82, 1981.

CROUCH, J. H.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Perspectives on the application of biochemistry to assist the genetic enhancement of plantain and banana. **Electronic Journal Biotechnology**, [S.l.], v.1, p.1-12. 1998.

FAO. Statistics. Agricultural. Production. Crops. Primary. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acessado em fevereiro de 2004

FAO. Food Agricultural Organization. Agricultural. Production. Crops. Primary 2006 Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>> Acesso em fevereiro de 2008

FISHER, R. A.; TURNER, N. C. Plant productivity in the arid and semi-arid zones. **Annual Reviews of Plant Physiology**. [S.l.], n 29, p 277-317, 1978.

GOMES, E. W. F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. S.; CÂMARA, T. R. Variedades de bananeira tratadas com água salinizada em fase inicial de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.Suplem, p. 31-36, 2006.

GOMES, E. W. F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. S.; CÂMARA, T. R.; SILVA, S. O. Banana genotypes under salt stress: tolerance and sensitivity. **Infomusa**, Montpellier, v. 11, n. 2, p. 13-18, 2002.

GOMES, E. W. F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S.S.; CAMARA, T. R. Variedades de bananeira tratadas com água salinizada em fase inicial de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** , Campina Grande, v.Suplem, p.31 – 36, 2006.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, JIAN-KANG; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], n. 51, p. 463-492, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2001 Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br> >. Acesso em: 10 jan. 2007

JACKSON, M. R., ERLANDER, M. G. Cloning differentially expressed mRNAs. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 1685-1691, 1996.

KIZIS D, LUMBRERAS V., PAGES M. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. **FEBS Lett**, Heidelberg, v.498, n.2-3, p.187-189, 2001.

LEMOS, P.M.M. Respostas bioquímicas e moleculares em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) expostos ao óleo diesel. 2003. 155f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

LIANG, P.; PARDEE A. B. *Differential Display* of eukaryotic messenger RNA by means of the Polymerize Chain Reaction. **Science**, London, v. 257, p. 967-971, 1992.

LONG-XI, Y.; TIM, L. Setter Comparative Transcriptional Profiling of Placenta and Endosperm in Developing Maize Kernels in Response to Water Deficit¹, **Plant Physiology**, Califórnia, v. 131, p. 568–582, 2003.

MARCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 4ed., Belfast: The Universities Press, 1992. 674p.

MICKLOS, D. A. ; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. **A ciência do DNA**. ARTEMED, 2ªed., Porto Alegre, 2005. 575p.

MOREIRA, R. S. Banana: teoria e prática de cultivo. Campinas: **Fundação Cargill**, 1999. 335p.

MOREIRA, R.S.; CORDEIRO, Z. J. A História da Banana no Brasil. **XVII Reunião Internacional da Associação para Cooperação nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical – ACORBAT**, Joinville, 2006. p. 48-82

MOURA, R.F. Efeito das lâminas de lixiviação de recuperação do solo e da salinidade da água de irrigação sobre os componentes de produção e coeficiente de cultivo da beterraba. 2000. 211f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2000.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L. Contribuição para o reconhecimento das sigatokas negra e amarela e das doenças vasculares da bananeira. 1ª. ed., Manaus: **EMBRAPA** Amazônia Ocidental, 2005. 1CD-ROM.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6a. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RICHARDS, L. A. **Diagnóstico y rehabilitacion de suelos salinos y sódicos** . México. Ed. Limusa, 1974, 172p.

SERRANO R. Salt Tolerance in Plants and Microorganisms: Toxicity Targets and Defense Responses. **International Review of Cytology**, Califórnia, v. 165, p.1-52, 1996.

SHANNON, M.C. Adaptation of plants to salinity. **Advanced Agronomy**, [S.l.] v. 60, p.76-199, 1997.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; SILVA, S. de O. Breeding Prata and Maçã for Brazil. In: **GLOBAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL MUSA TESTING PROGRAM**, 1994, San Pedro Sula, Hon. Proceedings..Montpellier: INIBAP, 1994. p.157-168.

SHEPHERD, K. Banana: taxonomia e morfologia. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA**, 1, Jaboticabal, SP, Anais... Jaboticabal, SP: FCAVJ/UNESP, 1984. p. 50-74.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. Melhoramento de bananeira para resistência: resultados obtidos pelo melhoramento convencional. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA E WORKSHOP DO GENOMA MUSA**, 5, 2003, Paracatu. Anais. Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p.28-34.

SILVA, S. O.; ALVES, E.J.; LIMA, M.B.; SILVEIRA, J. R. Bananeira. In: BRUCKNER, C.H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa:UFV, 2002. p.101-158

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The Journal of the Linnean Society of London**, London, v.55, p.302-312, 1955.

SUASSUNA, J. semi-árido: proposta de convivência com a seca, 2002. Disponível:<<http://www.fundaj.gov.br/docs/text/textrop.html>> acessado dia: 25/06/2007

TEZENAS DU MONTCEL, H. *Musa acuminata* subsp. *banksii* status and diversity. In: **WORKSHOP ON IDENTIFICATION OF GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS MUSA**,. INIBAP. Montpellier, 1988, p. 12.

UNCTAD. info comm. market information in the commodities Agricultural products: banana 2003. Disponível em:

<http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/banana/market.htm> acesso em: 16 jan 2007.

WILKINS, T. A.; TURLEY, R. B.; TROLINDER, N.; KOONCE, L.; DEVER, J.; RAJASERKARAN, K.; ZIPF, A.; NEPOMUCENO, A. L. Cotton biotechnology workshop: The rudiments of cotton transformation and biotechnology. pp. 96-99. In: **NATIONAL COTTON COUNCIL, ED, PROCEEDINGS. BELTWIDE COTTON CONFERENCE**. San Diego, CA, 1998.

WILKINSON, J. Q.; LANAHAN, M. B.; CONNER, T. W.; KLEE, H. J. Identification of RNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction *Differential Display*. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], v. 27, p.1097-1108, 1995.

ZHU, J. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.6, n.2, p.66 - 71, 2001.

CAPÍTULO II :

**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE GENÓTIPOS DIPLÓIDES
(AA) DE BANANEIRA SUBMETIDOS A ESTRESSE SALINO**

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Fruticultura

Avaliação fisiológica e molecular de genótipos diplóides (AA) de bananeira (*Musa ssp.*) submetidos a estresse salino

Gabriela de Moraes Guerra Ferraz⁽¹⁾, Luíza Suely Semen Martins⁽²⁾, Lilia Willadino⁽³⁾, Eline Waked Ferreira Gomes⁽⁴⁾, Roberta Lane de Oliveira Silva⁽⁵⁾, Sebastião de Oliveira e Silva⁽⁶⁾, Isabelle Maria Jaqueline Meunier⁽⁷⁾, Terezinha de Jesus Rangel Câmara⁽⁸⁾

Resumo

A salinidade dos solos nas regiões áridas e semi-áridas do Nordeste que é a principal região produtora de bananas do Brasil é um importante fator limitante da produção agrícola. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento vegetativo e o acúmulo de íons inorgânicos em 19 genótipos diplóides (AA) de bananeiras submetidas a estresse salino, identificando dentre os genótipos estudados os tolerantes e os sensíveis, buscando-se relacionar as respostas fisiológicas ao estresse com formação de grupos por meio de marcadores RAPD. As variáveis de crescimento analisadas foram área foliar, altura da planta, diâmetro do pseudocaule, número de folhas, peso da matéria fresca e o peso da matéria seca. Por meio das análises químicas foram avaliadas a concentração de sódio, potássio, cloro, magnésio e cálcio do limbo, pseudocaule e raiz/rizoma de cada genótipo. Na avaliação molecular foram utilizados sete genótipos sendo três deles apontados como contrastantes na avaliação fisiológica. Foram testados 16 *primers* randômicos. Considerando os fatores de crescimento os genótipos Birmânia e Khai Nai On mostraram maior tolerância a salinidade apresentando uma média de 25% e 23% , respectivamente, para as variáveis analisadas, enquanto o Sowmuk mostrou maior sensibilidade, havendo uma redução média de 50%. A análise do acúmulo de sais, mostrou que estes prioritariamente são acumulados na raiz/rizoma tratando-se de uma cultura moderadamente tolerante a salinidade. Dentre os genótipos avaliados, os que tiveram menor acúmulo e sódio no

Trabalho financiado pelo BNB/FUNDECI e CNPq e parte da dissertação de mestrado do primeiro autor

⁽¹⁾ Pós-graduando em Agronomia Fitotecnia/UFRPE, Recife-PE. E-mail: gabrielanguerra@gmail.com

⁽²⁾ Professora do Dep. de Biologia/Área de Genética/UFRPE Recife-PE. E-mail: luiza@db.ufrpe.br

⁽³⁾ Professora do Dep. de Biologia/Área de Botânica/UFRPE Recife-PE. E-mail: lilia@pq.cnpq.br

⁽⁴⁾ Pesquisadora da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária/IPA, Recife-PE. E-mail: elinew@ipa.br

⁽⁵⁾ Pós-graduando em Agronomia Fitotecnia/UFRPE, Recife-PE. E-mail: lane-roberta@gmail.com

⁽⁶⁾ Pesquisador da Centro Nacional Mandioca e Fruticultura/EMBRA. Cruz das Almas-BA. Email: ssilva@cnpmfembrapa.br

⁽⁷⁾ Professora do Depto. Ciência Florestal/ Área de Estatística/UFRPE Recife-PE. E-mail: imeunier@dcfl.ufrpe.br

⁽⁸⁾ Professora do Dep. de Química/Área de Química Agrícola/UFRPE Recife-PE : E-mail: tkcamara@bol.com.br

36

37 limbo foliar foram Pipit e 86B79-09 com um aumento de três vezes em relação ao tratamento
38 controle, enquanto que os mais sensíveis foram 4223-06 e 1319-01 que aumentaram 165 vezes e
39 131 vezes, respectivamente. O potássio, íon de grande importância para o desenvolvimento da
40 bananeira, teve maior acúmulo nos genótipos 134-06 e Birmânia com um aumento de cinco vezes
41 e quatro vezes, respectivamente, em relação ao tratamento controle. Considerando todas as
42 variáveis fisiológicas, os genótipos Birmânia e Khai Nai On foram apontados como tolerantes
43 enquanto que o Sowmuk foi o mais sensível. Em relação aos resultados moleculares, foi
44 observada ampla variabilidade genética entre os sete genótipos diplóides (AA) de bananeira.
45 Correlacionando as respostas fisiológicas com a formação dos agrupamentos, os genótipos
46 Birmânia e Khai Nai On, apontados como tolerantes, formaram um único grupo separando-se dos
47 demais. Estas variedades que apresentaram maior tolerância ao estresse salino, quando
48 comparadas com a mais sensível ao sal, mostraram-se distantes geneticamente. Podemos concluir
49 diante dos resultados que dentre os genótipos avaliados, os tolerantes foram Birmânia e Khai Nai
50 On podendo estes serem promissores para utilização no melhoramento de cultivares triplóides e
51 tetraplóides visando uma maior tolerância a solos salinizados.

52

53 Palavra-chave: Salinidade, RAPD, *Musa*, marcadores moleculares, solos salinos.

54

55 **ABSTRACT**

56 The salinity of the soil in arid and semi-arid areas of Northeast of Brazil, which is the main
57 producing region of bananas in this country, is a major limiting factor in agricultural production.
58 This study aimed to assess the growth and accumulation of inorganic ions in 19 diploid
59 genotypes (AA) of bananas subjected to salt stress, identifying among the genotypes studied
60 which is the tolerant and the sensitive. This study tried to link the physiological responses to the
61 stress, with formation of groups through RAPD markers. The variables were analyzed for growth
62 leaf area, plant height, diameter of the pseudostem, number of leaves, the fresh and dry matter
63 weight. Through chemical analysis were evaluated the concentration of sodium, potassium,
64 chloride, magnesium and calcium in limbo, pseudostem and root / subroot of each genotype. For

65 the molecular study, seven genotypes were used and three of them showed to be contrasting in
66 physiological assessment. Sixteen random primers were in test. Considering the growth factors,
67 Birmania and Khai On Nai genotypes showed increased tolerance to salinity with an average of
68 25% and 23%, respectively, for the variables examined, while Sowmuk showed greater
69 sensitivity, with an average reduction of 50%. The salts accumulation analysis showed that they
70 are primarily accumulated in the root in a culture that is moderately tolerant to salinity. Among
71 the genotypes studied, those who had lower sodium accumulation in limbo leaf were Pipit and
72 86B79-09 with a three times increase when compared to the control treatment, while the more
73 sensitive were 4223-06 and 1319-01 which have increased 165 times and 131 times, respectively.
74 The potassium, ion of great importance for the banana development, had greater accumulation in
75 genotypes 134-06 in Burma with an increase of five times, and four times, respectively, in
76 relation to the control treatment. Considering all the physiological variables, the genotypes
77 Birmania and Khai On Nai were seen as tolerant while the Sowmuk was the most sensitive. For
78 molecular results, it was observed wide genetic variability among the seven banana diploid
79 genotypes (AA). When Physiological responses is related to the formation of clusters, the
80 genotypes Burma and Khai Nai On, seen as tolerant, formed a single group separating itself from
81 the rest. These varieties that showed higher tolerance to salt stress, when compared with the more
82 salt sensitive, were genetically distant. It can be conclude based on these research that among the
83 evaluated genotypes, Burma and Khai Nai On showed to be tolerant and these may be a promise
84 for use in the improvement of triploid and tetraploid cultivars seeking greater tolerance to
85 salinized soils.

86

87 Keyword: Salinity, RAPD, Musa, molecular markers, saline soils.

88

89

INTRODUÇÃO

90

91 A salinidade dos solos, presente principalmente em regiões áridas e semi-áridas é
92 considerado como fator limitante ao crescimento e desenvolvimento de plantas, por afetar
93 diversos sistemas metabólicos, reduzindo a produção e alocação da biomassa (Shannon, 1997).

94 Plantas halófitas são capazes de manter inalterados seus sistemas metabólicos em solos
95 salinos, graças ao desenvolvimento de sistemas capazes de compartimentalizar íons inorgânicos
96 no vacúolo, acompanhado do acúmulo de solutos orgânicos compatíveis no citoplasma que
97 proporcionam o equilíbrio osmótico entre os compartimentos celulares. Nas glicófitas este
98 ajustamento celular ocorre de forma ineficiente (Hasegawa et al., 2000), podendo haver variação
99 quanto a eficiência deste potencial de compartimentalização de íons de forma intra e ou
100 interespecífica (Ayers & Westcot, 1999).

