



DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE BANANERA POR MEIO DE MARCADORES SSR.

RAFAELLA DE LIMA ROQUE¹; TAMYRES BARBOSA DO AMORIM²; YSLAI SILVA PEIXOUTO¹;
CLÁUDIA FORTES FERREIRA³; EDSON PERITO AMORIM³; CARLOS ALBERTO DA SILVA
LEDO³

INTRODUÇÃO

A cultura da banana tem uma elevada importância econômica e social em todo o mundo. Constitui o quarto produto alimentar mais produzido no planeta, precedido pelo arroz, trigo e milho, e em muitos países é a principal fonte de arrecadação e geradora de emprego e renda para uma parte expressiva da população (VIEIRA, 2009).

O uso de marcadores moleculares pode fornecer informações úteis para o melhorista de plantas, entre eles: escolha de genitores que produzam indivíduos com a combinação de alelos favoráveis, e a quantificação da variabilidade genética existente no germoplasma em uso pelo programa de melhoramento. Assim, essas técnicas cooperam significativamente para o conhecimento básico da cultura, do caráter estudado, e para a geração e desenvolvimento de genótipos melhorados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre os marcadores existentes, os microssatélites têm sido considerados os ideais para a caracterização e avaliação da variabilidade genética em *Musa*, pois são co-dominantes, multialélicos, reprodutíveis e amplificados via PCR (GRAPIN et al., 1998).

Desta forma objetivou-se com esse trabalho estimar a variabilidade genética entre 22 genótipos de bananeira, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas – BA. Na avaliação de polimorfismo foram usados 22 genótipos de bananeira (Pacovan Ken, Pacovan, Tropical, Garantida, Enxerto, Japira, Bucaneiro, Princesa, Caipira, FHIA 17, YB4217, Preciosa, YB4203, YB4247, FHIA 23, Maravilha, PA9401, Calipso, Grande Naine, FHIA 18, Prata Anã, Maçã), empregando oito primers microssatélites (Simple Sequene Repeat - SSR). O DNA genômico foi extraído de folhas jovens, com uso do método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). A avaliação da quantidade e da qualidade do DNA foi realizada pela

¹ Bióloga., estudante de pós-graduação, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-BA, e-mail: rafaella_roque@hotmail.com

² Eng. Agr., estudante de graduação, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-BA, e-mail: tamyufrb@yahoo.com.br

³ Eng. Agr., pesquisador Embrapa Mandioca e Fruticultura-BA, e-mail: claudiaf@cnpmf.embrapa.br

análise comparativa das amostras em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, e as amostras foram diluídas em TE e padronizadas em 4 ng μL^{-1} .

As reações de amplificação via PCR foram completadas para o volume final de 15 μL , contendo: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 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, modelo 9700, utilizando-se temperatura de anelamento específica para cada primer. A condição de amplificação incluiu um ciclo de desnaturação de 3min a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação de 40 s a 94°C, 40 s de anelamento com a temperatura específica de cada primer, 1 min de extensão a 72°C, finalizando com uma extensão final de 4 min a 72°C (Tabela 1).

Tabela 1 - Locos microssatélites (SSR), iniciadores, tamanho esperado do alelo em pares de bases (pb), temperatura de anelamento (TA) de todos os iniciadores utilizados no estudo, referência dos iniciadores.

LOCO SSR	Primer 5'-3'	ALELOS (PB)	TA	Referência
CNPMF5	F: CCCTGACAGATCCTTTGTGG R: GGAGACTTCCACCTTTTCCG	250	56°	Amorim et al. (2012)
MASR166	F: CGAGTCCGAAGTCGCTTCTA R: TTGAGCTTGTGCCTCCTTT	138	56°	Sem referência
MASR 160	F: ATAAGGGGAGAGAGAAGCCG R: TAGCAAAATCATTGCTTGCG	327	56°	Sem referência
MaOCEN 1	F: TCTCAGGAAGGGCAACAATC R: GGACCAAAGGGAAAGAAACC	244	59°	Creste et al. (2006)
MASR 149	F: TCGTCAGGTCTGTATGCGAG R: GGACCAAAGGGAAAGAAACC	143	59°	Sem referência
Ma 1/24	F: GAGCCCATTAAGCTGAACA R: CCGACAGTCAACATACAATACA	172	60°	Crouch et al. (1998)
AGMI 101/102	F: TGCAGTTGACAAACCCACACA TTGGGAAGGAAAATAAGAAGATAGA	189	54°	Lagoda et al. (1998)
AGMI 103/104	F: ACAGAATCGCTAACCTAATCCTCA R: CCCTTTGCGTGCCCTAA	181	59°	Lagoda et al (1998)

Após a amplificação, os produtos foram separados em gel de agarose ultrapura Invitrogen a 3%, corados com brometo de etídio (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador Ludwig 50pb (Ludwig Biotecnologia LTDA).

Para a estimativa das frequências alélicas, Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e número de alelos por loco (A), utilizou-se o programa PowerMarker versão 3.25 (LIU; MUSE, 2005). A genotipagem foi realizada com base no número de pares de base do fragmento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de microssatélites, todos os primers utilizados no estudo apresentaram polimorfismo, sendo que o número de alelos obtidos foram 19, com média de 2,4 por primer. Como observado na Tabela 2, o maior número de alelos foi identificado nos primers Ma 1/24 e MaOCEN 1, apresentando 4 e 3 alelos respectivamente, o restante dos primers apresentaram 2

alelos. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,23 (MASR 160) a 0,55 (MaOCEN 1).

