

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MUTANTES DE BANANEIRA DA CV. TERRA POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Rosa Karla Nogueira Pestana¹; Edson Perito Amorim²; Cláudia Fortes Ferreira² e Sebastião de Oliveira e Silva²

¹ MSc. em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Rua Rui Barbosa s/nº CEP 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. E-mail: karlapestana6@yahoo.com.br.

² Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa s/nº CEP 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. E-mail: edson@cnpmf.embrapa.br.

INTRODUÇÃO

A técnica de indução de mutação por irradiação tem sido muito empregada em programas de melhoramento de plantas visando a seleção de mutantes com características agronômicas desejáveis. Os marcadores moleculares são importantes ferramentas para a detecção dos efeitos da radiação gama com precisão, uma vez que, com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético direto; ou seja, em nível de DNA. O maior interesse na aplicação dos marcadores genéticos no melhoramento vegetal é a perspectiva de estabelecer ligações entre os marcadores e os genes que controlam determinada característica (OLIVEIRA et al., 1996).

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é uma dentre muitas técnicas de *fingerprinting* baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que utiliza *primers* de seqüência simples repetitivas para amplificar regiões entre seqüências alvo. Essa técnica tem a capacidade de gerar um grande número de marcadores multiloci e pode ser aplicada para analisar praticamente qualquer organismo; mesmo aqueles para os quais se dispõe de pouca ou nenhuma informação genética prévia (ARCADE et al., 2000). O objetivo deste trabalho foi estimar a variabilidade genética entre mutantes de bananeira tipo Terra mediante a utilização de marcadores moleculares ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico foi extraído de 96 plantas de bananeira da cultivar Terra Maranhão, derivadas de meristemas que foram irradiados, no CENA/USP, com raios gama na dose de

20 Gy, utilizando o método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990). A avaliação da quantidade e qualidade do DNA foi efetuada mediante análise comparativa das amostras em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio, sendo as amostras diluídas em TE e padronizadas em 10 ng μL^{-1} . As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 15 μL , contendo: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl_2 1,5 mM, 100 μM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,4 μM de cada *primer* (10 primers ISSR foram utilizados de acordo com a Tabela 1), 20 ng de DNA genômico e 0,2 Unidade de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia Biotech, EUA).

As amplificações foram conduzidas em termociclador Perkin Elmer modelo 9700, de acordo com o seguinte programa: 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 s, 48°C por 40s, 72°C por 1 min; e extensão final 72°C por 2 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0%. A similaridade genética foi calculada a partir do coeficiente de Jaccard e o agrupamento realizado pelo método UPGMA por meio do software Mega4 (TAMURA et al., 2007). Foi calculado o valor de correlação cofenética entre a matriz de similaridades genéticas e a matriz dos valores cofenéticos, a fim de verificar a consistência do agrupamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dez primers ISSR utilizados (Tabela 1) possibilitaram a geração de 59 bandas, das quais 38 são polimórficas, com média de 5,9 bandas por primers. O maior número de bandas foi identificado para os *primers* TriTGA3'RC e TriCTC3'RC (8 bandas) e o menor para o *primer* DiGA3'RC (4 bandas).

Tabela 1. Iniciadores ISSR utilizados na amplificação de mutantes de bananeira Terra Maranhão, com suas respectivas seqüências, temperaturas de anelamento (T_a) e número total de bandas (NTB).

Primer	Seqüência ¹	T_a	NTB	Primer	Seqüência ¹	T_a	NTB
DiCA3'RG	(CA)8RG	48	6	TriTTG3'RC	(TTG)5RC	48	6
DiGA3'C	(GA) 8C	50	5	TriTGA3'RC	(TGA)5RC	48	8
DiGA3'RC	(GA)8RC	50	4	TriCAA3'RC	(CAA)5RC	48	5
TriAAG3'RC	(AAG)5RC	48	5	TriCTC3'RC	(CTC)5RC	48	8
TriTAG3'RC	(TAG)5RC	48	7	TriCGC3'RC	(CGC)5RC	48	5

Seqüência do primer ISSR¹: R: A, G; Y: C, T

O dendrograma das similaridades genéticas baseada em ISSR, obtido pelo método UPGMA, encontra-se na Figura 1. A similaridade genética, entre as 96 plantas irradiadas da

cultivar Terra Maranhão variou de 0,00 a 0,62, com média de 0,25 e coeficiente de correlação cofenético de 0,84. Os menores valores de dissimilaridade genética foram registrados entre as plantas irradiadas Terra 12, Terra 14, Terra 22, Terra 49, Terra 89 e a Terra 92 (0,00). A maior dissimilaridade genética foi observada entre a planta irradiada Terra 83 e a Terra 82 (0,62). Estes resultados indicam a existência de variabilidade genética entre as plantas irradiadas da cultivar Terra Maranhão que poderá ser explorada.