101 Dentre as plantas glicófitas, podemos citar a bananeira cuja cultura representa uma
102 importante atividade econômica e social em todo o mundo, estando presente em grande parte dos
103 países tropicais e subtropicais. O Brasil apresenta-se como segundo maior produtor mundial, com
104 uma produção de 6,73 mil toneladas por ano, representando aproximadamente 10% da produção
105 mundial, em uma área colhida de 507.000 ha (FAO, 2006), destacando-se como maiores regiões
106 produtoras a Região Nordeste, com grandes áreas áridas e semi-áridas, responsável por 34% da
107 produção nacional, seguida da Região Norte (26%), Sudeste (24%), Sul (10%) e Centro-Oeste
108 (6%) (Borges, 2003).

109 A busca por genótipos de bananeira diplóides (AA) tolerantes a salinidade, que são fonte
110 de genes para os programas de melhoramento, é de grande importância para o desenvolvimento
111 de novas variedades que mantenham as características agrônômicas e de mercado, e que
112 apresentem novos valores para a agroindústria bananeira como, por exemplo, tolerância à
113 salinidade, proporcionando maior produtividade da cultura em áreas salinizadas (Gomes et al.,
114 2002).

115 Partindo dos pressupostos acima, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento
116 vegetativo e o acúmulo de íons inorgânicos em dezenove genótipos diplóides (AA) de bananeiras
117 submetidas a estresse salino, buscando-se relacionar a produção de biomassa com as respostas
118 fisiológicas de maior ou menor tolerância ao estresse.

119

120

MATERIAL E MÉTODOS

121 **Local da pesquisa**

122

123 O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade Federal Rural de
124 Pernambuco, Recife-PE, no período de agosto a dezembro de 2006. Foram utilizadas mudas em
125 estágio inicial de desenvolvimento, uma vez que nesta fase as plantas exibem maior sensibilidade
126 à salinidade. Foram avaliados 19 genótipos diplóides (AA) de bananeira, provenientes de cultura
127 de tecido, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma, do Centro Nacional de Pesquisa de
128 Mandioca e Fruticultura – CNPMF/ EMBRAPA, localizado em Cruz das Almas – BA (Tabela 1).

129

130 **Material vegetal**

131

132 As mudas foram plantadas individualmente em vasos de polietileno preto (55 cm de altura
133 por 33 cm de diâmetro) contendo 10 Kg de areia lavada coberta por uma camada de 1 cm de
134 cascalho fino, a fim de minimizar a evaporação e favorecer o controle da salinidade no substrato.
135 Foram utilizados dois tratamentos, o primeiro tratamento controle (0 mM de NaCl) e o segundo,
136 tratamento salino (100 mM de NaCl) com três repetições para cada tratamento em um
137 delineamento inteiramente casualizado. Ambos os tratamentos receberam 742,86 mgL⁻¹ de
138 fertilizante solúvel (Marca Kristalon) com a seguinte composição: 3% de N, 11% de P₂O₅, 38%
139 de K₂O, 4% de MgO, 11% de S e micronutrientes. O cálcio e nitrogênio foram fornecidos na
140 forma de nitrato de cálcio (marca Barco Viking) na dose de 840 mg.L⁻¹ do produto composto de
141 15% de N e 19% de Ca, seguindo metodologia usada por Gomes et al. (2006). A condutividade
142 elétrica da solução nutritiva dos dois tratamentos foi mantida a aproximadamente 1 e 10 dS/m
143 que corresponde à concentração de 0 e 100 mM de NaCl.

144

145 **Avaliação fisiológica**

146

147 Durante o período experimental foram coletados os dados de crescimento no início da
148 diferenciação dos tratamentos e ao término do experimento, no 21º dia. As variáveis analisadas
149 foram: área foliar (AF), obtida a partir da multiplicação da largura da folha pelo comprimento
150 utilizando como fator de correção 0,7 (Moreira, 1987; Gomes et al., 2002); altura da planta
151 (ALT); diâmetro do pseudocaule (PC) e número de folhas (NF). Por ocasião do término do
152 experimento, cada planta foi fracionada em limbo, pseudocaule e raiz/rizoma, onde foram

153 registrados o peso da matéria fresca de cada parte. O peso da matéria seca foi obtido após
154 secagem do material em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C até peso constante.

155 As análises químicas dos tecidos vegetais seguiram a metodologia proposta por Bezerra
156 Neto et al. (1994) em que o material vegetal, seco em estufa, foi triturado em moinho de facas e
157 utilizado para determinação dos elementos minerais. Os teores de Na⁺ e K⁺ foram determinados
158 por fotometria de chama, e os teores de Ca²⁺ e Mg²⁺, por espectrofotometria de absorção atômica
159 conforme Malavolta et al. (1989). Para obtenção do teor de Cl⁻ foi utilizada a técnica de titulação
160 ácido-base.

161 Os dados de crescimento obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias
162 comparadas pelo teste de Tukey com P≤0,05, enquanto que os dados obtidos nas análises
163 químicas foram avaliados por método não paramétrico pelo teste de Kruskal-Wallis com P≤0,05.

164

165

166

167

168

Tabela 1. Relação dos genótipos de banana avaliados, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF)

Genótipos	Níveis de ploidia	Procedência
8694-15	DM	CNPMPF
Khai Nai on	DC	Tailândia
Microcarpa	DS	França
134-06	DM	CNPMPF
Birmânia	DS	França
Pipit	DC	Indonésia
4279-06	DM	CNPMPF
1918-01	DM	CNPMPF
Nba-14	DC	Nova Guiné
Jaran	DC	Indonésia
1319-01	DM	CNPMPF
4285-02	DM	CNPMPF
86b79-09	DM	CNPMPF
N 118	DS	Tailândia
Sowmuk	DC	Nova Guiné
1304-04	DM	CNPMPF
4223-06	DM	CNPMPF
Pa Rayong	DS	Tailândia
4253-03	DM	CNPMPF

169

DM = diplóide melhorada, DC = diplóide cultivada e

170

DS = diplóide selvagem

171

Avaliação molecular

172 Em relação a coleta final, 21 dias após a diferenciação dos tratamentos, os tecidos foliares
173 da terceira folha de cada genótipo foram acondicionados, identificados e mantidos sob
174 refrigeração em freezer a -80°C.

175 A extração do DNA foi realizada utilizando-se metodologia sugerida por Doyle e Doyle
176 (1990). O volume final da reação de PCR foi de 25 µL, com a seguinte composição: DNA (1 ng/
177 µL); dNTP (10 mM), tampão (10X); MgCl₂ (25mM); MgCl₂ (50 mM); *primer* RAPD (50 µM);
178 Taq DNA polymerase (5 U/µL). Os *primers* testados foram: OPA03 (AGTCAGCCAC), OPA04
179 (AATCGGGCTG), OPA05 (AGGGGTCTTG), OPA13 (CAGCACCCAC), OPAA12
180 (GGACCTCTTG), OPAA19 (TGAGGCGTGT), OPF07 (CCGATATCCC), OPH04
181 (TCTGGTGAGG), OPH08 (TCACCACCGT), OPF14 (TGCTGCAGGT), OPH18
182 (GAATCGGCCA), OPF15 (CCAGTACTCC), OPO04 (AAGTCCGCTC), OPB10
183 (CTGCTGGGAC), OPG17 (ACGACCGACA) e OPH05 (TGAGCGGACA). As temperaturas de
184 amplificação utilizadas foram: 1 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15s, 35 °C por
185 30s e 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram
186 separados por tamanho molecular em géis de Agarose a 1% onde foi utilizado um DNA de
187 padrão molecular conhecido. Para análise dos resultados foram consideradas apenas as bandas
188 com boas resoluções, uma vez que, segundo Weeden et al. (1992), bandas fracas podem gerar
189 erros de 2 a 7%, sendo os registros feitos como presença e ausência para cada um dos acessos
190 avaliados. Os dados foram analisados usando o programa “Numerical Taxonomy and
191 Multivariate Analysis for Personal Computers” (NTSYS – pc), utilizando o coeficiente de
192 Jaccard.

193 RESULTADOS E DISCUSSÃO

194 A análise dos dados de crescimento mostrou que o incremento salino reduziu os valores
195 dos parâmetros altura, formação de novas folhas, área foliar e o diâmetro do pseudocaule de
196 todos os genótipos avaliados (Tabela 2), sugerindo, em uma análise geral, que há uma correlação
197 positiva entre as variáveis de crescimento. Essa redução, comum em glicófitas, parece ser mais
198 intensa nas frutíferas uma vez que, segundo Bernstein (1995), estas são mais sensíveis à
199 salinidade que hortaliças e cereais.

200 Dentre os genótipos avaliados, o Birmânia não mostrou redução significativa na altura,
201 área foliar e largura do pseudocaule. Os genótipos que apresentaram maior sensibilidade a
202 presença do sal foram 4253-03 e Sowmuk, apresentando uma perda de área foliar de 74% e 62%
203 respectivamente (Figura 1). A redução de variáveis de crescimento foram observadas em

204 monocotiledôneas, como espécies de bananeira (Gomes et al., 2002; 2005), de grama
 205 (Alshammery et al., 2004) e também em dicotiledôneas, como tomateiro (Romero-Aranda et al.,
 206 2001), feijão (Gouia et al., 1994) e sorgo submetidas ao estresse salino (Lacerda et al. 2003). A
 207 inibição do crescimento pode ser atribuída, principalmente, a três fatores: a redução na taxa de
 208 assimilação de CO₂, provocada pelo fechamento dos estômatos em resposta ao baixo potencial da
 209 água do solo, levando a planta a uma seca fisiológica; inibição da expansão celular provocada
 210 pelo sal, ocasionada pela acumulação de sais na parede celular; e a inibição da absorção de outros
 211 cátions pelo sódio levando a um desequilíbrio nutricional (Orcutt & Nilsen, 2000).

212 Tabela 2. Análise das variáveis altura (ALT), diâmetro do pseudocaulo (PC), número de folhas
 213 (NF) e área foliar (AF) de genótipos do BAG de banana do CNPMF, submetidos a salinidade

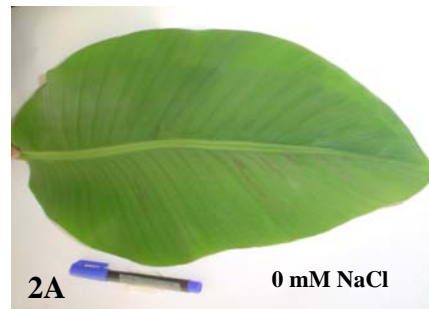
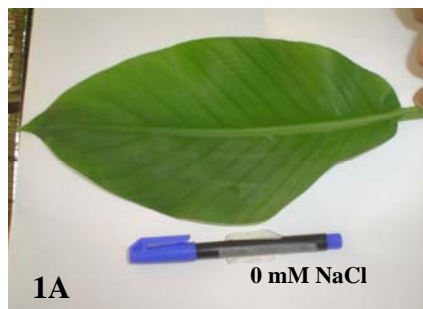
Genótipos	ALT (cm)		PC (cm)		NF (unid)		AF (cm ²)	
	NaCl							
	0mM	100mM	0mM	100mM	0mM	100mM	0mM	100mM
8694-15	21,3a	13,0b	1,7a	1,2a	9,0 a	6,3b	904,9a	608,7 ^a
Khai Nai On	25,8a	18,0b	1,9a	1,4b	7,6a	6,6a	1160,9a	844,3 ^a
Microcarpa	33,1a	21,6b	2,3a	1,6b	9,3a	6,6b	2091,3a	844,6b
134-06	44,3a	25,0b	2,7a	1,6b	10,0a	6,0b	2912,3a	1252,5b
Birmânia	27,4a	21,1a	2,1a	1,6a	9,3a	6,6b	1550,3a	1084,1 ^a
Pipit	18,1a	11,3a	1,8a	1,1b	8,3a	6,0b	1089,1a	357,0b
4279-06	25,1a	9,2b	2,1a	1,0b	8,6a	4,6b	1394,0a	293,1b
1918-01	35,6a	22,8b	2,5a	1,7b	10,6a	7,0b	1683,3a	1322,2 ^a
Nba-14	34,2a	19,2b	2,4a	1,5b	10,0a	6,0b	1971,2a	866,4b
Jaran	30,7a	17,1b	2,1a	1,5b	10,0a	6,6b	1505,4a	847,3 ^a
1319-01	27,9a	12,7b	1,8a	1,0b	10,3a	5,6b	1113,4a	388,0b
4285-02	24,1a	10,5b	1,8a	1,2b	8,3a	5,3b	1695,9a	318,0b
86b79-09	28,6a	21,0b	2,5a	1,9b	10,6a	7,6b	2107,5a	1387,7b
N 118	32,0a	16,5b	2,1a	1,3b	9,0a	6,3b	1616,5a	657,8b
Sowmuk	39,5a	21,0b	2,6a	1,5b	10,6a	5,3b	2913,2a	1100,3b
1304-04	40,8a	25,6b	2,0a	1,8a	10,3a	7,0b	2110,0a	1273,1b
4223-06	26,3a	10,8b	1,8a	0,9b	9,0a	5,6b	1053,3a	243,0b
Parayong	30,0a	19,1b	2,2a	1,6b	9,6a	7,0b	1874,3a	1162,2b
4253-03	16,5a	7,3b	1,2a	0,8a	7,6a	4,6b	742,7a	193,6b

214 Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

215

4253-03

BIRMÂNIA



216

217



218

219

220

Figura 1. Relação do tamanho entre folhas de bananeiras dos genótipos 4253-03 (1) e Birmânia (2) submetida ao controle (A) e ao estresse salino (B).

