



Análise da variação somaclonal em mudas micropropagadas de *Musa acuminata* cultivar Grande Naine por meio de marcadores RAPD

Gilmar Roberto Zaffari¹, Gilberto Barbante Kerbauy²

Resumo – Plantas de banana foram regeneradas através da cultura de tecidos a partir de gemas apicais de bananeira Cavendish, cultivar Grande Naine, e mantidas por dez subcultivos em diferentes meios de cultura. O DNA genômico foi extraído a partir de rizomas das plantas matrizes originais, das plantas mutantes anãs e variegadas oriundas do cultivo *in vitro* e das plantas providas de cinco e dez subcultivos. A análise, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) foi realizada utilizando-se 20 “primers” (iniciadores – sequência conhecida de nucleotídeos³), dois dos quais (10%) revelaram polimorfismo entre as plantas anãs e variegadas em relação às plantas normais. Com a utilização do “primer” OPJ-04, foram amplificados, nas plantas normais, dois fragmentos de aproximadamente 1,5 e 2,0kb (quilobase, mil pares de bases) os quais estavam ausentes nas plantas anãs. Já o “primer” OPH-09 apresentou a amplificação de uma banda de aproximadamente 1,7kb presente tanto nas plantas anãs quanto nas variegadas, mas ausente nas plantas normais. Neste estudo, mostrou-se que através do uso de marcador molecular RAPD é possível detectar variação somaclonal surgida durante o processo de micropropagação nos mutantes.

Termos para indexação: banana, cultura de tecidos, mutação, marcador molecular.

Somaclonal variation analysis in micropropagated plants of *Musa acuminata* cultivar Grande Naine using RAPD marker

Abstract – Banana plants were regenerated using tissue culture of top buds from Cavendish plants, cultivar Grande Naine, maintained under ten successive cultivations in different culture media. The genomic DNA was extracted from the original matrix plant rhizoms, also from the dwarf mutant ones, variegated plants and from the plants originated from the five and ten successive *in vitro* cultivations. The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was carried out using 20 primers, having two of them (10%) shown polymorphism among the dwarf and variegated plants in relation to the normal plants. The OPJ-04 primer has amplified two fragments of approximately 1.5 and 2.0kb present in the normal plants, but absent in the dwarf ones. The OPH-09 primer, however, presented an amplification of approximately 1.7kb fragment, present in both dwarf and in the variegated plants, but absent in the normal ones. This study shows that using the RAPD molecular marker makes it is possible to detect induced somaclonal variation through micropropagation in banana plants.

Index terms: banana plants, tissue culture, mutation, molecular marker.

Introdução

A cultura da bananeira ocupa cerca de 9 milhões de hectares em mais de 120 países e destaca-se por ser a fruta mais consumida no mundo (FAO, 2006). As principais cultivares de bananeira de importância

econômica pertencem ao gênero *Musa*, espécie *acuminata* ou híbridos entre *acuminata* e *balbisiana*.

A propagação vegetativa da bananeira é a forma utilizada para a obtenção de mudas geneticamente idênticas à planta matriz, preservando-se as características da

cultivar. Atualmente, a produção de mudas de bananeira é realizada em laboratórios de cultura de tecidos de plantas. Entretanto, a micropropagação de bananeira, a partir de ápices meristemáticos e gemas isoladas, tem resultado em níveis relativamente elevados de variação

Aceito para publicação em 25/5/09.

¹ Eng.-agr., Dr., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC, fone: (47) 3341-5244, e-mail: gzaffari@epagri.sc.gov.br.

² Biólogo, Dr., USP/Instituto de Biociências, C.P. 11.461, 05422-970 São Paulo, SP, e-mail: gbkerba@terra.com.br.

³ Nucleotídeos são os pares de bases (adenina, citosina, guanina e timina) que formam os genes.

somaclonal, com frequências variando de 3% a 25% (Hwang & Ko, 1987). Os principais tipos de alterações genéticas observadas no subgrupo Cavendish têm sido a ocorrência de alterações na altura da planta e na morfologia foliar. O nanismo representa cerca de 75% dos mutantes, enquanto 24% destes apresentam alterações nas folhas, sendo a variegação a forma mais comum (Reuveni, 1990).