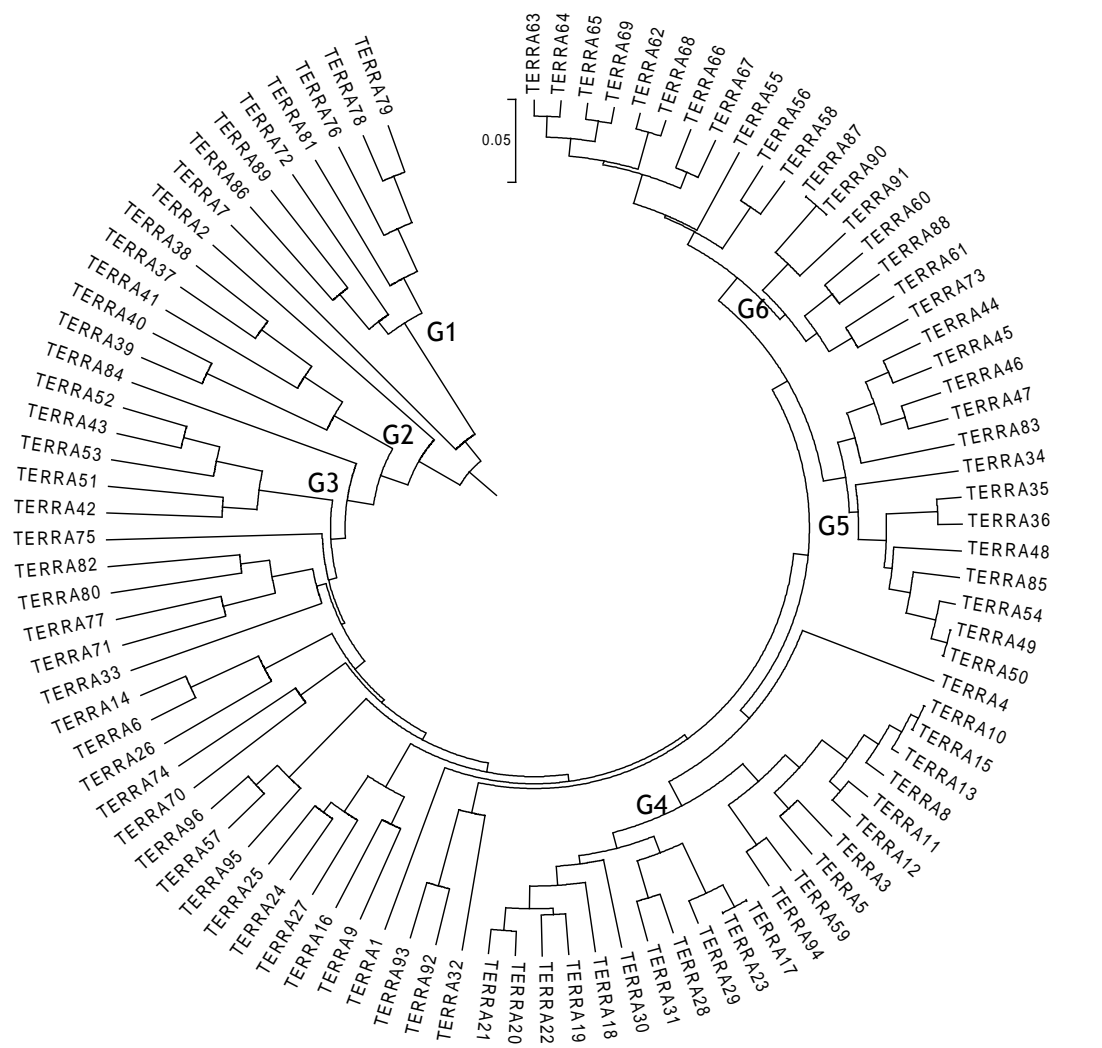


Figura 1 - Similaridade genética entre 96 plantas de bananeira irradiadas da cultivar Terra Maranhão obtida a partir de 10 marcadores moleculares ISSR. Cruz das Almas, 2010.

Adotando-se a dissimilaridade média (0,25) como ponto de corte no dendrograma, observou-se a formação de seis agrupamentos: o G1 formado por oito plantas mutantes, o G2 seis, o G3 vinte e nove, o G4 vinte e dois, o G5 oito e G6 vinte e três plantas mutantes (Figura 1).

Verificou-se variabilidade genética existente entre os mutantes de Terra Maranhão, o que permite inferir que a indução de mutação para a seleção de porte é uma técnica promissora, que pode auxiliar os programas de melhoramento genético da bananeira na busca de novas variedades com menor porte e boas características agronômicas.

CONCLUSÃO

Os marcadores ISSR são eficientes na detecção da variabilidade genética entre as plantas irradiadas da cultivar de bananeira Terra Maranhão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCADE, A. F.; ANSELIN, P.; FAIVRE, R. M. C.; LESAGE, L. E.; PRAT, D. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.100, p.299-307, 2000.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- OLIVEIRA, A.C.; RICHTER, T.; BENNETZEN, J. L. Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers. **Genome**, Canada, v.39, p.579-587, 1996.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.