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

O peso da matéria fresca (MF) e da matéria seca (MS), de modo geral, sofreu redução com o incremento salino (Tabela 3). Alteração semelhante de peso das fitomassas foi observada por Santos & Souza (2003) e Carneiro et al. (2004) estudando mangueiras e cajueiro anão precoce, respectivamente. A redução da produção e alocação da biomassa é afetada principalmente em função da salinidade alterar processos fisiológicos, dentre estes a fotossíntese (Shannon, 1997). Isso ocorre porque o estresse salino promove redução no processo de síntese de ATP acoplado à fase fotoquímica da fotossíntese, além de promover alterações no processo respiratório, assimilação do nitrogênio e metabolismo de proteínas (Munns, 2002). Dentre os genótipos avaliados, o Birmânia e Kha Nai On, apesar de mostrarem diferença significativa no peso da matéria fresca, não diferiram entre si no peso da matéria seca, enquanto que, os genótipos 8694-15 e 4253-03 destacaram-se dos demais por não apresentarem diferença estatística entre os diferentes tratamentos aplicados. Estes resultados apontam para genótipos que apresentam metabolismos mitigadores aos processos fisiológicos oxidativos causados pelo estresse salino.

236
237

Tabela 3. Peso da matéria fresca (MF) e seca (MS) em diplóides de bananeira submetidos a níveis de NaCl

Genótipos	MF		MS	
	NaCl		0mM	100mM
	0mM	100mM		
8694-15	91,66a	17,66a	7,96a	2,85a
Khai Nai On	123,83a	38,66b	9,39a	5,37a
Microcarpa	218,53a	70,16b	14,44a	6,33b
134-06	319,16a	79,16b	27,57a	10,18b
Birmânia	162,66a	55,33b	12,37a	7,15a
Pipit	97,16a	9,16b	9,87a	2,12b
4279-06	139,66a	8,16b	13,26a	1,94b
1918-01	238,50a	75,66b	22,26a	10,68b
Nba-14	222,66a	26,66b	16,36a	3,19b
Jaran	170,00a	35,83b	13,61a	5,16b
1319-01	100,66a	5,83b	10,30a	2,81b
4285-02	138,66a	5,66b	12,89a	2,01b
86b79-09	199,00a	63,50b	16,30a	8,01b
N 118	139,83a	33,50b	12,04a	3,19b
Sowmuk	262,83a	45,16b	22,80a	4,38b
1304-04	213,83a	75,33b	18,99a	9,69b
4223-06	90,66a	6,50b	9,49a	1,64b
Parayong	187,00a	62,5b	16,89a	7,19b
4253-03	31,16a	5,16a	4,78a	0,79a

238
239

*Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

Com relação as variáveis químicas, foi possível observar que, frente ao incremento salino, o acúmulo de sais foi priorizado em certas partes da planta em detrimento de outras, havendo uma maior concentração de sais na raiz/rizoma (Tabela 4). Alguns sais foram compartimentalizados secundariamente no limbo foliar, como por exemplo, o cloro e o sódio. O potássio (K^+) sofreu redução no limbo foliar e no pseudocaule, enquanto o sódio (Na^+) agiu de forma inversa aumentando a concentração em todas as partes da planta analisada. Segundo Taiz & Zeiger (2004), sob altas concentrações de sódio, a absorção de potássio é inibida por meio de uma proteína transportadora com alta afinidade a $K^+ - Na^+$, HKT1, e o transportador opera como um sistema de absorção de sódio. O cálcio, por sua vez, age como um regulador aumentando a seletividade entre Na^+/K^+ , o que leva a uma maior tolerância ao sal. A análise dos íons sódio e cálcio demonstraram uma correlação positiva, indicando que os genótipos analisados apresentam uma tolerância moderada ao estresse salino (Figura 2).

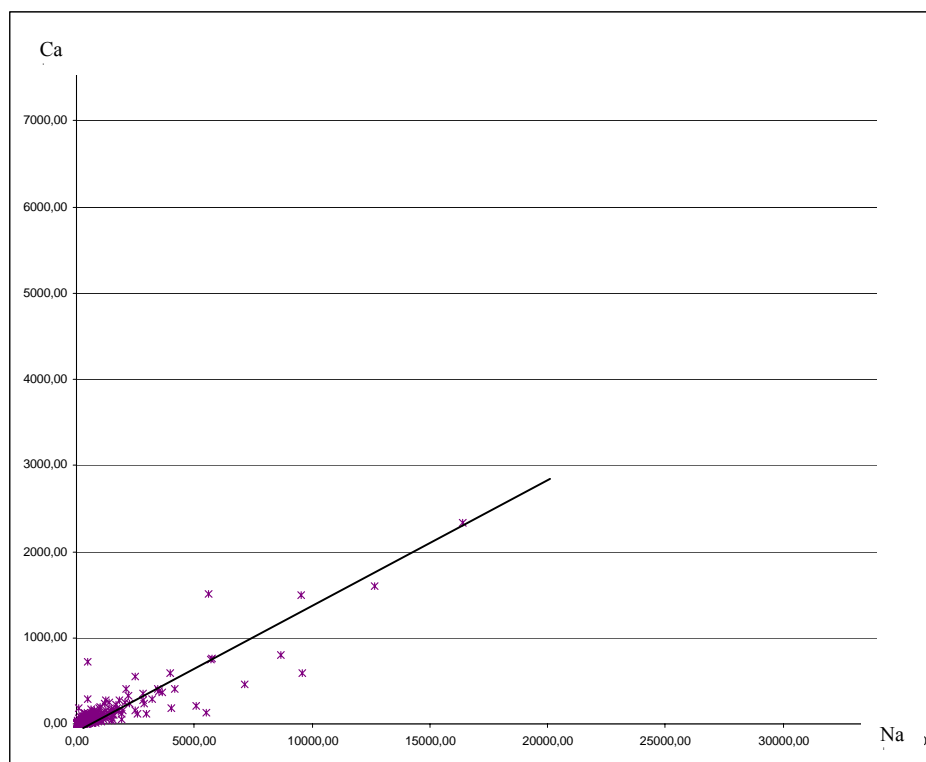
255
256
257
258

Tabela 4. Teores médios de cloro (Cl^-), magnésio (Mg^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), potássio (K^+) e sódio (Na^+) no limbo foliar, pseudocaule e raiz/rizoma de dezenove genótipos provenientes do BAG de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura- CNPMF submetidos a dois níveis de NaCl

Nutrientes	Níveis de NaCl					
	LIMBO		PSEUDOCAULE		RAIZ/RIZOMA	
	0mM	100 mM	0mM	100 mM	0mM	100 mM
Cl^- (mMol Kg ⁻¹)	22,5 ^a	27,3 ^b	18,86 ^a	23,8 ^a	14,68 ^a	28,26 ^b
Mg^{2+} (mMol Kg ⁻¹)	12,9 ^a	22,6 ^a	23,15 ^a	19,4 ^a	13,44 ^a	28,80 ^b
Ca^{2+} (mMol Kg ⁻¹)	12,9 ^a	15,4 ^a	24,07 ^a	23,3 ^a	13,75 ^a	27,60 ^b
K^+ (mMol Kg ⁻¹)	23,6 ^a	17,6 ^a	31,12 ^a	25,8 ^b	18,6 ^a	27,54 ^b
Na^+ (mMol Kg ⁻¹)	23,6 ^a	26,7 ^b	26,21 ^a	29,9 ^b	22,34 ^a	27,16 ^b

259
260
261

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.



262
263
264

Figura 2. Correlação entre Sódio e Cálcio em dezenove genótipos diplóides de bananeira submetidos a dois níveis de NaCl (0mM e 100mM).

265
266
267
268

Lacerda et al. (2003) observaram que o acúmulo diferencial de sódio pode ser um dos fatores que contribui para os diferentes graus de tolerância ao estresse salino entre genótipos. Os genótipos 4223-06, 1319-01 e 4279-06 apresentaram os maiores teores de Na^+ com um incremento de 165 vezes, 131 vezes e 129 vezes, respectivamente, em relação ao tratamento

269 controle. O acúmulo deste íon no limbo foliar causa efeitos deletérios prejudicando processos
270 metabólico tais como fotossíntese, assimilação de nitrogênio, dentre outros. Os genótipos Pipit,
271 Microcarpa e 86B79-09 mostraram-se mais adaptados a salinidade por acumularem menos sódio
272 no limbo foliar (Tabela 5).

273 Os genótipos 4223-06 e o 4279-06 também apresentaram maior concentração de potássio
274 no limbo foliar superando os demais genótipos com um aumento de 9 vezes e 5 vezes
275 respectivamente em relação ao tratamento controle. Em parte, o aumento do potássio nas folhas
276 possivelmente está associado a competição dos íons sódio pelo mesmo sítio ativo no sistema de
277 transporte na membrana plasmática das células (Marschner, 1995). Segundo Zhu (2001), o
278 aumento dos teores de potássio em genótipos tolerantes pode estar relacionado com uma maior
279 eficiência na seletividade da absorção radicular, sendo os íons de potássio preferencialmente
280 absorvidos em relação ao sódio. Neste contexto, os genótipos que conseguiram reter maior
281 quantidade de Na^+ na raiz/rizoma e menor quantidade no limbo foliar, conservando os tecidos
282 meristemáticos, em particular na parte aérea e de folhas que estão se expandindo de forma ativa e
283 fotossintetizando, foram Microcarpa e Birmânia.

284 O acúmulo diferencial dos íons sódio, cloro e potássio parecem estar relacionados
285 com o nível de tolerância de forma inter e intra específica entre as glicófitas. Resultados
286 encontrados por Cruz et al. (2006), que trabalharam com maracujazeiro-amarelo, Aquino et al.
287 (2007), que trabalharam com sorgo, além de Gomes et al. (2002; 2006), trabalhando com
288 bananeiras diplóides e triplóides, apontam que o acúmulo de íons potencialmente tóxicos (Na^+ e
289 Cl^-) e a manutenção de níveis mais adequados de K^+ nas folhas podem contribuir para a
290 tolerância à salinidade. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho,
291 sendo em parte justificado pelo antagonismos entre o íon sódio e o potássio fazendo com que
292 altas concentrações de sódio inibam a absorção do potássio pelas plantas (MARSCHNER, 1995).
293 No entanto, os resultados obtidos por Assis - Júnior et al. (2007) trabalhando com feijão de corda
294 indicam que a salinidade praticamente não influenciou no acúmulo do íon K^+ , resultado
295 semelhante ao encontrado por Sousa et al. (2006) em plantas de feijão-de-corda da cultivar
296 Pitiúba. Esses resultados conflitantes podem estar relacionados com diversos fatores, incluindo
297 manejo da cultura, variedade, tipo de salinidade, além da temperatura e da umidade relativa do ar
298 (FLOWERS, 2004).

299

300 Tabela 5. Teores de potássio (K⁺) e sódio (Na⁺) no limbo foliar e raiz/rizoma de dezenove genótipos
301 provenientes do BAG de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura- CNPMF submetidos a 100mM de NaCl.

Genótipos	LIMBO			
	Na+ (mMmol Kg ⁻¹)		K+(mMol Kg ⁻¹)	
	0mM	100mM	0mM	100mM
8694-15	3,72	316,10	1465,82	6464,79
Khai Nai On	1,40	54,17	1030,18	4401,01
Microcarpa	59,03	329,20	573,66	675,15
134-06	3,21	137,34	848,76	5046,39
Birmânia	8,26	258,41	878,33	3933,35
Pipit	43,50	126,83	10659,82	3024,43
4279-06	8,67	1122,19	1635,40	8278,31
1918-01	3,15	25,89	1325,29	1872,60
Nba-14	2,67	116,86	1208,05	5220,75
Jaran	4,06	54,66	965,98	2499,1
1319-01	22,84	2996,21	2297,31	9956,52
4285-02	7,12	653,17	372,06	9109,70
86b79-09	2,56	75,70	1089,55	1769,75
N 118	3,26	141,78	1430,70	2611,28
Sowmuk	2,59	85,28	1210,03	2321,19
1304-04	2,32	77,99	1019,68	1946,03
4223-06	7,25	1158,05	1915,95	16931,2
Parayong	3,26	50,04	1465,96	4270,11
4253-03	10,52	138,69	3380,78	1148,49

Genótipos	RAIZ/RIZOMA			
	Na+ (mMmol Kg ⁻¹)		K+(mMol Kg ⁻¹)	
	0mM	100mM	0mM	100mM
8694-15	73,62	24,14	3638,78	695,06
Khai Nai On	10,07	35,63	830,67	1146,4
Microcarpa	39,87	639,96	827,26	1852,64
8694-15	73,62	24,14	3638,78	695,06
Kha nai on	10,07	35,63	830,67	1146,4
134-06	9,63	15,71	748,13	2216,64
Birmânia	5,43	32,60	847,88	1331,53
Pipit	32,17	68,19	890,39	1125,76
4279-06	8,22	11,77	877,21	1327,63
1918-01	18,00	38,89	702,83	1991,60
Nba-14	11,17	12,19	683,29	2766,82
Jaran	8,09	16,07	843,00	2936,74
1319-01	10,17	15,38	822,72	2202,4
4285-02	6,95	10,95	863,07	3424,06
86b79-09	7,62	22,89	1003,04	5061,81
N 118	12,90	10,88	1106,94	7144,18
Sowmuk	14,76	8,82	1017,06	7640,84
1304-04	8,45	60,80	1005,04	8346,44
4223-06	15,94	4,96	1506,77	4026,19
Parayong	13,05	20,91	2242,92	2980,90
4253-03	14,76	39,31	1944,67	5437,43

302

303

304

Um outro fator, a ser considerado no estresse salino, é a toxidez ocasionada pelo íon sódio que reduz a capacidade produtiva da planta, devido a aceleração da senescência das folhas

305 maduras por necrose de seus tecidos, o que por sua vez ocasiona a redução do número de folhas
306 (Munns, 2002; Muscolo et al., 2003). Isso implica em menor produção de fotoassimilados pela
307 planta, o que limita o crescimento das folhas mais novas. Nos genótipos estudados apenas o Khai
308 Nai On não sofreu redução significativa na variável número de folhas, mostrando que a
309 salinidade afeta a produção da biomassa em bananeiras.

310 Foram observados que as plantas submetidas ao estresse salino apresentaram
311 sintomas de toxidez caracterizados, segundo Gomes et al. (2002), por pequenas manchas
312 avermelhadas ao longo do limbo foliar, inicialmente nas folhas velhas, evoluindo para um
313 amarelecimento, queima das bordas e do ápice foliar. O genótipo Sowmuk apresentou de forma
314 intensa os principais sintomas de toxidez (Figura 3), no entanto outros genótipos também
315 mostraram em diferentes níveis, sendo estes: 1319-01, 4285-02, 86B79-09, 4223-06 e o 4253-03 .