A detecção precoce das variações genéticas durante o cultivo *in vitro* tem sido efetuada pela análise visual (Israeli et al., 1991), pela aplicação de ácido giberélico (Reuveni, 1990) e por meio da análise do conteúdo de proteína total (Reuveni et al., 1986). Alguns métodos têm sido utilizados para a detecção da variação somaclonal em plantas através de análise do DNA por marcadores moleculares. Dentre os marcadores moleculares, a detecção por Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) tem sido usada por se tratar de um método simples, rápido e menos dispendioso (Heinze & Schmidt, 1995; Ngezahayo et al., 2006; Arruda et al., 2006), porém não é tão confiável devido à baixa reprodutibilidade dos resultados (Borém & Caixeta, 2006).

O estudo teve como objetivo verificar a possibilidade de uso de marcadores RAPD na detecção de diferenças moleculares em plantas matrizes de bananeira, plantas *in vitro* normais, após um período prolongado de cultura, e em plantas anãs e variegadas obtidas pela micropropagação.

Material e métodos

A micropropagação de bananeira do subgrupo Cavendish (AAA), cultivar Grande Naine, foi estabelecida a partir de gemas apicais isoladas de plantas matrizes obtidas do banco de germoplasma de bananeira da Epagri/Estação Experimental de Itajaí, de março de 1996 a fevereiro de 1997. Os explantes foram mantidos durante dez subcultivos (465 dias) em meio Murashige & Skoog (1962) (MS), adicionado de benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ) e ácido tri-

-iodado benzoico (TIBA). As amostras utilizadas para extração de DNA foram constituídas pelos seguintes materiais: (1) rizomas provenientes do campo (planta matriz); (2) rizomas com 240 dias *in vitro* (5 subcultivos) em meio MS; (3) rizomas com 240 dias *in vitro* em meio MS + 2,5mg/L BAP; (4) rizomas com 240 dias *in vitro* em meio MS + 7,5mg/L BAP; (5) rizomas com 240 dias *in vitro* em meio MS + 0,1mg/L TDZ; (6) rizomas com 465 dias *in vitro* (10 subcultivos) em meio MS; (7) rizomas com 465 dias *in vitro* em meio MS + 2,5mg/L BAP; (8) rizomas com 465 dias *in vitro* em meio MS + 7,5mg/L BAP; (9) rizomas com 465 dias *in vitro* em meio MS + 0,1mg/L TDZ; (10) rizomas com 465 dias *in vitro* em meio MS + 0,01mg/L TIBA; (11) rizoma de plantas anãs cultivadas em casa de vegetação e (12) rizoma de plantas variegadas cultivadas em casa de vegetação. As amostras 11 e 12 representam variantes somaclonais formadas *in vitro* e mantidas em casa de vegetação.

O DNA foi extraído de 1g de tecido de rizoma fresco, segundo o método de Dellaporta et al. (1983). A concentração do DNA genômico foi estimada através da espectrofotometria, sendo sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,7% e tampão TBE 0,5 X. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador utilizando vinte “primers” (10-mer) (Operon Technologies). As reações de amplificação basearam-se no método de Williams et al. (1990), com pequenas modificações (Carneiro, 1997). Os ciclos de reação (94°C/15min; 35°C/30min; 72°C/60min) foram repetidos 39 vezes após um ciclo inicial de 94°C/60min; 35°C/30min; 72°C/60min. Cinco microlitros do produto da reação da PCR foram fracionados por eletroforese a 100 volts, em gel de agarose 2% e tampão TBE 10X (90mM Tris borato + 2 mM EDTA). A coloração do DNA foi feita com brometo de etídio (5mg/ml) (Sambrook et al., 1989), e a visualização dos fragmentos amplificados se deu através de luz

ultravioleta (302nm) com posterior fotodocumentação. As reações de PCR foram repetidas 3 vezes para confirmar os padrões obtidos com cada um dos “primers” testados.

Primeiramente, foi elaborada uma matriz binária pela presença ou ausência de *loci* polimórficos. Para tanto, para cada material foram considerados apenas os fragmentos nítidos e desconsideraram-se os muito fracos e os de difícil ou duvidosa resolução. A partir da matriz binária, fez-se a análise de similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard e análise de agrupamento pelo algoritmo UPGMA pelo programa computacional NTSYS (Rohlf, 2000).

Resultados e discussão

A análise com os marcadores moleculares RAPD produziu um total de 131 fragmentos, e cada “primer” gerou de dois a 15 fragmentos amplificados, distintos e reproduzíveis. Esses fragmentos variaram em tamanho de 3 a 3,5kb (Tabela 1).

