

USO DE MICROSSATELITES NA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA DE MUDAS REGENERADAS DE SUSPENSÃO CELULAR DE BANANEIRA ‘GRANDE NAINE’

Lucymeire S. Morais-Lino¹, Vanusia Batista de Oliveira Amorim¹, Edson Perito Amorim², Sebastião de O. e Silva², Janay A. da Santos-Serejo², José Raniere Ferreira de Santana³

¹ Bolsista de Pós-doutorado (CAPES). Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa, CP 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, e-mail: lsmorais@yahoo.com.br; ²Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa, CP 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, Bahia. e-mail: edson@cnpmf.embrapa.br, janay@cnpmf.embrapa.br, ssilva@cnpmf.embrapa.br; ³Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Universitária, Km 03 BR116, Campus Universitário, CEP: 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil., raniere@uefs.br.

INTRODUÇÃO

Embriogênese Somáticas é freqüentemente considerada como o melhor sistema para a propagação de genótipos superiores principalmente porque, tanto parte aérea e como radicular estão presentes em embriões somáticos. Células em suspensão é usada basicamente em trabalhos de engenharia genética (Ghosh et al., 2009), podendo também ser empregado na propagação em larga escala de plantas, na produção de sementes sintéticas (Ganapathi et al., 2001), na criopreservação. A micropropagação através da cultura de células em suspensão e embriogênese somática é uma das técnicas mais promissoras para a obtenção de grandes quantidades de mudas qualificadas com baixos custos de produção (Matsumoto & Silva Neto, 2003). Poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de se estudar a estabilidade genética das plantas geradas nesse processo com a cultura da bananeira.

Os Microsatélites podem servir como marcadores altamente sensíveis para monitorar a variação genética sinalizando o potencial deletério de mutações durante o cultivo in vitro. Microsatélites consistem de repetições em tandem de curta seqüência (2-8). Palombi & Damiano (2002) relataram pela primeira vez o uso de marcadores SSR sendo utilizadas para investigar variação genética em plantas micropropagadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade genética em mudas de bananeira ‘Grande naine’ regeneradas a partir de suspensão celular utilizando marcadores microsatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Suspensão celular de bananeira 'Grande naine' foi regenerada em meios de cultura MS com cinco combinações diferentes de BAP e AIA (0,2 e 0,1 mg L⁻¹; 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; 0,6 e 0,5 mg L⁻¹; 0,8 e 0,7 mg L⁻¹; 0,0 e 0,0 mg L⁻¹), as plantas regeneradas foram aclimatizadas e uma amostragem de 18 plantas de cada tratamento foi utilizada para a extração do DNA genômico, utilizando o método CTAB. A quantidade e qualidade do DNA foi determinado pela análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, com posterior ajuste das amostras para uma concentração de 10 ng/μL. As reações de amplificação via SSR foram completadas com água ultrapura para o volume final de 15 μl contendo: 1,5 mM MgCl₂, 100 μM de cada uma dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,2 μM de cada iniciador SSR (MaOCEN 10, Ma 1-27, Ma 1-17, Mb1-69, Mb 1-100, AGMI 67/68, CNPMF01, CNPMF 08, CNPMF 09, CNPMF 10, CNPMF 43), 1 U de Taq polymerase, tampão 10x e 30 ng de DNA genômico.

As amplificações foram conduzidas em termociclador BIO-RAD, utilizando-se o esquema de "touchdown" com ciclo inicial de 4 min a 94°C, seguido de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, reduzindo-se um grau a cada ciclo, 1 min a 72 °C, num total de 10 ciclos, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 45°C e 1 min a 72° C.

O produto das amplificações de SSR foram aplicados em gel agarose ultrapura 2,5%. Os resultados foram capturados sistema fotográfico digital Kodak. Os dados foram analisados observando as amplificações de SSR que reproduziram bandas no tamanho de 50 pb.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primers utilizados apresentam bandas monomórficas. Os fragmentos Microsatélites gerados variaram em tamanho de 50 pb. Dois exemplos de perfis SSR são mostrados na figura 1 e 2. Todas as bandas observadas em agarose para SSR foi classificada como presente. Todas as plantas regeneradas a partir de suspensão celular, independente do meio de cultura utilizado podem ser consideradas como plantas geneticamente normais.