316
317



318
319
320
321

Figura 3. Sintomas de toxidez em tecido foliar de bananeira (genótipo SOWMUK).

322 Os resultados obtidos sugerem que o acúmulo diferencial de íons potencialmente tóxicos
323 (Na^+ e Cl^-) e a manutenção de níveis mais adequados de K^+ nas folhas são características que
324 contribuem para a tolerância à salinidade em genótipos diplóides (AA) de bananeira submetidas
325 ao estresse salino, deste modo, os genótipos apontados como tolerantes foram Birmânia e Khai
326 Nai On enquanto que o genótipo considerado mais sensível a presença do sal foi Sowmuk.

327 Todas as mudanças fisiológicas, morfológicas e de desenvolvimento em plantas têm uma
328 base genômica. Portanto, genótipos que diferem em tolerância ao estresse salino devem
329 apresentar diferenças quanto a sua diversidade genética. Jarret & Gawell (1995), usando a técnica
330 de RAPD na caracterização de clones de plátanos e na avaliação da diversidade genética entre
331 diplóides de *M. acuminata*, concluíram que esta técnica pode disponibilizar informações sobre
332 vários aspectos da diversidade genética em germoplasma de bananeira. Dos dezenove genótipos

333 avaliados, sete foram selecionados, baseados na análise fisiológica, para o estudo da diversidade
334 genética: 8694-15, Khai Nai On, Pipit, 134-06, Birmânia, Sowmuk e 4279-06.

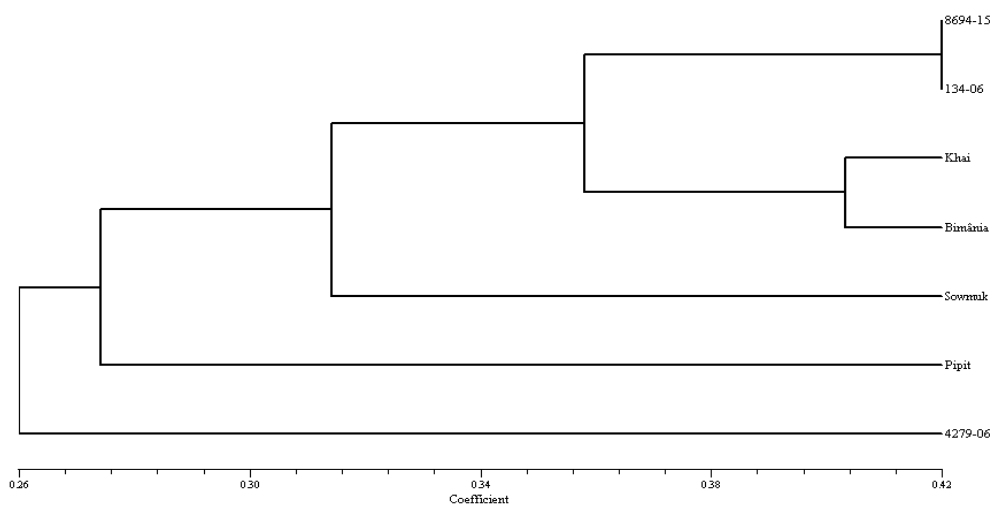
335 Na análise por meio de marcadores RAPD, o protocolo utilizado foi eficiente para a
336 extração do DNA das variedades estudadas. Dos 16 *primers* testados, dez mostraram regiões de
337 banda com formação satisfatória. Foram geradas 139 bandas polimórficas. O *primer* OPA13 foi o
338 que gerou menor número de regiões de banda apresentando oito fragmentos. Os *primers* OPO04,
339 OPF14, OPF15 e OPB10 geraram maior número de regiões de bandas, apresentado uma média de
340 17,74 fragmentos cada. Os fragmentos gerados apresentaram tamanhos de 300 a 2.500 pb.

341 No dendrograma construído (Figura 4), considerando a linha de corte em torno de 26%
342 de similaridade, pode-se observar a formação de dois grupos. O grupo I constituído por quatro
343 subgrupos e o grupo II formado pelo genótipo 4279-06. O subgrupo constituído dos genótipos
344 8694-15 e 134-06, ambos diplóides melhorados do Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e
345 Fruticultura – CNPMF da EMBRAPA, provavelmente, trata-se de genomas fixados pelo processo
346 de melhoramento genético, justificando o índice de similaridade de 42%, o maior entre os
347 genótipos estudados.

348 O outro subgrupo foi formado por Birmânia e Khai Nai On. Os demais genótipos do
349 grupo I, Sowmuk e Pipit, formaram *out groups*, apresentando um índice de similaridade genética
350 entre si em torno de 26%, podendo este fato ser atribuído ao efeito de repetidas seleções ou
351 mutações nos clones cultivados, que têm resultado em genoma de *Musa acuminata*,
352 significativamente diferente daquele encontrado em seus ancestrais diplóides.

353

354 Correlacionando-se os dados do efeito do NaCl nas variedades estudadas constata-se que
355 a análise de agrupamento manteve os genótipos Khai Nai On e Birmânia em um mesmo
356 subgrupo, apontados como tolerantes, com índice de similaridade genômica de 41%, índice este
357 considerado alto por se tratar de um genótipo cultivado e outro selvagem. Estas variedades que
358 apresentaram maior tolerância ao estresse salino quando comparadas com o genótipo apontado
359 como o mais sensível ao sal, Sowmuk, mostraram um distanciamento genético entre as cultivares
360 apresentando índice de similaridade em torno de 31% (Figura 4).



361

362 Figura 4. Dendrograma da análise de agrupamento dos sete genótipos diplóides de bananeira baseadas em
363 marcadores RAPD, obtido por meio do programa NTSYS-pc, usando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

364

365 De modo geral, a técnica de RAPD possibilitou a avaliação do genoma de sete dos
366 dezenove genótipos diplóides iniciais, escolhidos a partir dos resultados da avaliação fisiológica.
367 Os resultados mostraram uma possível correlação entre o nível de tolerância ao NaCl e a
368 formação dos grupos. Além disso, foi possível constatar uma ampla variabilidade genética entre
369 os genótipos estudados, apesar de todas pertencerem ao grupo genômico AA, mostrando o quanto
370 esta espécie está vulnerável a pontos de mutação, que graças a sua propagação vegetativa
371 perpetua a característica mutada.

372

373

CONCLUSÕES

374

375

376 • Os genótipos Birmânia e Khai Nai On apresentaram maior tolerância quando
377 submetidos ao incremento salino de 100 mM, sendo assim os mais promissores para
378 uso no melhoramento tradicional de bananeiras.

379

380 • O acúmulo diferencial de íons potencialmente tóxicos (Na^+ e Cl^-) e a manutenção de
381 níveis mais adequados de K^+ nas folhas podem contribuir para a tolerância à
382 salinidade em genótipos diplóides (AA) de bananeira.

383

384

385

- Os resultados da análise molecular mostram ampla variabilidade genética entre os sete genótipos diplóides (AA) de bananeira. Este resultado contribui para melhor planejamento no melhoramento visando uma maior tolerância a solos salinizados.

386

387

388

389

- As variedades que apresentaram maior tolerância ao estresse salino, quando comparadas com a mais sensível ao sal, mostraram-se distantes geneticamente, demonstrando assim o potencial da utilização de marcadores RAPD no estudo de diversidade genética.

390

391

392

393

394

395

REFERÊNCIAS

396

ALSHAMMARY, 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.

AQUINO, A. J. S.; LACERDA, C. F.; BEZERRA, M. A. Crescimento, partição de matéria seca e retenção de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em dois genótipos de sorgo irrigados com águas salinas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.5, p. 961-971, 2007.

ASSIS JUNIOR, J. O.; LACERDA, C. F.; SILVA, F. B.; BEZERRA, M.A.; Gheyi, H. R. Produtividade do feijão-de-corda e acúmulo de sais no solo em função da fração de lixiviação e da salinidade da água de irrigação. **Engenharia Agrícola**, v.7, n.3, p. 702-713, 2007.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande, UFPB, 1999. 153p.

BERNSTEIN, N.; SILK, W. K.; LfUCHLI, A. Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress: possible role of some mineral elements in growth inhibition. **Planta**, Heidelberg, v.196, p.699-705, 1995.

BEZERRA NETO, E.; ANDRADE, A.G.;BARRETO, L.P. **Análise química de tecidos e**

FERRAZ, G. M. G. Avaliação fisiológica e aplicação de ddPCR (differential display PCR) em genótipos ...

produtos vegetais. Recife: UFRPE, 1994, p. 99.

BORGES, A.L. Cultivo da banana para o agropólo Jaguaribe-Apodi, Ceará. Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF, Sistema de produção, n5, 2003. Versão eletrônica. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaJuazeiro/importancia.htm>> Acessado dia: 28/09/2006.

CARNEIRO, P T; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; SOARES, F. A. L.; VIANA, S. B. A. Tolerância de porta-enxertos de cajueiro anão-precoce à salinidade: índices fisiológicos e de crescimento. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n. 1, p 9-16, 2004.

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; COELHO, E. F. Influência da salinidade sobre o crescimento, absorção e distribuição de sódio, cloro e macronutrientes em plântulas de maracujazeiro

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v.12, p.13-18, 1990.

FAO. Statistics. Agricultural. Production. Crops. Primary. 2006 Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em fevereiro de 2004

FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p.307, 2004.

GOMES, E. W. F; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. S.; CAMARA, T. R.; SILVA, S. O. Genotypes of banana (*Musa* spp.) under saline stress: tolerance and sensitivity. **Infomusa**. INIBAP.Montpellier, v.11, N° 2, p.13-18. 2002.

GOMES, E. W. F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. S.; CAMARA, T.R.; SILVA, S. O. Variabilidade genética de genótipos de bananeira (*Musa* spp) submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.9, no.2, p.171-177, 2005.

GOUIA, H.; GHORBAL, M. H.; TOURAINÉ, 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, p. 1.409 - 1.418, 1994.

- FERRAZ, G. M. G. Avaliação fisiológica e aplicação de ddPCR (differential display PCR) em genótipos ...
- HASEGAWA, P.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.51, p.463-499, 2000.
- 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
- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; RUIZ, H. A.; PRISCO, J. T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, [S.I.], v.47, n.2, p.107-120, 2003.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A.de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e Aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fosfato, 201p. ,1989.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995.
- MOREIRA, R.S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. Campinas: Fundação Cargill, 335p. 1987.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell Environment**, Oxford, v.25, p.239, n250, 2002.
- 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.
- ORCUTT, D.M.; NILSEN, E.T. **Physiology of plants under stress**: soil and biotic factors. New York: J. Wiley, 2000, 683p.
- 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.
- SANTOS, J. R.; SOUZA, R. F. Efeito do estresse salino no desenvolvimento inicial de mangueira (*Mangifera indica* L.). **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v.15, n1, p. 22-25, 2003

- FERRAZ, G. M. G. Avaliação fisiológica e aplicação de ddPCR (differential display PCR) em genótipos ...
- SHANNON, M. C. Adaptation of plants salinity. **Advances in Agronomy**, Newark, v.60, p. 75 - 120, 1997.
- SOUSA, R.A. **Efeito da salinidade e da composição iônica da água de irrigação sobre o desenvolvimento de plantas de feijão Cv. Pitiúba**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- TAIZ, E.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed., São Paulo: Artmed, 2004. 719 p.
- WEEDEN, N.F., TIMMERMAN, G.M., HEMMAT, M., KNEEN, B.E., AND LODHI, M.A. Inheritance and reliability of RAPD markers. *In* **Application of RAPD technology to plant breeding**. Crop Science Society of America, Madison, Wis. pp. 12–17, 1992.
- ZHU, J. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.6, n.2, p.66 - 71, 2001.

CAPÍTULO III:

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ddPCR (*DIFFERENTIAL DISPLAY* PCR)
NA IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS EM DIPLÓIDES (AA) DE
BANANEIRA SUBMETIDOS AO ESTRESSE SALINO**

Artigo a ser submetido à Brazilian Journal of plant physiology

1 **Utilização da técnica de ddPCR (*differential display PCR*) na**
2 **identificação de genes expressos em diplóides (AA) de**
3 **bananeira submetidos ao estresse salino**

4 Gabriela de Moraes Guerra Ferraz ^{(1)*}, Luíza Suely Semen Martins⁽²⁾, Lilia Willadino⁽³⁾,
5 Eline Waked Ferreira Gomes⁽⁴⁾, Roberta Lane de Oliveira Silva ⁽⁵⁾, Sebastião de
6 Oliveira e Silva⁽⁶⁾, Terezinha de Jesus Rangel Câmara⁽⁷⁾, Isabelle Maria Jaqueline
7 Meunier.⁽⁸⁾

8 **(1) Pós-graduando em Melhoramento genético de plantas /UFRPE, Recife-PE. E-*
9 *mail: gabrielamguerra@gmail.com, (2) Professora do Dep. de Biologia/Área de*
10 *Genética/UFRPE Recife-PE. E-mail: luiza@db.ufrpe.br, (3) Professora do Dep. de*
11 *Biologia/UFRPE Recife-PE. E-mail: lilia@trunet.com.br, (4) Pesquisadora da*
12 *Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária/IPA, Recife-PE. E-mail:*
13 *elinew@ipa.br, (5) Pós-graduando em Agronomia Fitotecnia/UFRPE, Recife-PE. E-*
14 *mail: lane-roberta@gmail.com, (6) Pesquisador da Centro Nacional Mandioca e*
15 *Fruticultura/EMBRAPA. Cruz das Almas-BA. Email: ssilva@cnpmfembrapa.br, (7)*
16 *Professora do Dep. de Química/UFRPE Recife-PE. E-mail: tkrcamara@bol.com.br, (8)*
17 *Professora do Depto. Ciência Florestal/ Área de Estatística/UFRPE Recife-PE. E-mail:*
18 *imeunier@dcfl.ufrpe.br*

19

20 RESUMO --- Tolerância a salinidade em plantas é uma característica complexa por se
21 tratar de uma herança poligênica, formando complexos mecanismos que trabalham em
22 conjunto ou isoladamente para evitar ou tolerar a presença de sais. Este trabalho
23 objetivou a detecção das possíveis alterações no padrão de genes expressos em

24 genótipos diplóides (AA) de bananeira submetidos a 100 mM de NaCl. A técnica
25 utilizada para a obtenção de tais informações foi a ddPCR (differential display PCR),
26 considerada por muitos autores, um método simples, rápido, sensível e reprodutível.
27 Foram utilizados três genótipos diplóides (AA) de bananeira, Kha Nai On, Birmânia e
28 Sowmuk, com respostas contrastantes quando expostas a salinidade. O RNA total foi
29 extraído utilizando-se Trizol sendo em seguida sintetizado as fitas de cDNA por meio de
30 de combinações de *primers* âncora com *primers* decâmeros aleatórios. Foram obtidos
31 padrões de bandas diferencialmente expressas com as seguintes combinações de
32 *primers*: A3 + OPAA12, A3 + OPAA19, A3 + PRIMER 3, A1 + OPAA19 e A4 +
33 OPAA19. Foram observados 43 fragmentos de cDNA diferencialmente expressos entre
34 os genótipos avaliados, 30 foram expressos unicamente pelos genótipos tolerantes,
35 Birmânia e Kha Nai On, e 13 pelo genótipo sensível Sowmuk. As Regiões de bandas
36 diferencialmente expressas foram identificadas e caracterizadas em super expressada,
37 supra expressada, suprimida e formada apenas sob tratamento salino. Pelos resultados
38 deste trabalho, foi possível identificar alguns fragmentos potencialmente envolvidos em
39 respostas à condição de salinidade em bananeira. A técnica de ddPCR mostrou-se eficaz
40 para identificar regiões de banda diferencialmente expressas em genótipos diplóides de
41 bananeira submetidos ao estresse salino. Com essas informações, o estudo desses genes
42 poderá ser aprofundado visando à confirmação desses resultados e auxiliando no
43 desenvolvimento de novos cultivares de bananeira, mais adaptados ao estresse salino.