No dendograma se observa a formação de dois grandes grupos com 93% de similaridade entre si (Figura 1). O primeiro grupo é formado pelos indivíduos 1 e 2 que, por sua vez, possuem 95,5% de similaridade entre si. O segundo grupo é formado pelos indivíduos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 com 100% de similaridade entre si. Não se observou variabilidade genética entre os indivíduos 3 a 12. No entanto, pode-se sugerir a existência de mutação nos indivíduos 1 e 2, o que torna estes geneticamente diferente dos demais.

As plantas regeneradas na presença de BAP (2,5 e 7,5mg/L), TDZ (0,1mg/L) e TIBA (0,01mg/L) formaram-se a partir do desenvolvimento de gemas laterais predeterminadas ou não. A análise RAPD não revelou nenhum tipo de polimorfismo no material analisado com cinco e dez subcultivos, contrariando a ocorrência esperada de variação somaclonal entre as plantas cultivadas por prolongados períodos de tempo. Visualmente, apenas uma planta anã foi detectada ao longo da cultura, porém não fez parte das amostras. Em função de a ►

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados como “primers” na análise RAPD em *Musa acuminata* (AAA) cultivar Grande Naine

“Primer”	Sequência	Número total de fragmentos	Número de fragmentos polimórficos	Faixa do tamanho dos franmentos kb
OPJ04	CCGAACACG	11	2	600 a 3.054
OPH01	GGTCGGAGA	7	0	300 a 1.200
OPH02	TCGGACGTA	5	0	700 a 1.100
OPH03	AGACGTCCAC	2	0	1.000 a 1.100
OPH04	GGAAGTCGC	6	0	700 a 1.500
OPH05	AGTCGTCCCC	7	0	700 a 2.036
OPH06	ACGCATCGCA	3	0	600 a 1.100
OPH07	CTGCATCGTG	6	0	800 a 3.200
OPH08	GAAACACCCC	10	0	550 a 3.050
OPH09	TGTAGCTGGG	15	1	570 a 2.800
OPH11	CTTCCGCAGT	7	0	800 a 3.100
OPH12	ACGCGCATGT	7	0	750 a 2.036
OPH13	GACGCCACC	6	0	700 a 3.000
OPH14	ACCAGGTTG	7	0	400 a 3.500
OPH15	AATGGCGCG	4	0	850 a 3.054
OPH16	TCTCAGCTGG	3	0	800 a 1.500
OPH17	CACTCTCCTC	3	0	750 a 1.800
OPH18	GAATCGGCA	3	0	370 a 900
OPH19	CTGACCAGCC	13	0	390 a 2.300
OPH20	GGGAGACAC	6	0	750 a 1.450

análise ter sido realizada a partir de dez rizomas de plantas escolhidas aleatoriamente, de um total de aproximadamente 100 plantas, possivelmente as alterações genéticas, se presentes no experimento, não foram contempladas na amostragem ou não foram detectadas pela análise RAPD. Aplicações de marcadores moleculares do tipo RAPD e ISSR têm mostrado a existência de algumas alterações no DNA de plantas de bananeira obtidas por meio da cultura de tecidos (Ray et al., 2006). Esses autores observaram a presença de três variantes somaclonais, nas quais a porcentagem de *loci* polimórficos obtidos por RAPD e ISSR foi de 1,75 e 5,08 na cultivar Robusta e de 0,83 e 5,0 na cultivar Giant Governor, respectivamente. De maneira clara, Oh et al. (2007) verificaram que algumas regiões do genoma da bananeira apresentam altas taxas de mutação e rearranjos quando as

