

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE BANANEIRA
USANDO MARCADORES SCAR E MICROSSATÉLITES DE
BIBLIOTECAS ORIUNDAS DE DIPLOIDE SELVAGEM CALCUTTA 4 E DA
CULTIVAR OURO

Patrícia Reis de Oliveira Silva

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
OUTUBRO/2014

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE BANANEIRA USANDO
MARCADORES SCAR E MICROSSATÉLITES DE BIBLIOTECAS ORIUNDAS DE
DIPLOIDE SELVAGEM CALCUTTA 4 E DA CULTIVAR OURO

PATRÍCIA REIS DE OLIVEIRA SILVA

Bióloga
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof^a Dra Claudia Fortes Ferreira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS, BAHIA, 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

S586c	<p>Silva, Patricia Reis de Oliveira. Caracterização molecular de acessos de bananeira usando marcadores scar e microssatélites de bibliotecas oriundas de diplóide selvagem calcutta 4 e da cultivar ouro / Patricia Reis de Oliveira Silva._ Cruz das Almas, BA, 2014. 70f.; il.</p> <p>Orientadora: Claudia Fortes Ferreira.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Banana – Cultura. 2.Banana – Variabilidade genética. 3.Marcadores genéticos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 634.772</p>
-------	--

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
PATRICIA REIS DE OLIVEIRA SILVA**



Prof.ª. Dr.ª. Cláudia Fortes Ferreira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)



Dr.ª. Karina Peres Gramacho
Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira



Dr. Rogério Mercês Ferreira dos Santos
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em.....Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

A Deus;
À minha família,

Aos meus pais Ana Lucia e Gerson Queiroz dedico mais uma graça alcançada, assim como eles dedicaram seu amor durante suas vidas.

Dedico

Ofereço a minha família, pois diante de nossa historia de 'vida' somente nos sabemos o valor de cada vitória, não somos apenas uma família, o que já seria mais do que o suficiente, me orgulho em dizer que somos uma equipe, sempre lado a lado , apoiando, brigando, aconselhando e amando.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido força para sempre persistir em meus objetivos;

Àos meus pais, Ana Lucia Reis e Gerson Queiroz por todo o amor e ensinamento a mim doado, pois foram estes que me deram entendimento para tratar todas minhas obrigações com seriedade e compromisso.

Àos meus irmãos pelos muitos momentos de carinho, pois são estes que me motivam a sempre fazer o melhor. Agradeço em especial a minha irmã Mara Reis pelo companheirismo;

À minha orientadora Prof^a. Dra Cláudia Fortes Ferreira, pela confiança e pelo conhecimento a mim concedido;

Àos meus co-orientadores, Dr. Onildo Nunes de Jesus e Prof. Dr. Edson Perito Amorim, pela orientação e apoio em todas as etapas do trabalho;

Àos meus amigos, por todo apoio e carinho, em especial a Flavio Amorim e Cátia Dias que participaram diretamente deste projeto;

À todos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa, onde tive a oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela colaboração, amizade e alegria;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), pelo apoio institucional, **Fapesb e Capes** pela concessão da bolsa de estudos;

À EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, por ter disponibilizado toda a infraestrutura necessária na realização do trabalho;

À FAPESB que financiou o desenvolvimento do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....1

CAPÍTULO 1.....12

AVALIAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES DE BIBLIOTECAS ORIUNDAS DE
DIPLOIDE SELVAGEM DE BANANEIRA CALCUTTA 4 E DA CULTIVAR
OURO.....12

CAPÍTULO 2.....45

SCREENING DE ACESSOS DO BAG-BANANEIRA DA EMBRAPA MANDIOCA E
FRUTICULTURA POR MEIO DE MARCADORES SCAR (*SEQUENCE
CHARACTERIZED AMPLIFIED FRAGMENT*).....45

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....66

ANEXOS.....67

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE BANANEIRA USANDO MARCADORES SCAR E MICROSSATÉLITES DE BIBLIOTECAS ORIUNDAS DE DIPLOIDE SELVAGEM DE BANANEIRA CALCUTTA 4 E DA CULTIVAR OURO