44

45 **ABSTRACT**

46 The salinity tolerance in plants is a complex feature to be a poligenetic legacy, forming
47 complex mechanisms that work together or separately to avoid, or tolerate, the salts

48 presence. This work aimed the detection of possible changes in the pattern of genes
49 expressed in diploid genotypes (AA) of banana submitted to 100 mM NaCl. The
50 technique used to obtain such information was the ddPCR (differential display PCR),
51 considered by many authors, as a simple, fast, sensitive and reproducible technique.
52 Three diploid genotypes (AA) of banana, Kha Nai On, Burma and Sowmuk, with
53 contrasting responses when exposed to salinity were used. Total RNA was extracted by
54 Trizol and then it was synthesized cDNA tapes through a combination of primers
55 anchor with random primers. It was possible to obtain patterns of bands differentially
56 expressed with the following combinations of primers: A3 + OPAA12, OPAA19 + A3,
57 A3 + PRIMER 3, A1 + OPAA19 and A4 + OPAA19. Forty three fragments of
58 differentially expressed cDNA were obtained among the studied genotypes. Thirty
59 genotypes were cast only by the tolerant genotypes, Burma and Kha Nai On, and 13 by
60 Sowmuk sensitive genotype. The Regions of differentially expressed bands were
61 identified and characterized in super expressed, above expressed, suppressed and
62 formed only under saline treatment. Based on the results of this study, it was possible to
63 identify some fragments potentially involved in answer to the condition of salinity in
64 banana. The ddPCR technique showed to be effective to identify regions of band
65 differentially expressed in diploid genotypes of banana submitted to salt stress. With
66 this information, the study of these genes can be more studied with the aim to confirm
67 these results and also helping the development of new varieties of banana, more adapted
68 to salt stress.

69

70

71

72 **INTRODUÇÃO**

73 A salinidade do solo é considerada mundialmente como um dos sérios
74 problemas abióticos da agricultura (Zhu, 2001). Anualmente, 10 milhões de hectares de
75 terras irrigadas são abandonados devido aos problemas de salinização e/ou sodicidade.
76 O Nordeste Brasileiro apresenta uma área potencial para irrigação estimada em 6
77 milhões de hectares e atualmente 25% dos perímetros irrigados existentes na região
78 Nordeste estão salinizados (Brito, 2002; Gomes et al., 2002).

79 O melhoramento genético da bananeira visando maior tolerância à salinidade é
80 necessário para aumentar a produtividade dessa cultura e possibilitar a ocupação de
81 áreas salinizadas que são constantemente abandonadas, sobretudo na região Nordeste
82 principal região produtora de bananas do Brasil.

83 O desenvolvimento de processos tecnológicos que visem reduzir as perdas
84 geradas na agricultura e aumentem a produtividade deverão ter prioridade entre as
85 estratégias governamentais. Neste contexto, a evolução do conhecimento sobre os
86 mecanismos de tolerância a grandes concentrações salinas será um dos principais focos
87 a serem abordados como estratégia para o futuro da agricultura mundial.

88 A aplicação de técnicas tradicionais, tais como caracterização sintomática,
89 avaliação fisiológica, avaliação química e bioquímica são largamente utilizadas na
90 caracterização de tolerância a salinidade em genótipos de culturas de interesse
91 comercial. Atualmente o estudo por meio de genomas funcionais e proteoma estão
92 fornecendo informações concisas para o desenvolvimento de genótipos capazes de
93 tolerar solos salinos sem que a produtividade seja prejudicada substancialmente.

94 Programas de melhoramento genético da bananeira e de plátanos utilizam cada
95 vez mais a biotecnologia para ajudar no desenvolvimento de novas variedades que
96 mantenham as características agrônômicas e de mercado, e que apresentem novos traços
97 de interesse para a agroindústria bananeira como, por exemplo, tolerância à salinidade,
98 proporcionando maior produtividade da cultura em áreas salizadas (Shannon, 1997,
99 Gomes et al., 2002, Gomes et al., 2006).

100 Algumas técnicas moleculares poderão levar ao conhecimento do transcriptoma
101 - genoma funcional de características de interesse, cuja fonte de genes se encontra no
102 gênero *Musa*. Dentre as diversas metodologias usadas na identificação e isolamento de
103 genes expressos, o ddPCR - *differential display PCR* é uma das opções mais baratas e
104 rápidas para comparar o transcriptoma de indivíduos, além de ser de fácil
105 implementação (Casagrande et al., 2001). Esta técnica foi desenvolvida por Liang e
106 Pardee (1992) e possibilita uma avaliação sensível de toda população de mRNAs
107 transcritos em qualquer tipo celular ou tecido em particular, sob condições específicas
108 em qualquer momento.

109 A identificação de genes envolvidos nas respostas ao estresse salino irá permitir
110 a elaboração de novas estratégias de melhoramento genético e de transgenia
111 direcionada, de forma intra e interespecifica uma vez que, serão compreendidas rotas
112 metabólicas envolvidas nas repostas fisiológicas ao estresse salino.

113 O presente estudo utilizou a técnica de ddPCR para avaliação de genes que tem a
114 sua expressão modificada em função da exposição a salinidade em genótipos diplóides
115 (AA) de bananeira.

116

117

118 MATERIAL E MÉTODOS

119 A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas na
120 casa-de-vegetação, do Departamento de Química, ambos localizados na Universidade
121 Federal Rural de Pernambuco – UFRPE e no Laboratório de Genoma da Empresa
122 Pernambucana de Pesquisas Agropecuária – IPA.

123 Foram utilizados os genótipos diplóides (AA) Khai Nai On (cultivada),
124 Birmânia (selvagem) e Sowmuk (cultivada) e provenientes do Banco Ativo de
125 Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF que, os quais com base
126 em avaliações fisiológicas preliminares foram identificados como tolerantes e sensível a
127 salinidade, respectivamente.

128 As mudas, provenientes de cultura de tecido, foram plantadas individualmente
129 em vasos de polietileno preto (55 cm de altura por 33 cm de diâmetro) contendo 10 Kg
130 de areia lavada coberta por uma camada de 1 cm de cascalho fino, a fim de minimizar a
131 evaporação e favorecer o controle da salinidade no substrato. Os dois tratamentos
132 receberam $742,86 \text{ mgL}^{-1}$ de fertilizante solúvel (Marca Kristalon) com a seguinte
133 composição: 3% de N, 11% de P_2O_5 , 38% de K_2O , 4% de MgO , 11% de S e
134 micronutrientes. O cálcio e nitrogênio foram fornecidos na forma de nitrato de cálcio
135 (marca Barco Viking) na dose de 840 mg.L^{-1} do produto composto de 15% de N e 19%
136 de Ca, seguindo metodologia usada por Gomes et al. (2006). As plantas permaneceram
137 sem o incremento salino pelo período de 10 dias para adaptação. A partir do 11º. dia, as
138 condutividades elétricas das soluções nutritivas dos dois tratamentos foram mantidas a 1
139 e 10 dS/m, que correspondem às concentrações de 0 e 100 mM de NaCl. O
140 delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado.

141 Por ocasião da coleta, 21 dias após a diferenciação dos tratamentos, o tecido
142 foliar da terceira folha de cada genótipo foi coletado, acondicionado, identificado e
143 mantido sob refrigeração em freezer a -80°C. Para a escolha da técnica, foi levada em
144 consideração principalmente a necessidade de comparação de mais de duas amostras
145 simultaneamente, em função do delineamento experimental adotado, sendo portanto, a
146 técnica de ddPCR – *differential display* PCR a mais apropriada. A extração do RNA total
147 foi realizada utilizando-se TRIZOL[®] Reagent, seguindo protocolo sugerido pelo
148 fabricante (Invitrogen). A quantificação do RNA total foi realizada mediante leitura em
149 espectrofotômetro utilizando-se o quociente do comprimento de onda A260 por A280 <
150 1,6. A integridade do RNA total, extraído do limbo foliar dos genótipos expostos aos
151 dois tratamentos, pode ser visualizado por meio de gel desnaturante de agarose 0,8%
152 corado com Sybr Gold (Figura 1). Para síntese das primeiras fitas de cDNA mediante
153 reações de RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) foram
154 utilizados 100 ng de RNA total isolado de cada tratamento/genótipo. Os cDNAs foram
155 sintetizados a partir da utilização de 4 *primer* âncoras: A1 (T₉GC), A2 (T₉CC), A3
156 (T₉GG) e A 4 (T₉CG) utilizados por CASAGRANDE et al. (2001) no estudo do
157 déficit hídrico em soja. Para a etapa de amplificação foram utilizados combinações do
158 *primer* âncora com cada um dos *primers* decâmeros randômicos OPA13
159 (CAGCACCCAC), OPAA12 (GGACCTCTTG), OPAA19 (TGAGGCGTGT), OPF07
160 (CCGATATCCC), OPF14 (TGCGCAGGT) utilizados por Jesus et al. (2006), visando a
161 diferenciação molecular de cultivares elite de bananeiras e PRIMER 3
162 (ACCCCGAAG). O volume final das reações RT foi de 25 µL, distribuídos em 3
163 passos. A reação inicial foi composta de RNA total; dNTP (10 mM) e *primer* âncora (50
164 µM) e levada ao termociclador a 65 °C por 5 min. Quando a temperatura baixou a 37 °C

165 acrescentou-se a reação tampão (5X); MgCl₂ (25mM); *primer* RAPD; RNase inibidor;
166 enzima Transcriptase SUPER SCRIPT III (Invitrogen), encubou-se a 50°C por 50
167 minutos e em seguida elevou-se a temperatura para 85 °C, durante 5 min. Após a reação
168 RT, foram feitas reações de PCR não radioativos usando-se as combinações dos *primers*
169 âncoras com *primers* randômicos (10-mer). O volume final da reação de PCR foi de 25
170 µL, com a seguinte composição: cDNA; dNTPs (10 mM); tampão (10X); MgCl₂ (50
171 mM); *primer* âncora (50 µM); *primer* RAPD (50 µM); Taq DNA polymerase (5 U/µL).
172 As temperaturas de amplificação utilizadas foram as seguintes: 1 min a 94 °C, seguido
173 de 40 ciclos de 94 °C por 15s, 35 °C por 30s e 72 °C por 1 min e uma extensão final a
174 72 °C por 7 min. Apenas as amostras que estavam em boas condições foram utilizadas
175 nas reações de transcrição reversa, para a obtenção do cDNA. Após as reações de
176 transcrição reversa, a qualidade do cDNA resultante foi visualizada em gel de agarose a
177 2% (Figura 2). Após registro fotográfico, as bandas foram analisadas. Bandas que se
178 apresentaram de forma diferentes nos géis foram identificadas e caracterizadas em super
179 e supra expressadas, suprimidas e formada apenas sob tratamento salino.

180

181 **RESULTADOS**

182 Os *primers* âncora, frente a diferentes combinações com os *primers* randômicos,
183 mostraram a formação de regiões de bandas geradas pela amplificação de fragmentos do
184 genoma funcional. Foram identificados 43 fragmentos de cDNA diferencialmente
185 expressos entre os genótipos avaliados, 30 transcritos foram expressos unicamente
186 pelos genótipos Birmânia e Khai Nai On (tolerantes), e 13 transcritos apenas pelo
187 genótipo Sowmuk (sensível). As regiões de bandas com maior consistência de
188 formação, encontraram-se entre 4000 pb e 150 pb.

189 No presente estudo, foi possível observar a formação de regiões de bandas
190 diferencialmente expressas entre e dentre os genótipos tolerantes e sensível. Foram
191 obtidos padrões de bandas diferencialmente expressas com as seguintes combinações de
192 *primers*:

- 193 • A3 + OPAA12 (Figura 3A)
- 194 • A3 + OPAA19 (Figura 3B)
- 195 • A3 + PRIMER 3 (Figura 3C)
- 196 • A1 + OPAA19 (Figura 3D)
- 197 • A4 + OPAA19 (Figura 4)

198

199 Dentre os *primers* âncora, o que gerou melhor resultado para análise da
200 expressão gênica diferencial foi o A3, enquanto que dentre os *primers* randômico foi o
201 OPAA19.

202 Algumas combinações de *primers* identificaram padrões de bandas expressas em
203 regiões e quantidade iguais apenas nos dois genótipos tolerantes, confirmando tratar-se
204 de material contrastante (Figura 3Ae 3C).

205 A avaliação das regiões de bandas resultou em quatro bandas super expressadas
206 (Figura 3A e 3B) e 12 regiões de bandas nos genótipos tolerantes apenas na presença do
207 incremento salino (Figuras 3A, 3B, 3C e 3D), enquanto o genótipo sensível, Sowmuk,
208 apresentou nove bandas super expressadas (Figuras 3A e 4) e apenas uma região de
209 banda expressa somente com o incremento salino (3A).

