

VARIABILIDADE GENÉTICA EM DIPLÓIDES MELHORADOS DE BANANEIRA POR MEIO DE MARCADORES SSR

Valquiria Martins Pereira¹, Larissa Santos Oliveira², Edson Perito Amorim³, Livia Pinto Brandão⁴, Cláudia Fortes Ferreira³, Sebastião de Oliveira e Silva⁵ e Carlos Alberto da Silva Ledo³

¹ Mestranda em Ciências Agrárias, UFRB. Cruz das Almas-BA. E-mail: vaumarpe@hotmail.com

² Graduação em Ciências Biológicas, UFRB. Cruz das Almas-BA. E-mail: lallahy@hotmail.com

³ Pesquisador(A): Dr.(A) Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas-BA. E-mail: edson@cnpmf.embrapa.br; claudiaf@cnpmf.embrapa.br; ledo@cnpmf.embrapa.br

⁴ Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, UFRB. Cruz das Almas-BA. E-mail: livbrandao@yahoo.com.br

⁵ Bolsista CNPq, Cruz das Almas-BA. E-mail: ssilva@cnpmf.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de bananeira baseia-se principalmente no desenvolvimento de híbridos tetraplóides derivados de cruzamentos entre alguns poucos cultivares triplóides férteis (genitor feminino) e diplóides melhorados (doador de pólen) (PILLAY, 2006). A busca de cultivares por meio da seleção dentro dos recursos genéticos existentes nas coleções de germoplasma representa a primeira abordagem, para a identificação de variedades resistentes. Mas nem sempre é possível encontrar os indivíduos desejados e nesse caso há necessidade de geração de novas cultivares por hibridação. Ambos os métodos são considerados eficientes para controle de pragas e doenças (SILVA et al., 2003).

Por essa razão, o desenvolvimento de diplóides melhorados é considerado um importante componente no melhoramento genético. Sendo assim, o melhoramento convencional se inicia com a hibridação e seleção de recombinantes em nível diplóide. Diplóides melhorados são então cruzados com cultivares triplóides, que apresentam fertilidade parcial, para produção de híbridos tetraplóides (SILVA et al., 1998).

Uma das estratégias para a solução dos problemas como as doenças, Sigatoka amarela e negra, ou ainda o mal-do-Panamá, é a criação de novas variedades. Esta tarefa, no entanto, é dificultada pela esterilidade constatada em alguns diplóides e triplóides e a falta de conhecimento do tipo de herança das resistências. As dificuldades resultantes da baixa e em alguns casos, ausência da produção de sementes em cruzamentos de bananeira, podem ser contornadas mediante a escolha adequada dos genitores. Com isso o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética entre 41 diplóides de bananeira utilizados pelo programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, por meio de marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*).

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 11 pares de iniciadores foi utilizado na análise genética, dentre eles, quatro pertencentes à série Ma, desenvolvida por Crouch et al. (1998), quatro pares da série AGMI desenvolvidos por Lagoda et al. (1998) e três da série MaOCEN obtidos por Creste et al. (2006) (Tabela 1). O DNA genômico foi extraído de folhas jovens, 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 água ultrapura e padronizadas em $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. As reações de amplificação dos SSRs foram completadas para o volume final de $13 \mu\text{L}$ contendo os seguintes reagentes: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl_2 2,5 mM, 100 μM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,2 μM de cada *primer*, 50 ng de DNA genômico e uma Unidade de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia Biotech, EUA). As amplificações foram conduzidas em termociclador Perkin Elmer, empregando-se o esquema de *touchdown*.

Os fragmentos foram separados em géis de agarose ultrapura 3,0% sob condições padrões e os produtos da amplificação corados com brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram avaliados como ausência (0) e presença (1). A dissimilaridade genética entre os 41 diplóides foi obtida a partir do coeficiente de Dice, GENES (Cruz, 2003). A matriz de dissimilaridade genética foi utilizada para fazer o agrupamento dos genótipos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*). O coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de dissimilaridade e a matriz de agrupamento foi calculada por meio do software GENES (Cruz, 2003) a fim de verificar a consistência dos agrupamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 41 diplóides melhorados (Figura 1) foram desenvolvidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e estão sendo usados pelo programa de melhoramento da bananeira. O número de alelos obtidos foi 40, com média de 3,63 alelos por iniciador. O maior número de alelos obtidos foi com o iniciador MaOCEN01 (6 alelos) e o menor número pelo iniciador AGMI 187/188 (2 alelos) (Tabela 1). O conteúdo de informações de polimorfismo (PIC), variou de 0,34 para o iniciador MaOCEN 13R-13F a 0,70 para o iniciador MaOCEN F-1R com média de 0,53 que reflete na capacidade informativa dos marcadores utilizados.

Tabela 1. Locos microssatélites SSR, seqüência repetida (F/R – foward/reverse), número de alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Cruz das Almas. 2010.