Autora: Patrícia Reis de Oliveira Silva

Orientador(a): Prof^a. Dra. Cláudia Fortes Ferreira

Coorientador(a): Prof. Dr. Edson Perito Amorim

Coorientador(a): Dr. Onildo Nunes de Jesus

RESUMO: A banana é uma fruta consumida mundialmente e a segunda fruta mais consumida no Brasil, perdendo apenas para a laranja. Em relação ao seu papel social, a cultura é explorada principalmente por pequenos produtores, o que permite a fixação de mão-de-obra no campo. No entanto, a cultura da bananeira sofre com diversos problemas fitossanitários, que limitam sua produtividade. Para atenuar tal entrave, uma alternativa viável é a obtenção de cultivares resistentes, que podem ser obtidos em programas de melhoramento genético. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o poder discriminatório de locos microssatélites, estimar a diversidade genética entre 30 acessos representativos da diversidade genética da bananeira pertencentes ao Banco de Germoplasma de Bananeira (BAG-Bananeira) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, além de identificar possíveis acessos com resistência à Foc raça tropical 4 (Foc RT 4) e com porte reduzido, usando marcadores SCAR. Foram testados inicialmente 134 microssatélites oriundos das bibliotecas provenientes do diploide selvagem Calcutta 4 e da cultivar Ouro, dos quais foram selecionados 44 locos. A análise de diversidade entre os acessos foi realizada em dois experimentos. No primeiro experimento foi realizada uma análise interpretando os microssatélites como dominantes, o qual mostrou que os acessos agruparam-se de acordo com suas ploidias. A média dos valores de PIC para esse experimento foi 0,24. O segundo experimento interpretou os marcadores como codominantes, utilizando 14 acessos diploides, sendo possível verificar a formação de dois grupos distintos. No primeiro grupo estavam presentes os acessos de genoma AA e no segundo grupo os acessos de genoma BB. A média do PIC encontrado foi de 0,614. No experimento com marcadores SCAR, foram utilizados dois marcadores na identificação de possíveis acessos resistentes a Foc RT 4. O *primer* Sca U1001, exibiu potencial de uso, uma vez que conseguiu discriminar os possíveis acessos resistentes e suscetíveis, usados na formação de uma “*core collection*” preventiva de acessos resistentes a Foc RT 4. No entanto, a amplificação do *primer* Sca S0901 revelou um *primer* com 90 % de monomorfismo. Assim sendo, não foi possível distinguir os acessos resistentes dos suscetíveis. Utilizando o marcador SCAR *dw1/dw2* ligado ao porte baixo – nanismo - da bananeira, não foi possível obter perfis eletroforéticos satisfatórios. Desta forma, os dois últimos marcadores citados, não apresentaram potencial para os referidos estudos. Os marcadores microssatélites poderão ser amplamente utilizados em estudo de diversidade genética em acessos de *Musa* spp., bem como os *locos* oriundos das duas

bibliotecas estudadas, deverão ser utilizados igualmente, pois mostram-se semelhantes quanto a capacidade de caracterizar acessos de bananeira.

Palavras chave: “*core collection*”, resistência, variabilidade.

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BANANA ACCESSIONS USING
SCAR MARKERS AND MICROSATELLITE MARKERS FROM LIBRARIES
FROM THE WILD DIPLOID CALCUTTA 4 AND OURO CULTIVAR**