210 A combinação do *primer* âncora A3 com o *primer* OPAA19, mostra a formação
211 de uma região de banda comum nos genótipos tolerantes, Khai Nai On e Birmânia,
212 havendo ainda uma super expressão desta região no tratamento salino. No genótipo

213 sensível, Sowmuk, a super expressão deu-se no tratamento controle (Figura 3B). A
214 supressão da expressão de algumas regiões com o tratamento salino foi observada em
215 todos os genótipos avaliados (Figuras 3A, 3B, 3C e 3D).

216

217 **DISCUSSÃO**

218 Os resultados obtidos ilustraram significativamente a transcrição diferencial de
219 forma qualitativa e quantitativa nos diferentes genótipos avaliados frente ao incremento
220 salino. A comparação da expressão gênica em genótipos contrastantes pode fornecer a
221 informação básica necessária para a análise dos processos biológicos que controlam a
222 maneira como os organismos respondem a diferentes situações uma vez que, todas as
223 mudanças geradas no decorrer do desenvolvimento de qualquer organismos tem uma
224 base molecular/genética (Liang e Pardee, 1992; Zhu., 2001).

225 Segundo Micklos et al. (2005), podemos classificar os mecanismos regulatórios
226 em duas categorias; genes constitutivos, ou seja, genes que codificam para proteínas
227 essenciais presentes em quase todas as células de um indivíduo, e genes induzíveis,
228 aqueles cujas proteínas são expressas apenas em algumas células ou em determinado
229 período de desenvolvimento, ou mesmo em resposta a algum estímulo externo. Isso não
230 implica dizer que apenas genes induzíveis são diferencialmente expressos frente a
231 estresses bióticos ou abióticos. A quantidade do produto gênico também está
232 relacionada com o processo de tolerância ou resistência do organismo ao fato que o
233 estressa. Na presente pesquisa foi possível observar a expressão diferencial de genes
234 constitutivos, uma vez que foi observada uma super expressão nos genótipos tolerantes,
235 uma supra expressão no genótipo sensível e a sua expressão no tratamento controle
236 (Figura 3B).

237 A produção de alguns genes são necessários para a tolerância à este estresse, e a
238 acumulação dos produtos da expressão desses genes pode tornar-se uma resposta
239 adaptativa (Bray, 1997; Bray, 1993), porém podemos observar que houveram alguns
240 genes que foram suprimidos, ou seja, desativados frente ao incremento salino. Segundo
241 Nepomuceno et al. (2000) a desativação da expressão de um gene pode também estar
242 ligada ao aumento da tolerância ao estresse. Sendo assim, as regiões de banda expressa
243 exclusivamente no tratamento controle deverão ser estudadas, pois poderão indicar
244 possíveis rotas metabólicas relacionados a tolerância ao estresse salino. As rotas de
245 transmissão dos sinais moleculares de percepção de estresse em plantas não tem sido
246 muito estudada. Entretanto os modelos propostos para animais, leveduras e bactérias
247 assemelhan-se entre si sugerindo que, provavelmente, os sistemas vegetais de percepção
248 de estresse também sejam semelhantes aos da maioria dos seres vivos (Shinozaki e
249 Yamaguchi-Shinozaki, 1999).

250 Provavelmente, genes induzido pela presença de sais promovam aumento da
251 tolerância celular à desidratação, aumento das funções de proteção do citoplasma,
252 organelas e membranas celulares, aumento na absorção de água, aumento no controle e
253 no acúmulo de íons e maior regulação da expressão de outros genes (Bray, 1993; 1997;
254 Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

255 As expressed sequence tags - ESTs selecionadas irão permitir a identificação e
256 caracterização dos genes ativados ou reprimidos durante estes diferentes tratamentos,
257 tais como, as kinases ativadas por mitogen - MAPK, relacionado diretamente com
258 estresse salino (Jonak et al., 1996), as proteínas DREB, relacionado ao estresse hídrico,
259 que aderem as seqüências de DNA presentes em regiões promotoras de genes expressos

260 durante a desidratação (Kasuga et al., 1999) e as seqüências responsivas ao ácido
261 abscísico – ABA (Abe et al., 1997).

262 Outro aspecto importante diz respeito à futura utilização destas expressed
263 sequence tags - EST como sonda para identificação de seqüências relacionadas a
264 tolerância a salinidade em outros organismos de interesse científico ou comercial.

265 **CONCLUSÕES**

266 • As formações de diferentes padrões de banda em um mesmo genótipo com
267 diferentes tratamentos confirmam que a tolerância a salinidade é uma
268 característica regida por fatores genéticos.

269

270 • A técnica de ddPCR confirma ser uma ferramenta importante nos programas de
271 melhoramento, visto que atingiram os objetivos em estudos de expressão gênica.

272 .

273 **AGRADECIMENTOS**

274

275 Os autores agradecem ao BNB pelo financiamento da pesquisa e ao CNPq pela
276 concessão de bolsa Pós-Graduação/ UFRPE.

277

278

279 **REFERÊNCIAS**

ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; URAO, T; IWASAKI, T; HOSOKAWA,
D; SHINOZAKI, K (1997). Role of Arabidopsis MYC and homologs drought – and
abscisic acid – Regulated gene expression. The Plant Cell, 9: 1859-1868.

BRAY, EA (1997) Molecular responses to water deficit. Plant responses to water

deficit. Trends in Plant Science, 2: 48-54

BRAY, EA (1993). Molecular responses to water deficit. Plant Physiology, 103: 1035-1040.

BRITO, LKFL (2002) 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.

CASAGRANDE, EC; FARIAS, JRB; NEUMAIER, N; TETSIJI OYA; PEDROSO, J; MARTINS, PK; BRETON, MC; NEPOMUCENO, AL (2001) Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13 (2):168-184

GOMES, EWF; WILLADINO, L.; MARTINS, LSS; CAMARA, TR; SILVA, SO (2002) Genotypes of banana (*Musa* spp.) under saline stress: tolerance and sensitivity. INFOMUSA. INIBA, 11 (2): 13-18.

GOMES, EWF; WILLADINO, L.; MARTINS, LSS; CAMARA, TR; SILVA, SO (2005) Variabilidade genética de genótipos de bananeira (*Musa* spp) submetidos ao estresse salino. Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental, 9 (2): 171-177.

JONAK, C; KIEGERL, M; LIGTERINK, W; BARKER, P; HUSKISSON, NS; HIRT, H. (1996) Stress signaling in plants: a MAP kinase pathway is activated by cold and drought. Proc. Academy Science 9:11274-11279.

KASUGA, M; LUI, Q; MIURA, S; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of single stress-inducible transcription factor. Nature biotechnology. 17:287-291.

MICKLOS, DA; FREYER, GA; CROTTY, DA (2005) A ciência do DNA. , 2ªed

ARTEMED, Porto Alegre.

NEPOMUCENO, AL; STEWART, M; OOSTEHUIS, DM; TURLEY, R; NEUMAIER, N; FARIAS, JRB (2000) Isolation of cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35 (7): 1407-1416.

SHANNON, MC (1997) Adaptation of plants salinity. *Advances in Agronomy*, 60: 75 – 120.

SHINOZAKI, K; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*. 115: 327-334.

SHINOZAKI, K; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K (1999) Molecular responses to drought stress. *Biotechnology intelligence unit*, R.G. Landes Company, Austin, Texas.

ZHU, J (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6 (2): 66 – 71.

280

281

282

283

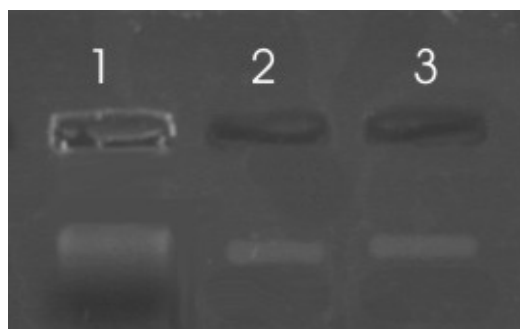
284

285

286

287

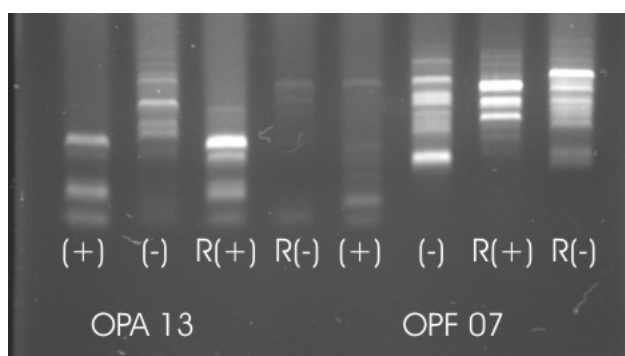
288 **FIGURAS**



289

290 Figura 1. Avaliação da qualidade do RNA extraído dos genótipos (1) Khai Nai On, (2)
291 Birmânia e (3) Sowmuk, visualizados por meio de gel de desnaturante de agarose 0,8%.

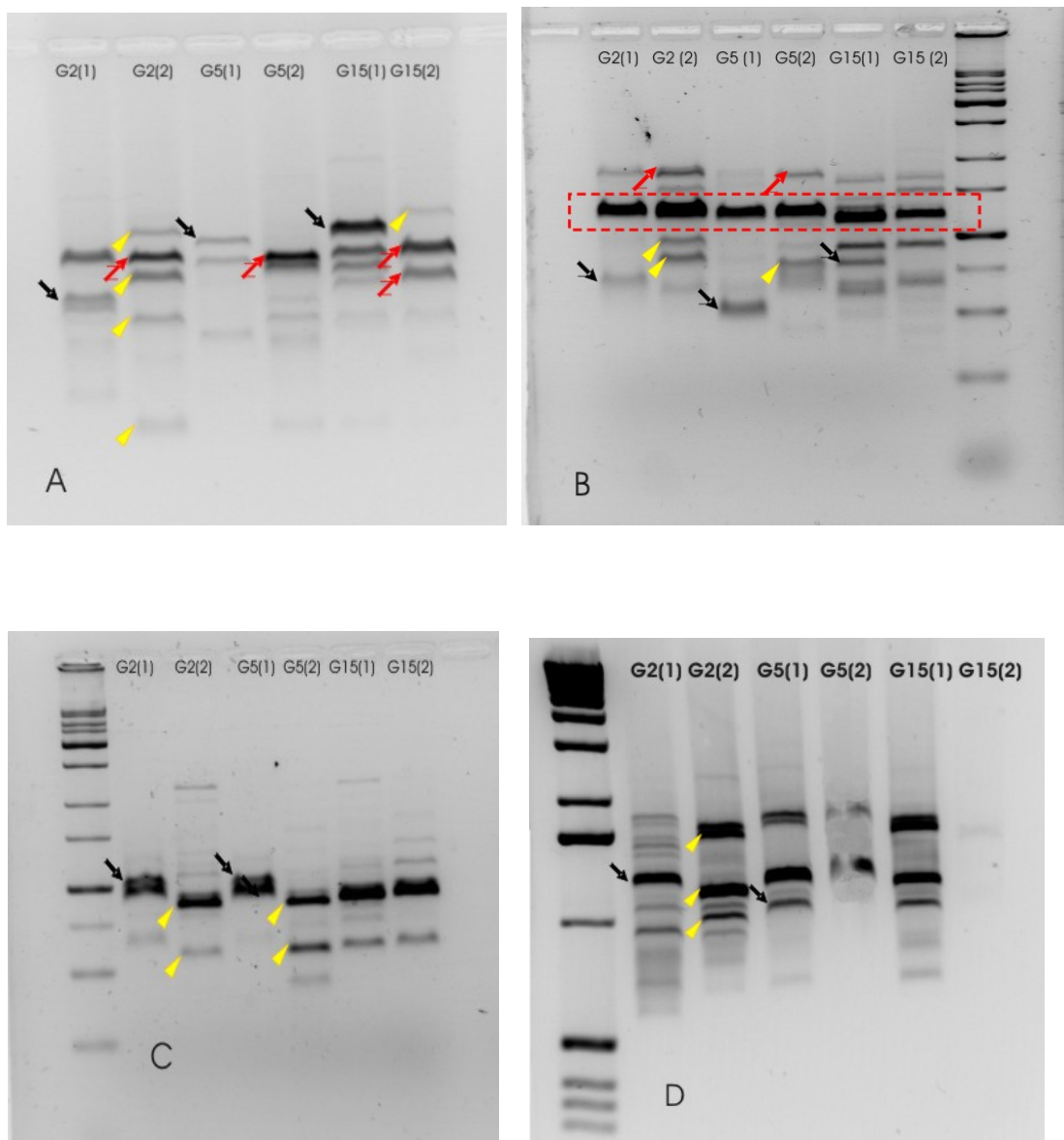
292



293

294 Figura 2. Visualização em gel de agarose a 2% da qualidade do cDNA após as reações
295 de transcrição reversa. O teste com dois *primers* randômicos, o OPA 13 e o OPF 07,
296 consistiu na otimização do protocolo onde foi utilizado RNA extraído do limbo foliar do
297 genótipo Birmânia frente aos dois tratamentos: utilização de RNase H[®] (+) ou
298 ausência desta enzima (-) e a utilização da enzima super script III (R) e com a ausência
299 desta enzima (sem referência do R).

300



301

302

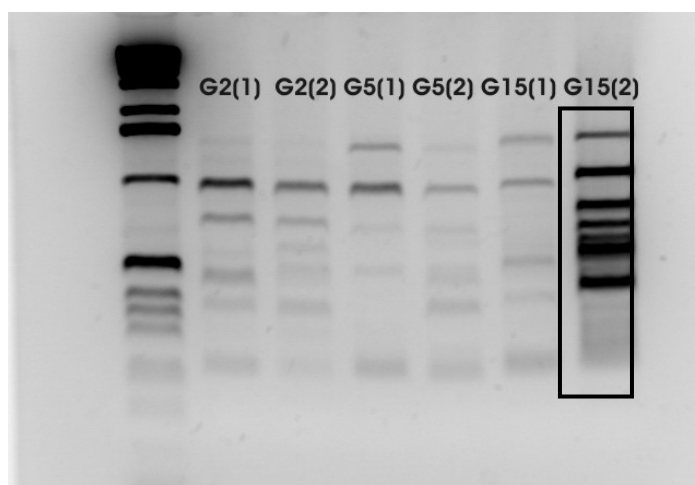
303

304

305 Figura 3. *Differential Display* do limbo foliar de genótipos de bananeira – G2 – Khai
 306 Nai On, G2- Birmânia e G15 – Sowmuk , (1) sem tratamento salino e (2) com
 307 tratamento salino, (A) *primer A3/ OPAA12*, (B) *primer A3/ OPAA19*, (C) *primer*
 308 *A3/PRIMER 3*, (D) *primer A1/OPAA19* e marcador molecular de 1Kb. As regiões de
 309 bandas foram caracterizadas em (▲) super expressadas,(▼) supra expressadas,(▲)
 310 bandas formadas apenas sob tratamento salino.