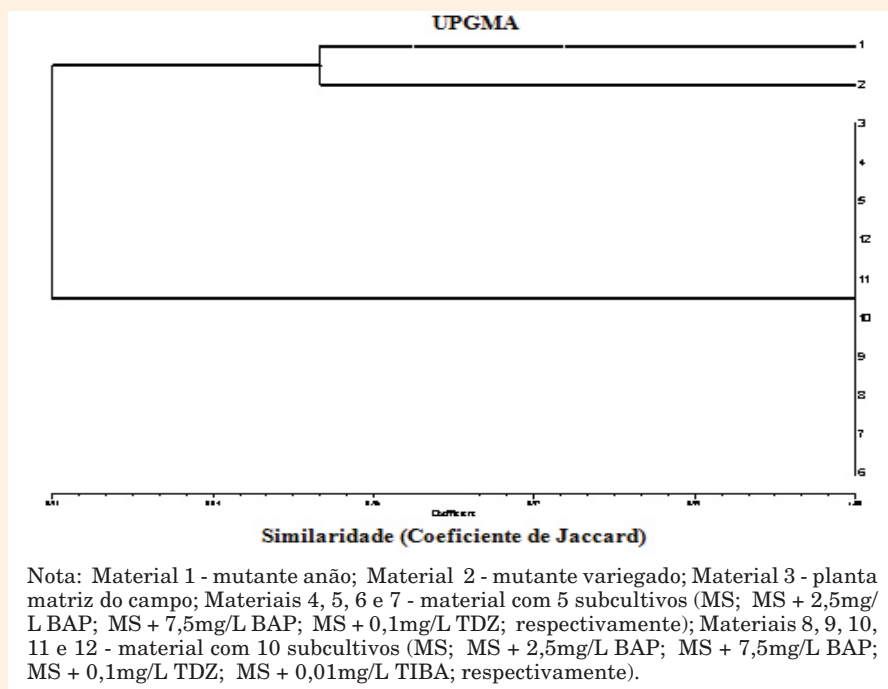
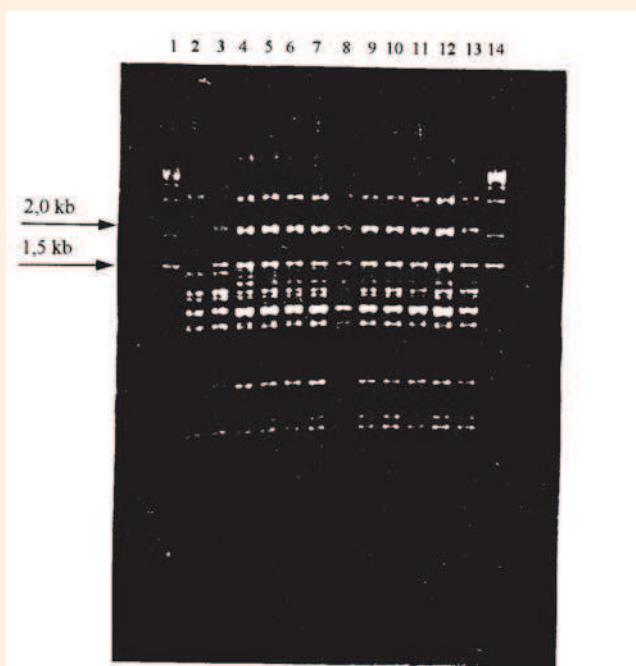
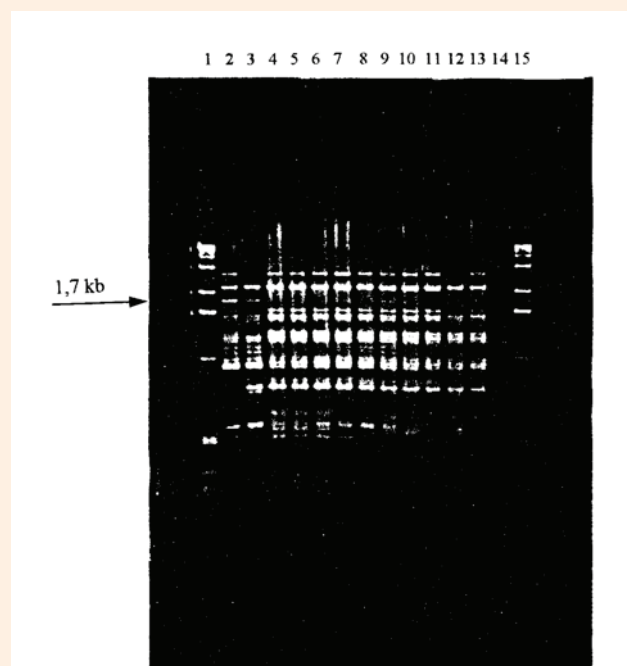


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método UPGMA para o coeficiente de Jaccard, para as 21 bandas amplificadas geradas pelo RAPD para os “primers” OPJ-04 e OPH-09.