Author: Patrícia Reis de Oliveira Silva

Advisor: Prof^a. Dra Cláudia Fortes Ferreira

Co-advisor: Prof. Dr. Edson Perito Amorim

Co-advisor: Dr. Onildo Nunes de Jesus

ABSTRACT: Bananas are fruits consumed worldwide and the second most consumed fruit in Brazil, only behind oranges. As to its social role, this crop is mainly explored by small farmers, which allows the establishment of man labor in the field. However, this crop is attacked by many phytosanitary problems which limits its productivity. In order to minimize these problems, a viable alternative is obtainment of resistant cultivars through genetic breeding programs. The objective of the present work was to evaluate the discriminatory power of microsatellite locos, estimate the genetic diversity of 30 accessions representative of the genetic diversity in bananas belonging to the Banana Germplasm Bank (BGB) at Embrapa Cassava and Fruits, as well as identify possible accessions with resistance to Foc tropical race 4 (Foc TR 4) and with short height using SCAR markers. Initially 134 microsatellites from the wild diploid Calcutta 4 and Ouro libraries were tested and 44 locos selected. The diversity analysis between accessions was carried out in two experiments. In the first experiment the microsatellite markers were interpreted as dominant markers and accessions were grouped according to their ploidy level. The average PIC value for this experiment was 0.24. In the second experiment, the markers were interpreted as codominant using 14 diploid accessions and two groups were formed. The first group comprised of accessions with AA genomes, while the second, accessions with the BB genome. The average PIC value was 0.614. In the experiment with SCAR markers, two markers were used in the identification of possible accessions with resistance to Foc TR 4. Primer Sca U1001 was able to discriminate possible resistant from susceptible accessions, used in the development of a preventive “core collection” with possible resistance to Foc TR 4. However, amplification with primer Sca S0901 was monomorphic in almost 90 % of the accessions. Therefore, it was not possible to distinguish the accessions with possible resistance from susceptible ones. Using SCAR marker dw1/dw2 linked to dwarfism in bananas, it was not possible to obtain satisfactory electrophoretic profiles. Therefore, the latter two markers did not show potential for use in this work. The microsatellite markers can be broadly used in genetic diversity studies in *Musa* spp., as well as the locos originated from the libraries studied, may be equally used since they were equally similar in their capacity to characterize banana accessions.

Key words: “*core collection*”, resistance, variability.

INTRODUÇÃO

Musa spp. tem como centro de origem o continente asiático e oeste do Pacífico, sendo introduzida na África Oriental, África Ocidental, Américas e ilhas do pacífico (CHAMPION, 1967). A bananeira é cultivada em uma extensa área que abrange desde os trópicos aos subtropicais (VALMAYOR et al., 2001), estando presente em mais de 130 países (FAO, 2014).

A bananeira é uma monocotiledônea que pertence à família Musaceae. Esta família é composta por três subfamílias: Heliconioideae, Strelitzioideae e Musoideae. Dentro da subfamília Musoideae, encontram-se os gêneros *Musa*, que originou-se dos cruzamentos entre *Musa acuminata* colla (genoma A) e *M. balbisiana* colla (genoma B) e apresenta por isso, características das duas espécies, que produzem frutos comestíveis e de interesse tecnológico, onde os grupos genômicos possuem representantes das seções *Musa* e *Callimusa* (SIMMONDS & SHEPHERD, 1955; HÄKKINEN, 2013).

A bananicultura possui grande relevância econômica no cenário mundial, pois é cultivada em uma extensa região no mundo, quase sempre por pequenos agricultores. A banana é fruta consumida universalmente e possui caráter social relevante por ser uma fruta popular, apreciada por pessoas de todas as classes sociais (MOREIRA, 1999). Além disso, o cultivo gera cerca de um (01) emprego direto e quatro empregos indiretos para cada três hectares cultivados, em decorrência do nível tecnológico adotado no processo produtivo (ALVES, 1991).

As principais áreas produtoras localizam-se em regiões carentes. Sendo assim, a bananicultura é uma alternativa de geração de renda, justificando a aquisição de conhecimento e transmissão de informações que possam melhorar as qualidades de cultivo (ALVES, 1991). A maioria das lavouras apresenta baixa produtividade, principalmente em decorrência da ação de pragas e doenças (SILVA et al., 2002). É importante que haja uma ação preventiva para garantir boas condições fitossanitárias da cultura, agregando qualidade ao produto e tornando-o mais competitivo no mercado.

Existem diversas doenças e pragas que acometem e dificultam seu cultivo, a citar a: Sigatoka-amarela e negra, moko, nematóides, broca e o mal-do-Panamá, além da eminente ameaça de introdução de *Fusarium* RT 4 que causa a

fusariose da bananeira ou mal-do-Panamá, que pode causar sérios prejuízos à bananicultura nacional (ALVES, 1999). O mal-do-Panamá, causado pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) (Foc), é uma das principais doenças que atacam esta cultura. Este fungo distribui-se nas mais diversas condições edafoclimáticas, causando prejuízos de até 100% aos bananicultores por seu alto potencial destrutivo (BORGES et al., 2007). No entanto, existe a possibilidade de obtenção de híbridos que reúnam características de resistência às pragas e doenças, associadas a um porte adequado e boa aceitação comercial mediante o melhoramento genético (ALVES, 1999; PUA & LEE.,2003).