311

312



313

314 Figura 4. *Differential Display* do limbo foliar de genótipos de bananeira – G2 – Khai
315 Nai On, G2- Birmânia e G15 – Sowmuk , (1) sem tratamento salino e (2) com
316 tratamento salino, *primer* A4/ OPAA19 e marcador molecular de 1Kb.

CONCLUSÕES GERAIS

- Avaliação fisiológica mostrou-se eficaz na classificação dos genótipos avaliados, permitindo identificar os contrastantes.
- Os resultados do 1º. Artigo irá permitir o direcionamento dos genótipos para programas de melhoramento de acordo com a tolerância que apresentaram.
- O 2º. artigo apontou para a otimização da técnica de ddPCR para *Musa ssp.* que contribuirá para a futura identificação de genes relacionados ao estresse salino e a compreensão de suas rotas metabólicas, além de, no futuro, permitir o uso destes genes como sondas moleculares em programas de melhoramento.
- Finalmente, do ponto de vista acadêmico, foram produzidos trabalhos para divulgação em eventos de cunho técnico-científico e em periódicos especializados.

ANEXOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – “MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS”

NORMAS DE REDAÇÃO DE DISSERTAÇÃO

1. Normas Gerais

1.1. Dissertação constitui o produto final de pesquisas desenvolvidas em cursos de Mestrado. Exigem investigações próprias à área de especialização e métodos específicos.

1.2. A Dissertação é de responsabilidade do aluno, da Comissão Orientadora e da Banca Examinadora, a quem competirá determinar alterações na forma, na linguagem e no conteúdo.

2. Estrutura

2.1. A Dissertação deverá ser composta de: (i) capa, (ii) páginas pré-textuais, (iii) corpo da Dissertação propriamente dita e, (iv) anexo (páginas pós-textuais).

2.2. A capa deverá conter a autoria, título da Dissertação, local e ano da aprovação da Dissertação. As capas das Dissertações encadernadas em mais de um volume deverão conter as mesmas informações acrescidas da identificação do respectivo volume. Obrigatoriamente, cinco (5) exemplares devem ser de capas duras de cor preta e letras amarelas.

2.3. As páginas pré-textuais serão compostas:

2.3.1. Primeira folha interna (página de rosto), contendo; (i) autoria, (ii) título da Dissertação; (iii) nota explicativa de que se trata de um trabalho de Dissertação, mencionando o Programa de Pós-Graduação, a Universidade e o grau pretendido (Mestrado); (iv) comitê de orientação e (v) local e ano de aprovação da Dissertação. Contará, no verso desta folha, a ficha catalográfica.

2.3.2. Segunda folha interna deve conter, o título, o nome do mestrando(a), a data de aprovação da Dissertação, os nomes e as assinaturas do orientador e dos participantes da Banca Examinadora, local e data.

2.3.3. Opcionalmente, poderão ser incluídas páginas adicionais contendo: (i) agradecimento (ii) oferecimento, (iii) dedicatória e (iv) biografia do autor, obrigatoriamente, deve conter (v) lista de símbolos, figuras, tabelas e sumário.

2.3.4. Folha (s) em que conste (m) o resumo em português, palavras-chave, o abstract em inglês e key words. O resumo deve destacar: o local da pesquisa, delineamento estatístico, caracterização do problema, focalizar o(s) objetivo(s), síntese da metodologia, resultados obtidos e conclusões.

2.4. O corpo da Dissertação conterà todo o trabalho impresso, avaliado e aprovado pela Pré-Banca e Banca Examinadora. O corpo da Dissertação poderá ser organizado na forma de capítulos.

2.5. O corpo da Dissertação em capítulos será composto das seções:

(i) Capítulo I: Introdução Geral, (ii) Capítulos (I ou mais artigo(s) científico(s)) e (III) Conclusões Gerais. A organização interna deverá obedecer às características inerentes de cada capítulo. A bibliografia deverá aparecer ao final de cada capítulo.

2.6. O anexo (páginas pós-textuais) conterà material pertinente e suplementar à Dissertação, como exemplo, as normas do(s) periódico(s) escolhido(s).

2.7. Inserir cabeçalho a partir da Introdução Geral até a página inicial da folha anexo(s).

3. Editoração

3.1. Composição tipográfica. As dissertações deverão ser impressas em forma permanente e legível, com caracteres de alta definição e de cor preta no tipo Arial tamanho 12, com espaçamento 1,5.

3.2. Notação científica e medidas. A nomenclatura científica deverá ser diferenciada contextualmente, de acordo com as normas internacionais. As unidades métricas deverão seguir o padrão do Sistema Internacional de Unidades.

3.3. Papel. Utilizar papel A-4 (210 x 297 mm) branco, e suficientemente opaco para leitura normal.

3.4. Margens. A margem esquerda deve ser de 3 cm e as outras margens de 2 cm.

3.5. Paginação. Todas as páginas textuais e pós-textuais deverão ser numeradas em seqüência contínua, i.e., desde a página da Introdução geral (texto corrido), até a última

página, em algarismos arábicos. A seqüência deverá incluir tudo que estiver como mapas, diagramas, páginas em branco e outros. As páginas pré-textuais deverão ser numeradas, seqüencialmente, como algarismos romanos minúsculos.

3.6. Ilustrações. Fotografias e outras ilustrações deverão ser montadas de forma definitiva e incluídas no corpo da Dissertação. É admitido o uso de cores nas figuras e ilustrações. Em nenhuma circunstância deve-se-á empregar fita adesiva ou material similar para afixação de ilustrações no corpo da Dissertação. Folhas de tamanho superior a A4 serão aceitáveis, desde que dobradas, de forma a resultar em dimensões inferiores ao tamanho do papel adotado.

REVISTA BRASILEIRA DE FRUTICULTURA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Forma e preparação de manuscritos

1. A Revista Brasileira de Fruticultura (RBF) destina-se à publicação de artigos e comunicações técnico-científicos na área da fruticultura, referentes a resultados de pesquisas originais e inéditas, redigidas em **português, espanhol** ou **inglês**, e ou 1 ou 2 revisões por número, de autores convidados.

2. É imperativo que todos os autores assinem o ofício de encaminhamento mencionando que: "OS AUTORES DECLARAM QUE O REFERIDO TRABALHO NÃO FOI PUBLICADO ANTERIORMENTE, OU ENCAMINHADO PARA PUBLICAÇÃO À OUTRA REVISTA E CONCORDAM COM A SUBMISSÃO E TRANSFERÊNCIA DOS DIREITOS DE PUBLICAÇÃO DO REFERIDO ARTIGO PARA A REVISTA.", deve indicar a natureza da publicação (ARTIGO OU COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA). De acordo com a natureza da publicação, o mesmo deverá ser redigido de acordo com as respectivas normas. Trabalhos submetidos como artigo não serão julgados ou publicados na forma de Comunicação Científica e vice-versa.

3. Os trabalhos devem ser encaminhados (SEM DISQUETE) em quatro vias (3 vias sem o nome do(s) autor(es) para serem utilizadas pelos assessores e uma via completa para o arquivo, incluindo e-mail,), em

papel tamanho carta (216 x 279mm), numeradas, com margens de 2 cm, em espaço um e meio , letra Times New Roman, no tamanho 13 e escritos em uma única face do papel.

4. O texto deve ser escrito corrido, numerando linhas e parágrafos. Tabelas e figuras em folhas separadas, no final do artigo.

5. O Custo para publicação na RBF é de R\$ 250,00 por trabalho de 12 páginas (R\$ 50,00 por página adicional) a ser pago da seguinte forma:

No encaminhamento inicial efetuar o pagamento de R\$ 45,00 e na aceitação do trabalho o restante da taxa :

- a) R\$ 105,00 para sócios;
- b) R\$ 205,00 para não sócios.
- c) **Banco do Brasil, agência nº 0269-0 e Conta Corrente nº 8356-9 (enviar cópia do comprovante)**

OBS: Para trabalhos denegados ou encerrados, não será devolvido o pagamento inicial.

6. Enviar os trabalhos para o editor-chefe da RBF, Prof. Carlos Ruggiero, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane,s/n – Unesp/FCAV -CEP 14884-900 – Jaboticabal-SP - email: rbf@fcav.unesp.br . home page: www.rbf.org.br .

7. Uma vez publicados, os trabalhos poderão ser transcritos, parciais ou totalmente, mediante citação da RBF, do(s) autor(es) e do volume, número, paginação e ano. As opiniões e conceitos emitidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

8. Os artigos deverão ser organizados em **Título, Nomes dos Autores completos (sem abreviações e separados por vírgula, e de dois autores, separadas por &), Resumo (incluindo Termos para Indexação), Title, Abstract (incluindo Index Terms), Introdução,**

Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusão, Agradecimentos (opcional), Referências Bibliográficas, Tabelas e Figuras. O artigo deve ser submetido à correção de Português e Inglês, por profissionais habilitados, antes de ser encaminhado à RBF.

9. As comunicações devem ter estrutura mais simples 8 páginas, com texto corrido, sem destacar os itens, exceto Referências.

10. No **Rodapé** da primeira página, deverão constar a qualificação profissional, o endereço e e-mail atualizados do(s) autor(es) e menções de suporte financeiro.

11. As **Legendas** das Figuras e Tabelas deverão ser auto-explicativas e concisas. As Figuras coloridas terão um custo adicional de R\$250,00 em folhas que as contenham. As legendas, símbolos, equações, tabelas, etc. deverão ter tamanho que permita perfeita legibilidade, mesmo numa redução de 50% na impressão final da revista; parte alguma da Figura deverá ser datilografada; a chave das convenções adotadas deverá ser incluída na área da Figura; a colocação de título na Figura deverá ser evitada, se este **puder** fazer parte da legenda; as fotografias deverão ser de boa qualidade, bem focalizadas e de bom contraste, e serão colocadas em envelopes; cada Figura será identificada na margem, a traço leve de lápis, pelo seu número e nome do autor; as Figuras não devem estar danificadas com grampos.

12. Nas Tabelas, devem-se evitar as linhas verticais e usar horizontais, apenas para a separação do cabeçalho e final das mesmas, evitando o uso de linhas duplas.

13. **Apenas a versão final do artigo deve ser acompanhada por cópia em *disquete OU cd*, usando-se preferencialmente os programas Word for Windows (texto) e Excel (gráficos).**

14. As citações de autores no texto deverão ser feitas com letras minúsculas, tanto fora quanto dentro dos parênteses, separadas por “&”, quando dois autores. Quando mais de dois autores, citar o primeiro seguido de “et al”. (não use “itálico”).

REFERÊNCIAS :

NORMAS PARA REFERENCIA (ABNT NRB 6023, Ago. 2002)

As referencias no fim do texto deverão ser apresentadas em ordem alfabética nos seguintes formatos:

ARTIGO DE PERIODICO

AUTOR (es). Título do artigo. **Título do periódico**, local de publicação, v., n., p., ano.

ARTIGO DE PERIODICO EM MEIO ELETRONICO

AUTOR(es). Título do artigo. **Título do Periódico**, cidade, v., n., p., ano.

Disponível em:<endereço eletrônico>. Acesso em: dia mês (abreviado). ano

AUTOR(es). Título do artigo. **Título do Periódico**, local de publicação, v., n. p., ano. CD-ROM

LIVRO

AUTOR(es). **Título**: subtítulo. edição (abreviada). Local: Editora, ano. p.

(total ou parcial)

CAPITULO DE LIVRO

AUTOR. Título do capítulo. In: AUTOR do livro. **Título**: subtítulo. edição(abreviada). Local: Editora, ano. paginas do capítulo.

LIVRO EM MEIO ELETRONICO

AUTOR(es). **Título**. edição(abreviada). Local: Editora, ano. p. (total ou parcial).

Disponível em<endereço eletrônico>.Acesso em: dia mês (abreviado).
Ano

AUTOR (es). **Título**. edição(abreviada). Local: Editora, ano. p. CD-ROM

EVENTOS

AUTOR.Título do trabalho. In: NOME DO EVENTO, numeração, ano, local de realização.

Título...Local de publicação: editora, ano de publicação. p.

EVENTOS EM MEIO ELETRONICO

AUTOR. Título do trabalho. In: NOME DO EVENTO, numeração, ano, local de realização. **Título**...Local de publicação: Editora, data de

publicação. Disponível em:

<endereço eletrônico>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano.

AUTOR. Título do trabalho. In: NOME DO EVENTO, numeração, ano, local de realização. **Título**...Local de publicação: Editora, ano de publicação. CD-ROM

DISSERTAÇÃO, TESES E TRABALHOS DE GRADUAÇÃO

AUTOR. Título. ano. Numero de folhas ou volumes. Categoria da Tese (Grau e área de concentração)- Nome da faculdade, Universidade, ano.

NORMAS PARA TABELAS E FIGURAS:

Tabela - Microsoft Word 97 ou versão superior; Fonte: Times New Roman, tamanho 10; Parágrafo/Espaçamento simples; Largura da tabela em 10 ou 20,6 cm; Além de mandar a tabela no mesmo arquivo do trabalho, enviar cada tabela em arquivos separados; O título ou rodapé deverá ser digitado no MS Word.

Gráfico - Microsoft Excel/ Word 97 ou versão superior; Fonte: Times New Roman, tamanho 10; Parágrafo/Espaçamento simples; Largura da tabela em 10 ou 20,6 cm; Além de estar no corpo do trabalho, o gráfico deverá ser enviado separadamente, como imagem (na extensão jpg, tif ou gif com 300 dpi de resolução), e como arquivo do Excel atentando para as especificações de largura e fonte; O título ou rodapé deverá ser digitado no MS Word.

Fotos - Todas as fotos deverão estar com 300 dpi de resolução em arquivo na extensão: jpg, jpeg, tif ou gif; Além de estarem no corpo do

trabalho, as fotos devem estar em arquivos separados; O título ou rodapé deverá ser digitado no MS Word.