Nota: Linhas 1 e 14 – marcador de peso molecular (1kb DNA ladder); Linha 2 – mutante anão; Linha 3 – mutante variegado; Linha 4 – plantas matrizes do campo; Linhas 5, 6, 7 e 8 – material com cinco subcultivos (MS; MS + 2,5mg/L BAP; MS + 7,5mg/L BAP; MS + 0,1mg/L TDZ, respectivamente); Linhas 9, 10, 11, 12 e 13 – material com dez subcultivos (MS; MS + 2,5mg/L BAP; MS + 7,5mg/L BAP; MS + 0,1mg/L TDZ; MS + 0,01mg/L TIBA, respectivamente).

Figura 2. Produtos de amplificação obtidos com o “primer” OPJ04 a partir de indivíduos originados de micropropagação da cultivar Grande Naine



Nota: Linhas 1 e 15 – marcador de peso molecular (1kb DNA ladder); Linha 2 – mutante anão; Linha 3 – mutante variegado; Linha 4 – plantas matrizes do campo; Linhas 5, 6, 7 e 8 – material com cinco subcultivos (MS; MS + 2,5mg/L BAP; MS + 7,5mg/L BAP; MS + 0,1mg/L TDZ, respectivamente); Linhas 9, 10, 11, 12 e 13 – material com dez subcultivos (MS; MS + 2,5mg/L BAP; MS + 7,5mg/L BAP; MS + 0,1mg/L TDZ; MS + 0,01mg/L TIBA, respectivamente); Linha 14 – controle negativo (sem DNA).

Figura 3. Produtos de amplificação obtidos com o “primer” OPH09 a partir de indivíduos originados de micropropagação da cultivar Grande Naine

plantas são submetidas a estresses durante a micropropagação. Erig & Schuch (2003) e Rocha et al. (2004), verificaram que, apesar de a análise RAPD caracterizar diferentes cultivares de *Pyrus communis*, a técnica não foi suficientemente sensível para detectar pequenas alterações genéticas. Assim, também se admite que, no presente estudo, possivelmente o número de “primers” usados, e, conseqüentemente, o número de fragmentos analisados, ainda é insuficiente para se assegurar a plena saturação do genoma.

Dois dos 20 “primers” utilizados revelaram padrões distintos entre as plantas anãs e variegadas em relação às plantas normais. Os fragmentos polimórficos amplificados com a

utilização do “primer” OPJ-04, presentes nas plantas normais, porém ausentes nas plantas anãs, apresentaram tamanho de 1,5kb e de 2,0kb (Figura 2). O número de produtos amplificados pelo “primer” OPJ-04 variou de dez a 11 nas plantas normais e nove nas plantas anãs. Damasco et al. (1996), trabalhando com plantas normais e anãs do subgrupo Cavendish, cultivar New Guinea Cavendish e Williams, verificaram que com a utilização do “primer” OPJ-04 foi observado um fragmento de aproximadamente 1,5kb, o qual estava presente em todas as plantas normais, mas ausente nas plantas anãs de ambas as cultivares. Embora existam diferentes intensidades de nanismo, como anão, superanão,

semianão (Reuveni et al., 1986), é interessante notar que, por meio do mesmo “primer”, se detectou em duas cultivares distintas o mesmo fragmento polimórfico associado ao fenótipo anão.

Por outro lado, o “primer” OPH-09 apresentou a amplificação de fragmentos de aproximadamente 1,7kb presentes nas plantas anãs e variegadas, mas ausentes nas plantas normais (Figura 3). O número de produtos amplificados com este “primer” variou de oito a dez nas plantas normais e de dez a 11 nas plantas anãs e variegadas.

Dois tipos de polimorfismo foram detectados neste estudo, representados pela ausência e presença de fragmentos. A presença de um mesmo padrão obtido nos dois ▶

genótipos, anão e variegado, sugere um alto nível de homologia na sequência do DNA naquela posição (Williams et al., 1990). Por outro lado, a presença do fragmento apenas no genótipo anão e sua ausência no outro genótipo indica a existência de diferenças na sequência de DNA. A falta de amplificação nos dois genótipos pode ser atribuída à mudança de uma única base comum a ambos os genótipos ou a duas sequências completamente diferentes (Vierling & Nguyen, 1992), podendo também ser devida a deleções cromossômicas, translocações ou ativação de elementos transponíveis (Phillips et al., 1990).

Conclusões

- A análise de RAPD pode ser utilizada para detectar a variação genética induzida pelo processo de micropropagação em bananeiras apesar do baixo número de “primers” utilizado no estudo.