Tabela 2. Locos microssatélites SSR, frequência alélica, número de alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

LOCO SSR	FREQ. ALÉLICA	Nº DE ALELOS	PIC
CNPMF5	0,6590	2	0,3484
MASR166	0,5454	2	0,3729
MASR 160	0,8409	2	0,2317
MaOCEN 1	0,4090	3	0,5540
MASR 149	0,6818	2	0,3397
Ma 1/24	0,6363	4	0,4319
AGMI 101/102	0,5454	2	0,3729
AGMI 103/104	0,6818	2	0,33975
Mean	0,625	2,375	0,37394

O dendrograma das similaridades genéticas baseada em SSR, obtido pelo método UPGMA, encontra-se abaixo na Figura 1.

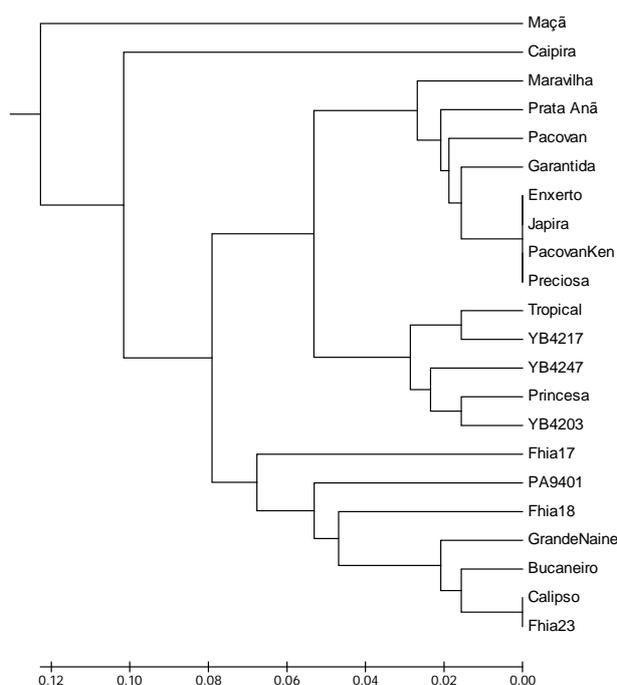


Figura 1 - Similaridade genética entre 21 genótipos de bananeira, obtida a partir do método UPGMA pelo índice de diversidade de Nei 1973.

A partir do dendrograma foi possível observar o agrupamento dos genótipos tipo prata, como: Maravilha, Prata Anã, Pacovan, Garantida, Enxerto, Japira, Pacovan Ken, Preciosa com exceção, da FHIA 18 e PA9401 que se agruparam separadamente. As variedades com código YB, Tropical e Princesa são oriundos de Yangambi Km 5 e possuem os mesmos parentais (Yangambi nº2 e o diploide M53), fato que justifica a união no dendrograma.

Os tetraploides Bucaneiro e Calipso estabeleceram o último agrupamento estes, se agruparam em virtude do seu alto grau de parentesco, uma vez que são híbridos com o mesmo parental feminino (Highgate), junto a esse grupo encontra-se FHIA 23, esse fato se justifica uma vez que todas integram o subgrupo Gros Michel.

Os resultados apontaram um alto polimorfismo, a existência dessa variabilidade genética poderá ser explorada na escolha de genitores em cruzamentos visando à obtenção de variedades cada vez mais resistentes a doenças.

CONCLUSÃO

Os marcadores SSR são eficientes para agrupar genótipos de acordo com sua genealogia. Além disso, existe variabilidade genética entre os genótipos avaliados, fato que permite o melhoramento genético e o desenvolvimento de novas cultivares por meio da hibridação com diploides.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, E.P.; SILVA, P.H.; FERREIRA, C.F. New microsatellite markers for bananas (*Musa* spp). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n.2, p. 1093-1098, 2012.
- CRESTE, S.; BENATTI, T.; ORSI, M.R.; RISTERUCCI, A.M.; FIGUEIRA, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n.2, p.303-306, 2006.
- CROUCH, H.K.; CROUCH, J.H.; JARRET, R.L. et al. Segregation at microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. **Crop Science**, Madison, v.38, n.1, p.211-217, 1998.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília: **EMBRAPA – CENARGEN**, p. 220, 1998.
- GRAPIN, A.; NOYER, J. L; CARREEL, F. ; DAMBIER, D.; BAURENS, F.C; LANAUD, C.; LAGODA, P.J.L. Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellite site. **Electrophoresis**, v.19, p.1374 -1380, 1998.
- LAGODA, P.J.L.; NOYER, J.L.; DAMBIER, D.; BAURENS, F.C.; GRAPIN, A.; LANAUD, C. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, n.5, p.657-666, 1998.
- LIU, K.; MUSE, S. V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, v.21, p. 2128 – 2129, 2005.
- VIEIRA, L. M. Banana. Epagri/Cepas. **Centro de Sociedade e Planejamento Agrícola**. 2009