As atividades de melhoramento genético da bananeira no Brasil tiveram início na Embrapa Mandioca e Fruticultura em 1983, com a coleta de germoplasma em nível nacional e internacional (DANTAS et al.,1993). Com isso, foi criando o Banco de Germoplasma de Bananeira, constituído de 283 acessos, dos quais 87 % são cultivares e 13 % espécies selvagens (SILVA & SHEPHERD, 1991, CARVALHO et al., 1996; SILVA et al.,1997).

O programa de melhoramento genético da bananeira baseia-se especialmente no desenvolvimento de híbridos tetraploides provenientes de cruzamentos entre cultivares triploides férteis (genitor feminino) e diploides melhorados (doador de pólen). As formas selvagens das espécies e subespécies diploides de *M. acuminata* concentram a maior variabilidade genética e são usadas como genitores masculinos no melhoramento, pois contribuem com genes responsáveis por caracteres de interesse agrônômico (OSELEBE et al., 2006).

Existem três níveis cromossômicos distintos para as cultivares da bananeira: diploide (2n), triploide (3n) e tetraploide (4n) com dois, três e quatro múltiplos do número básico de 11 cromossomos ($x = n$), respectivamente. As diferentes cultivares de bananeira possuem combinações diversificadas de genomas completos das suas espécies parentais da seguinte maneira: diploides (AA, AB e BB); triploides (AAA, AAB e ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB e ABBB) (SIMMONDS & SHEPHERD, 1955).

Os genótipos que possuem constituição genômica A (*Musa acuminata*) possuem maior palatabilidade (SIMMONDS, 1962), além de genes que lhes conferem maior valor nutricional, tolerância à seca, resistência a doenças e robustez (WANG, et al., 2007). O genoma B (*Musa balbisiana*) por sua vez, atribui sabor menos adocicado, maior consistência à polpa, e elevado teor de amido ao

fruto (SIMMONDS, 1962). Essas características são importantes para delinear programas de melhoramento genético.

A maioria das características inerentes a cada espécie encontra-se intimamente ligada a seu nível de ploidia e constituição genômica. Os diploides de bananeira, por exemplo, geralmente possuem sementes, são de porte reduzido e apresentam menor rendimento da polpa. Entretanto, indivíduos triploides e tetraploides, possuem porte elevado, frutos maiores, sem sementes e são, em sua grande maioria, cultivares comerciais (OSELEBE & TENKOUANO, 2009).

A aquisição de conhecimentos genéticos são pré-requisitos fundamentais para o direcionamento de estratégias de melhoramento (PUA et al., 2007). Para que o programa de melhoramento seja bem sucedido, é de grande importância que exista variabilidade genética entre as características de interesse (AMORIM et al. 2009). Aliado a esse conhecimento, com o recente sequenciamento do genoma da DH Pahang, espera-se um avanço qualitativo e quantitativo relacionados a conhecimentos relevantes destinados à identificação de *genes* candidatos para resistência a doenças, características agrônômicas e comerciais de interesse (D' HONT et al., 2012).

As variedades resistentes são mais produtivas e geram frutos mais saborosos, além de implicar em redução do emprego de defensivos agrícolas e conseqüente redução nos gastos com o manejo da cultura (BORGES & SOUZA, 2004). Sendo assim, o reconhecimento e caracterização das variedades resistentes por meio de marcadores moleculares, pode trazer informações úteis para o melhorista de plantas (AMORIM et al., 2009), gerando também subsídios para uso dos acessos e sua preservação, além de possibilitar a identificação de possíveis duplicatas (GELETA et al., 2005).