Figuras ou imagens geradas por outros programas – As imagens geradas por outros programas que não sejam do pacote Office Microsoft, devem estar com 300 dpi na extensão: jpg, tif ou gif; Largura de 10 ou 20,6 cm; O título ou rodapé deverá ser digitado no MS Word.



The Official Journal of the
Brazilian Society of Plant Physiology

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Escopo e política
- Submissão e revisão
- Diretrizes para a organização de manuscritos
- Envio de manuscritos

**ISSN 1677-0420 versão
impressa**

**ISSN 1677-9452 versão
online**

Escopo e política

Brazilian Journal of Plant Physiology - BJPP (ISSN 0103-3131) é o periódico oficial da **Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal** e voltado para a publicação de trabalhos científicos originais nas várias áreas da Fisiologia Vegetal. BJPP publica trabalhos regulares, comunicações, minirrevisões e minirrevisões brasileiras. Essas minirrevisões são publicadas mediante convite, mas autores também podem consultar o Editor-Chefe para o envio de um artigo. Minirrevisões Brasileiras devem versar, preferentemente, sobre a fisiologia de plantas de ecossistemas tropicais naturais. BJPP publica artigos nas seguintes áreas de conhecimento:

Processos Bioquímicos (Metabolismo primário e secundário, e bioquímica)

**Fotobiologia e Processos Fotossintéticos
Regulação Gênica, Transformação, Biologia Celular e
Molecular**

**Nutrição Mineral de Plantas
Desenvolvimento, Crescimento e Diferenciação**
(Fisiologia de sementes, hormônios vegetais e morfogênese)

**Fisiologia Pós-Colheita
Ecofisiologia/Fisiologia da Produção e Fisiologia do
Estresse**

**Interações Planta-Microrganismos e Planta-Insetos
Instrumentação em Fisiologia Vegetal**

BJPP somente publica trabalhos na língua inglesa, escritos de forma clara, concisa e fluente. Recomenda-se que o texto seja revisado por alguém fluente em inglês e familiarizado com terminologia e textos científicos. Os artigos enviados para publicação devem apresentar resultados novos e significantes. Isso é particularmente importante para trabalhos na área de Cultura de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais, que devem basear-se em dados que contribuam para a compreensão da fisiologia de plantas. Simples experimentação sobre a aplicação de métodos já existentes não será considerada para publicação, tampouco trabalhos originados de experimentos do tipo dose-resposta, sem discussão com base fisiológica.

Submissão e revisão

A submissão de um manuscrito ao Editor-Chefe necessariamente implica no fato de que o trabalho não foi publicado ou que está sendo avaliado para publicação em

outro periódico. Submissão de manuscritos de vários autores significa que o autor correspondente obteve a aprovação de todos os outros co-autores para submeter o manuscrito a BJPP. BJPP considera que todas as informações contidas em um artigo são de completa responsabilidade dos autores, inclusive a exatidão dos resultados e as conclusões deles extraíveis. Os autores devem enviar o manuscrito (em um único arquivo contendo texto como também tabelas, legendas para figuras e figuras) mediante e-mail para o Editor-Chefe. Solicita-se também aos autores que submetam um arquivo adicional contendo apenas o "abstract". Arquivos com extensão pdf ou doc (Word) são preferíveis. Fotografias importantes ou essenciais para a compreensão dos resultados têm de ter alta qualidade. Ao submeter um manuscrito, o Editor-Chefe verificará se o trabalho está dentro do escopo de BJPP e se segue as diretrizes do periódico. Submissões que não respeitarem as diretrizes de BJPP serão devolvidas imediatamente aos autores para correção, antes de serem enviadas para revisão. Os manuscritos serão enviados a um Editor Associado, que escolherá revisores baseando-se em suas competências nas várias áreas especializadas da fisiologia vegetal. Quando da submissão, os autores poderão indicar até cinco revisores potenciais (com seus respectivos e-mails) com competência reconhecida na área de pesquisa do manuscrito. Todavia, ao Editor Associado é reservado o direito de não considerar essas sugestões. Os autores receberão uma carta do Editor-Chefe juntamente com as avaliações dos revisores. Manuscritos que necessitarem de revisão deverão ser retornados ao Editor-Chefe dentro de 30 dias; caso contrário, serão considerados como submissões novas. A versão revisada deverá ser enviada via e-mail e deve ser

acompanhada de uma carta em que se responde aos questionamentos dos revisores e do editor. Os autores deverão justificar claramente quando não concordarem, ou quando não acatarem, um dado questionamento. Solicita-se aos autores que utilizem o aplicativo "Microsoft Word for Windows 95-2003" como processador de textos. Manuscritos rejeitados para publicação somente serão devolvidos aos autores se contiverem comentários importantes dos revisores que possam contribuir para as pesquisas do autor.

Diretrizes para a organização de manuscritos

Os autores deverão organizar o manuscrito na seguinte forma:

Manuscrito

Formatar o manuscrito, baseando-se em artigos recentemente publicados em BJPP. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, inclusive figuras e tabelas. As linhas de cada página deverão ser numeradas para facilitar o trabalho de revisão. Na primeira página, inclua o título do manuscrito (em negrito, fonte 16, justificado à esquerda, com inicial maiúscula apenas para a primeira palavra - quando aplicável), os nomes dos autores (em negrito, fonte 12, justificado à esquerda) e afiliação (em itálico, fonte 12, justificado à esquerda). O autor correspondente deverá ser indicado por um asterisco. O "Abstract" não deve conter mais que 250 palavras. Os autores devem sugerir de três a seis palavras-chave (em ordem alfabética) que não constem no título. O texto deve ser digitado em espaço duplo, fonte

"Times New Roman" (fonte 12) em apenas um lado do papel, com margens de 3 cm. Os manuscritos devem ser divididos em Introdução; Materiais e métodos; Resultados; Discussão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Legenda para figuras; e Figuras. Partes principais (e.g., Introdução, Resultados etc.) deverão estar em negrito, com letras maiúsculas e separadas do texto. Dentro dessas partes, subdivisões deverão estar em itálico, com apenas a letra inicial maiúscula. Apresentação conjunta de "Resultados e Discussão" só será aceita em circunstâncias excepcionais. A "Discussão" não deve conter repetição da descrição dos resultados. Nomes científicos deverão ser escritos em itálico. O nome científico completo (gênero, espécie, autoridade, e cultivar, quando apropriado) deverá ser citado para cada organismo, após a sua primeira menção. O epíteto genérico deverá ser abreviado após a primeira menção, desde que não resulte em conflito com abreviaturas para outros gêneros com a mesma letra inicial. Quando nomes comuns forem utilizados, deverão ser acompanhados dos respectivos nomes científicos após a primeira menção. Nomes de equipamentos especializados mencionados em "Material e métodos" deverão ser acompanhados de detalhes do modelo, fabricante, cidade e país de origem. Os nomes de enzimas deverão ser acompanhados de seu EC ("Enzyme Commission") após a primeira menção. Números de zero a nove deverão ser escritos por extenso, a menos que sejam acompanhados de uma unidade. Acima de dez, números deverão ser escritos com algarismos arábicos, exceto quando em início de frases. Datas deverão estar na forma "20 May 2006", e horas, na forma de 1200 h. Citações de literatura, ao longo do texto, deverão aparecer em ordem cronológica e, então, ordenadas por autor e ano (e.g., Styles,

1978; Meier and Bowling, 1995; Meier et al., 1997; Silva et al., 2004a, b). Não use "et al." em itálico. Sempre insira espaço entre um numeral e a unidade (por exemplo, 1 mL), com exceções de %, ‰ e °C (e.g., 1%). Apenas utilize o termo "in press" para artigos já aceitados para publicação, caso contrário, utilize a expressão "unpublished results". Observações não-publicadas ou comunicações pessoais devem ser mencionadas no texto (e.g., "T. Carter, personal communication"; "T. Carter and J. Spanning, unpublished results"). Evite citar teses. Títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o "*Bibliographic Guide for Editors and Authors - BIOSIS*". O último fascículo de cada volume de BJPP contém abreviaturas para a maioria dos periódicos científicos relacionados à fisiologia vegetal e áreas afins.

"Short Communications"

"Short Communications" poderão ser publicadas, mas sem a intenção de publicação de resultados preliminares. Devem ser concisas e conter resultados significantes. Não devem ter mais que 10 páginas digitadas em espaço duplo, incluindo tabelas e figuras. Devem ser enviadas com a primeira página seguindo as orientações para manuscritos regulares, mas sem subdivisões. As referências deverão seguir o texto.

"Minireviews"

Em "Minireviews", os autores são livres para sugerir a estrutura do artigo, mas tabelas e figuras deverão seguir as diretrizes para a publicação de manuscritos em BJPP. "Minireviews" serão também avaliadas por revisores. Deverão ser apresentadas concisamente, com foco em

assuntos relevantes de pesquisa em que se evidencie o estado-da-arte das informações disponíveis, devendo ainda servir de referência para estudos futuros. "Minireviews" deverão ser apresentadas em espaço duplo, contendo não mais que 20 páginas.

Referências

Referências de periódicos

Carelli MLC, Fahl JI, Ramalho JDC (2006) Aspects of nitrogen metabolism in coffee plants. Braz. J. Plant Physiol. 18:9-21.

Referências de livros

Salisbury FB, Ross CW (1992) Plant Physiology. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont.

Referências de capítulos de livros

Fujiwara K, Kozai T (1995) Physical and microenvironment and its effects. In: Aitken-Christie A, Kozai T, Smith MAL (eds), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, pp.301-318. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Anais de conferências e resumos publicados

Prisco JT, Pahlich E (1989) Recent advances on the physiology and salt stresses. In: Annals (or Proceedings/Abstracts) of the II Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal. Piracicaba, Brazil, pp.23-24.

Teses

Melotto E (1992) Characterization of endogenous pectin oligomers in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruit.

Davis, University of California. PhD thesis.

Tabelas e Figuras

Figuras e tabelas não devem repetir dados e devem ser reduzidas ao mínimo necessário. Devem ser numeradas consecutivamente, com números arábicos e, no texto, menções para tabelas e figuras devem aparecer na forma de "Table 1", "Figure 1", "Figure 1A"...Títulos para figuras e tabelas deverão estar também em espaço duplo. Utilize a formatação de tabelas usando células, não utilizando as teclas "tab" ou teclas de espaço para formatação. Utilize apenas linhas horizontais para a divisão das tabelas. Notas de rodapé para tabelas devem ser feitas com fonte de tamanho 10 e indicadas por meio de letras sobrescritas minúsculas, começando com a em cada tabela. Cada tabela e figura deve ser apresentada em página separada do manuscrito, e nunca devem ser incluídas no texto. Títulos de figuras devem ser digitados em uma página separada, antecedendo às páginas das figuras. Textos e números nas ordenadas das figuras não devem ser digitados com fonte de tamanho inferior a 10. Todas as figuras deverão ter tamanho que permita reprodução direta para impressão. Fotografias eletrônicas devem ser submetidas no tamanho desejado de impressão (85 mm de largura para uma coluna e até 175 mm para acompanhar a largura da página). BJPP reserva-se ao direito de reduzir o tamanho das figuras.

Unidades, símbolos e abreviaturas

O Sistema Internacional (SI) de unidades deve ser usado ao longo do manuscrito. Recomenda-se o livro ("Units, Symbols and Terminology for Plant Physiology", editado por F.B.

Salisbury, Oxford University Press, Oxford) para uma descrição detalhada e útil sobre unidades, símbolos e terminologia utilizados em fisiologia vegetal e ciências afins. Resumidamente, use pascal (Pa) para pressão, L para litro, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para irradiância, becquerel (Bq) para radioatividade, *gn* (*g* em itálico) para aceleração devido à gravidade, s para segundo, min para minuto, h para hora, Da para indicar massa molecular, que é representada por *m* (massa molecular relativa de proteínas é o mesmo que peso molecular, *Mr*, e não deve ser acompanhado por Da; e.g., a massa molecular relativa *Mr* = 10,000), ψ_w para potencial hídrico, ψ_p para potencial de pressão, ψ_s para potencial osmótico, e ψ_m para potencial mátrico. O último fascículo de cada volume de BJPP contém vários símbolos e unidades usadas em fisiologia vegetal. Recomendam-se abreviaturas apenas para unidades de medida, símbolos químicos (e.g., Fe, Na), nomes de substâncias químicas (e.g., ATP, MES, HEPES, H₂SO₄, NaCl, CO₂), procedimentos corriqueiros (e.g., PCR, PAGE, RFLP), terminologia molecular (e.g., bp, SDS) ou termos estatísticos (e.g., ANOVA, SD, SE, *n*, *F*, teste *t* e *r*²). Outras abreviaturas devem ser escritas por extenso após a primeira menção, não devendo ser utilizadas em início de frases. Abreviações de termos científicos não devem ser seguidas de ponto. Use o índice *menos* para indicar "por" (e.g., m⁻³, L⁻¹, h⁻¹), exceto nos casos "por planta", "por vaso". O autor poderá fornecer, caso julgue conveniente, uma lista de abreviaturas, como um Apêndice.

Ilustrações

Fotografias devem ter alta qualidade e incluídas no fim do texto. O número de fotografias deve ser reduzido ao mínimo. Linhas nas figuras devem ter espessuras uniformes. Texto e

números devem ter dimensões apropriadas.

Provas de imprensa

Autores devem devolver as provas de imprensa de seus manuscritos dentro de três dias após o recebimento. Não serão aceitas alterações extensas.

Separatas

Os autores receberão um arquivo em formato PDF como separata.

Custos de página

Não há custos para os autores ao publicarem seus manuscritos em BJPP.

Envio de manuscritos

Manuscritos devem ser enviados preferentemente por e-mail para:

Fábio M. DaMatta

Brazilian Journal of Plant Physiology, Editor-Chefe

Departamento de Biologia Vegetal

Universidade Federal de Viçosa

36570-000 Viçosa, MG

Brasil

E-mail: bjpp@ufv.br

Fax: +55.31.3899.2580

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

© 2008 *Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal*

Departamento de Fisiologia Vegetal, IB - UNICAMP

Caixa Postal 6109

13083-970 Campinas SP - Brasil

Tel.: (55 19) 3788-6213 / Fax: (55 19) 3788-6210



pmazza@unicamp.br