Marcadores microsatelites de DNA foi utilizado na detecção de variação somaclonal em plantas micropropagadas de *P. tremuloides*, utilizando como fonte de explante gemas vegetativas, embora sejam tecidos meristemáticos organizados (Rahman & Rajora, 2001). Shchukin et al. (1997) relataram que a taxa de variação somaclonal foi maior em plantas regeneradas da cultura de ápices da cv. Grande Naine (5,3%) quando comparados àquelas derivados de embriogênese somática (0,5 e 3,6%). Observa-se com os resultados obtidos

que este método de regeneração de plantas pode ser eficiente para obtenção de mudas de bananeira em larga escala sem variação somaclonal.

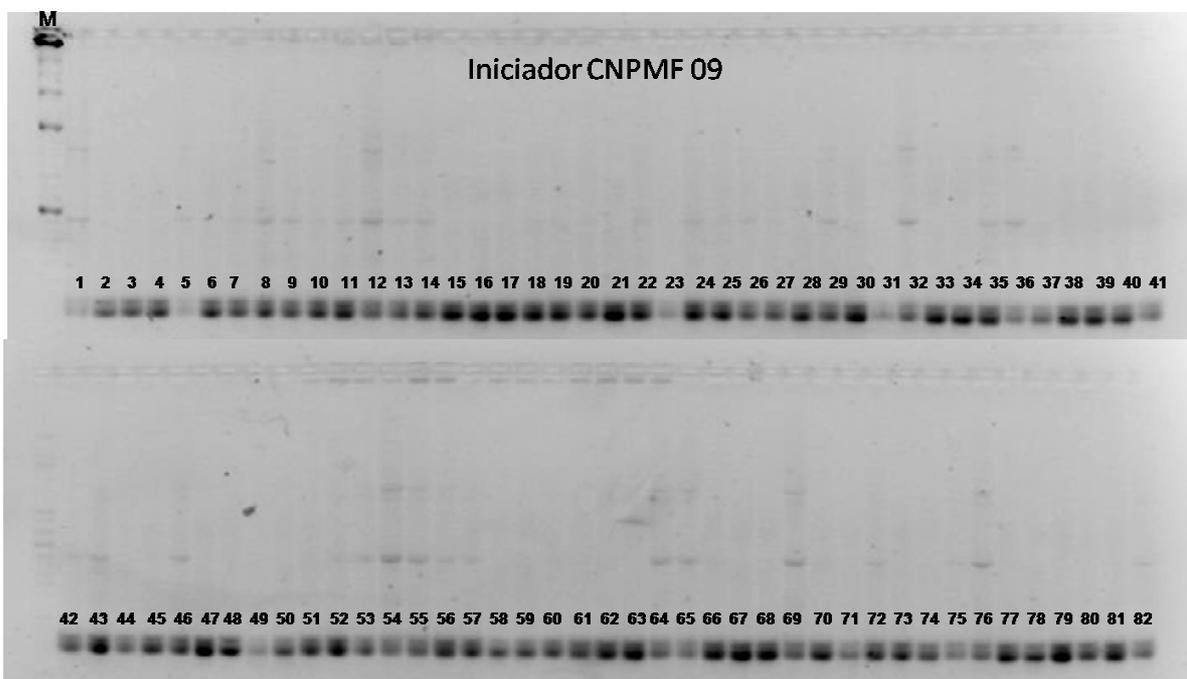


Figura 1- Perfil SSR de diferentes plantas regeneradas de células em suspensão de bananeira 'Grande naine' gerados pelos iniciadores CNPMF 9. A letra M representa o tamanho do marcador molecular utilizado (50pb). Amostras de 1 – 18, 19 – 36, 42- 59, 60 – 77 correspondem a 18 plantas de cada tratamento de BAP e AIA (0,2 e 0,1 mg L⁻¹; 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; 0,6 e 0,5 mg L⁻¹; 0,8 e 0,7 mg L⁻¹; 0,0 e 0,0 mg L⁻¹, respectivamente) utilizado no meio de cultura de regeneração, 37 – 41 e 78 – 82 correspondem as plantas utilizadas como testemunha regenerada em meio de cultura desprovido de BAP e AIA.