- O uso de marcadores moleculares do tipo RAPD pode ser de grande valia para analisar a ocorrência de instabilidades genéticas no material de bananeira mantido *in vitro*, bem como para detectar precocemente a presença de mutantes anões e variegados durante o processo de micropropagação.

Literatura citada

- ARRUDA, A. da SILVA; FIGUEIRA, E.R.; SILVA, A.S. et al. Variação genômica intraclonal de explantes de morango em ambiente controlado. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.22, p.119-124, 2006.
- BOREM, A.; CAIXETA, T. *Marcadores moleculares*. Viçosa, MG: UFV, 2006. p.79-107.
- BERLYN, G.P.; BECK, R.C.; RENFROE, M.H. Tissue culture and the propagation and genetic improvement of conifers. *Tree Physiology*, Canadá, v.1, p.227-240, 1986.
- CALIGARI, P.D.S.; SHOHET, S. Variability in somatic embryos. In: REDENBAUGH, K. (Ed.). *Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement*. Boca Raton: CRC, 1993. p.163-174.
- CARNEIRO, M.S. *Aplicabilidade de marcadores “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) para o monitoramento da variação somaclonal em bananeira do subgrupo Cavendish*. 1997. 92f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Bahia, Bahia, 1997.
- DAMASCO, O.P.; GRAHAM, G.C.; HENRY, R.J. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Reports*, New York, v.16, p.118-123, 1996.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version 2. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.1, p.19-22, 1983.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Avaliação da fidelidade genotípica por marcadores RAPDs de brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick, regeneradas *in vitro*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.3, p.449-454, 2003.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat database - 2006. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>>. Acesso em: 14 jul.2006.
- HEINZE, B.; SCHMIDT, J. Monitoring genetic fidelity vs. somaclonal variation in norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica*, Dordrecht, v.85, p.341-345, 1995.
- HWANG, S.C.; KO, W.A. Somaclonal variation of bananas and screening for resistance to *Fusarium* wilt. In: INTERNATIONAL WORKSHOP OF THE BANANA AND PLANTAIN BREEDING STRATEGIES, 21., 1986, Cairns, Australia. *Proceedings...* Canberra, Australia: Aciar, 1987. p.151-156.
- ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; LAHAV, E. Qualitative aspects of somaclonal variation in banana propagated by *in vitro* techniques. *Scientia Horticulturae*, v.48, n.1-2, p.71-88, 1991.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.60, p.197-214, 1981.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NGEZAHAYO, F.; GUO, W.; GONG, L. et al. Genomic variation in micropropagated Robinia ambigua ‘idahoensis’ revealed by RAPD markers. *HortScience*, Amsterdam v.41, p.1466-1468, 2006.
- OH, T.J.; CULLIS, M.A.; KUNERT, K. et al. Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.129, p.766-774, 2007.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., 1990, Amsterdam, The Netherlands. *Progress in plant cellular and molecular biology: Proceedings...* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990. p.131-141.
- RAY, T.; DUTTA, I.; SAHA, P. et al. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of Lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.85, n.1, p.11-21, 2006.
- REUVENI, O.; ISRAELI, Y.; ESHDAT, Y. et al. *Genetic variability of banana plants multiplied by in vitro techniques*. Final report submitted to IBPGR, (# PR3/11). Bet-Dagan, Israel: The Volcani Center, 1986. 36p.
- REUVENI, O. Methods of detecting somaclonal variants in Williams bananas. In: INTERNATIONAL WORKSHOP HELD AT LOS BANOS, 1988, Philippines. Identification of genetic diversity in the genus *Musa*: *Proceedings...* Rome: IBPGR Publications, 1990. p.108-113.
- ROCHA, P.S.G. da; SCHUCH, M.W.; BRAGA, E.J.B. Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pyrus communis*), cultivar ‘Seleta’. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.10, n.3, p.445-448, 2004.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-pc, version 2.10m*: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Setauket, New York: Exeter Software, 2000. CD-ROM.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- SCOWCROFT, W.R. *Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization*. Rome: IBPGR, 1984. 30p.
- TORRES, E.; IRIONDO, J.M.; PÉREZ, C. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. *American Journal of Botany*, St. Louis, v.90, n.1, p.85-92, 2003.
- VIERLING, R.A.; NGUYEN, H.T. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.84, p.835-838, 1992.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVK, K.J. et al. DNA Polymorphism amplified by arbitrary “primers” are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990. ■