Locos SSR	Repetição(F/R)	Alelos	PIC
AGMI 187-188	gcaacttggcagcaittt/tgatggactcatgtgtacctactat	2	0,35
AGMI 125-126	ttaaaggtgggttagcattagg/tttgatgtcacaatggtgttcc	4	0,62
AGMI 125-126	tcccataagtgaatcctcagtt/ctccatccccaagtcataaag	3	0,52
AGMI 195-196	acttattccccgcactcaa/actctcgcccatcttcatcc	4	0,63
Ma 1-17	aggcggggaatcggtaga/ggcgggagacagatggagt	4	0,54
Ma 1-24	gagccattaagctgaaca/ccgacagtcaacatacaataca	3	0,36
Ma 1-27	tgaatccaagtgtgtcaag/caaaacactgtccccatctc	4	0,58
Ma 3-103	tgcctctcttagctctg/tgtggaggatctgagattg	4	0,62
MaOCEN F-1R	gaggctattcggtatgactg/tcgacaagaccggcttccatc	6	0,70
MaOCEN 3F-3R	tctcaggaagggaacaatc/ggaccaagggaagaaacc	3	0,55
MaOCEN 13R-13F	ggaggaaatggaggtaaca/tcgggataggaggaggag	3	0,34
Total		40	-
Média		3,63	0,53

A dissimilaridade genética média entre os diplóides de 0,49, variando de 0,10 entre os diplóides 042052-04 e 042015-02 a 0,88 para os genótipos 01304-06 e 086079-10. Enquanto Creste et al., (2004) ao avaliarem 49 acessos diplóides com SSR encontraram uma dissimilaridade média de 0,90. Essa discrepância provavelmente decorre da maior sensibilidade do gel de poliacrilamida utilizado por este grupo. O dendrograma baseado nos dados moleculares encontra-se na Figura 1. O valor cofenético foi alto ($r = 0,65$, $p < 0,0001$), valores $r \geq 0,56$ refletem em bom ajuste entre dados da matriz e do dendrograma (Vaz Patto et al., 2004).

Neste trabalho, assumiu-se como ponto de corte no dendrograma a dissimilaridade genética média entre todos os diplóides genotipados com microssatélites (0,49). Com base neste ponto de corte foram formados quatro grupos: (grupo 1) com sete diplóides: 9108701, SH3263, 103019-01, 86079-10, 28003-01, 42079-06, 1016-01; (grupo 2) com vinte e dois diplóides: TH0301, 13018-01, 86094-20, 73041-01, 3004-02, 42049-05, 89087-01, 42023-03, 41054-01, 91079-03, 1304-06, 1304-04, 32023-03, 91094-04, 42079-13, 86079-12, 3037-02, 17041-01, 58054-03, 42049-04, 42023-06, 73041-03; (grupo 3) com oito diplóides, 42085-02, 86094-15, 86094-20, 41054-08, 42052-03, 42052-04, 42015-02, 41054-06 e o (grupo 4) com quatro diplóides: 86094-05, 86079-09, 91087-02 e 87079-01. Em todos os grupos formados há variabilidade suficiente que pode ser utilizados pelos programas de melhoramento genético da Embrapa.

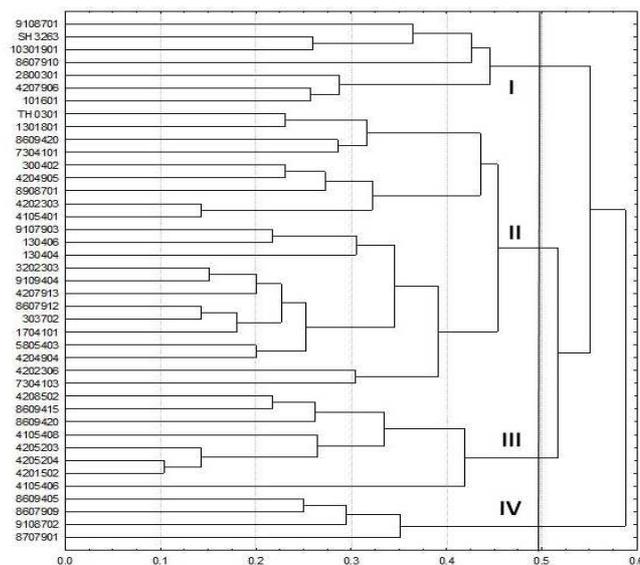


FIGURA 1. Dendrograma construído a partir de 41 diplóides de bananeira utilizando-se 40 bandas polimórficas provenientes dos marcadores do tipo SSR. Os diplóides foram agrupados por meio do método do UPGMA. Cruz das Almas, 2010.

CONCLUSÃO

Existe uma ampla variabilidade genética entre os acessos diplóides de bananeira, estimados por meio de 11 pares de *primers*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; VENCOVSKY, R.; SILVA, S. de O.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity of Musa diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.51, p.723-733, 2004.
- Cruz CD (2003) Programa Genes, Versão Windows (2003.0.0). UFV, Viçosa, Brasil.
- CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. GQMOL – Aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos: versão 2.1. Viçosa: UFV, 2004.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.
- FAO. **Food and agriculture organization of the United Nations**. Acessado em: 31/03/2010. Disponível em <faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>.
- PILLAY, M.; NWAKANMA, D.C.; TENKOUANO, A. Identification de RAPD markers linked to A and B genome sequences in Musa L. *Genome*, Ottawa, v. 43, n. 5, p. 763-767, 2000.
- SILVA, S.O.; GASPAROTTO, L.; MATOS, A.P.; CORDEIRO, Z.J.M.; FERREIRA, C.F.; RAMOS, M.M.; JESUS, O.N. Banana Breeding Program in Brazil - Recent Results. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 39p.
- VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, v.137, p.63-72, 2004.