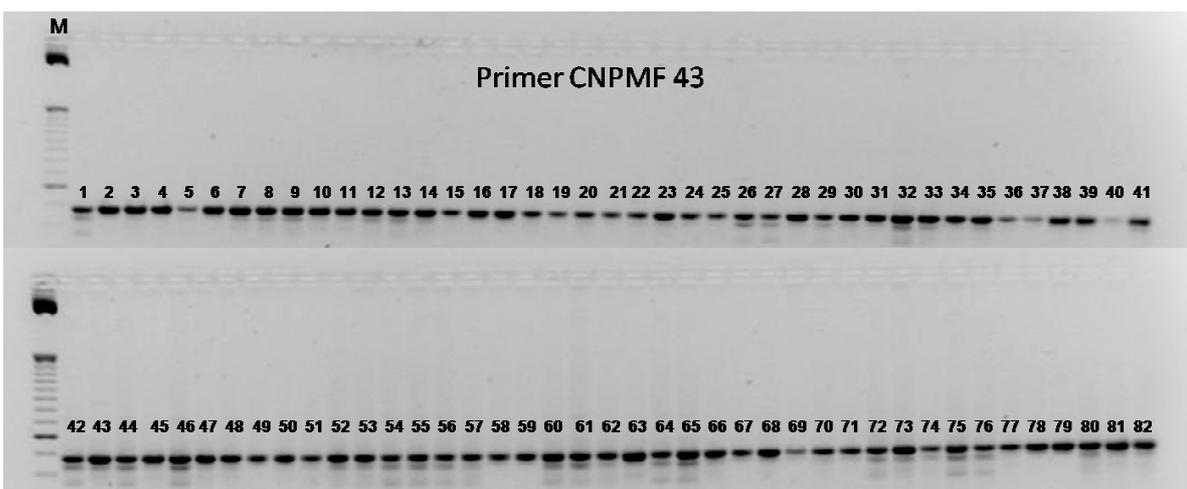


Figura 2- Perfil SSR de diferentes plantas regeneradas de células em suspensão de bananeira 'Grande naine' gerados pelos iniciadores CNPMF 43. A letra M representa o tamanho do marcador molecular utilizado (50pb). Amostras de 1 – 18, 19 – 36, 42- 59, 60 – 77 correspondem a 18 plantas de cada tratamento de BAP e AIA (0,2 e 0,1 mg L⁻¹; 0,4 e 0,3 mg L⁻¹; 0,6 e 0,5 mg L⁻¹; 0,8 e 0,7 mg L⁻¹; 0,0 e 0,0 mg L⁻¹, respectivamente) utilizado no meio de cultura de regeneração, 37 – 41 e 78 – 82 correspondem as plantas utilizadas como testemunha regenerada em meio de cultura desprovido de BAP e AIA.

CONCLUSÕES

O uso de suspensão celular pode ser utilizado como método de propagação clonal de bananeira.

Marcadores microssatélites são úteis e sensíveis para determinação da fidelidade genética e variação somaclonal de plantas de bananeira 'Grande naine' regeneradas de suspensão celular

REFERÊNCIAS

GHOSH, A.; GANAPATHI, T. R.; NATH, P.; BAPAT, V. A. Establishment of embryogenic cell suspension cultures and Agrobacterium-mediated transformation in an important Cavendish banana cv. Robusta (AAA) **Plant Cell Tiss Organ Cult.** v.97, p.131–139, 2009.

GANAPATHI, T. R.; SRINIVAS, L.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana CV. rasthall (MUSA SPP. AAB Group). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.** v.37, p.178-181, 2001.

PALOMB, I. M. A. ; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev) **Plant Cell Rep.** v. 20, p.1061–1066, 2002.

MATSUMOTO, K.; SILVA NETO, S. P. **Micropropagation of bananas.** In: S. Mohan Jain; Katsuaki Ishii. (Org.). *Micropropagation of Woody Trees and Fruits.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003, p. 353-380.

RAHMAN, M. H.; RAJORA, O. P. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). **Plant Cell Rep.**, v.20, 531–536. 2001.

SHCHUKIN, A.; BEN-BASSAT, D.; ISRAELI, Y. Plant regeneration via somatic embryogenesis in Grand Naine banana and its effect on somaclonal variation. **Acta Hort.** v.447, p.317–318, 1997.