Atualmente, as técnicas moleculares que caracterizam em nível de DNA, permitem maior acurácia em estudos de divergência genética e variabilidade nos diferentes genótipos por não sofrerem interferências do ambiente (CARELLI, 2003; CAIXETA et al., 2009). Dente as técnicas moleculares, destaca-se o uso de marcadores moleculares, que surgiu com a necessidade de reconhecer o polimorfismo genético, acessando diretamente o DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Muitos são os motivos que fazem do uso dos marcadores moleculares ferramentas vantajosas, principalmente ao serem comparados aos marcadores morfológicos convencionais (BRAMMER, 2000).

Os marcadores de DNA auxiliam de forma eficaz o melhoramento genético, pois permitem a escolha de genitores com alelos competitivos a serem usados em cruzamentos, o que acelera a obtenção de variedades mais promissoras (RAMALHO & FURTINI, 2009).

Dentre os marcadores baseados em PCR, destacam-se os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), e microssatélites SSR (*simple sequence repeats*), sendo esse último o preferido dos melhoristas (NING et al, 2007).

Os microssatélites, SSRs, vêm sendo usados com eficiência na caracterização de acessos em bancos de germoplasma (SANTOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012). Estes marcadores são bastante informativos em estudos genéticos em nível de espécies por serem codominantes, multialélicos, de alto polimorfismo, que apresentam grande conteúdo informativo por loco gênico, pela sua robustez, confiabilidade além da praticidade operacional (SLATKIN et al., 1995; GOLDSTEIN & SCHLOTTERER, 1999). Diversos trabalhos são realizados em muitas espécies de plantas, a citar: pimenta (VILLELA et al., 2014), cana-de-açúcar (DUTRA FILHO et al., 2013) citros (PALMIERI et al., 2007), milho (BONAMICO et al., 2010), café (MISSIO et al., 2009) e bananeira (LIBRELON et al, 2013, PEREIRA et al., 2012, AMORIM et al., 2009).

Muitos marcadores microssatélites já estão disponíveis para estudo em *Musa spp*, no entanto, é possível verificar que grande parte dos mesmos foram desenvolvidos a partir do genoma de espécies selvagens, com o diploide Calcutta 4 (AA) (CRESTE et al., 2006). É possível verificar também que muitos desses mostram-se pouco eficazes no processo de amplificação em cultivares comerciais, o que pode ocorrer devido a distancia genética entre cultivares e espécies selvagens (CRESTE et al., 2003; NING et al., 2007). Desta forma, faz-se necessário estudos utilizando microssatélites desenvolvidos a partir de genomas específicos (A e B) que apresentem maior polimorfismo. Alguns SSRs oriundos da cultivar Ouro (AA) foram desenvolvidos por Creste et al., (2006) e apresentaram bons resultados. Sendo assim, seria viável que novos microssatélites oriundos desta cultivar, fossem também disponibilizados, pois os mesmos podem trazer importantes contribuições, exibindo a variabilidade genética existente neste grupo.

Os marcadores SCAR surgiram a partir da conversão de outros marcadores, como o RAPD, a fim de aumentar a estringência e sua confiabilidade (PARAN & MICHELMORE, 1993). Estes marcadores são empregados para amplificar as regiões específicas do DNA genômico para confirmar a segregação mendeliana do caráter, por exemplo, à resistência a doenças (WENG et al., 1998, WANG et al., 2012).

Diversos trabalhos tem sido realizados utilizando estes marcadores, a exemplo, os trabalhos de (DAMASCO et al.,1998; SUPRASANNA et al., 2008; WANG et al.,2012), onde os mesmos utilizaram marcadores SCAR para identificar genótipos resistentes à fusariose e com porte reduzido. Estes estudos deram embasamento para o atual trabalho, que permitiu o *screening* dos acessos do BAG-Bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Outros marcadores SCAR já foram identificados e utilizados em diversas culturas, pois contribuírem com aplicações na seleção assistida por marcadores (SAM) (RAMAGE et al., 2004; SUPRASANNA et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2012).

Embora a Embrapa Mandioca e Fruticultura seja detentora do maior banco de germoplasma de bananeira do País, não existe a formação de “*core collections*” para acessos resistentes às principais doenças. Portanto, os principais objetivos do presente trabalho são: avaliar o poder discriminatório de locos SSRs provenientes de bibliotecas de Calcutta 4 e Ouro, comparar a eficiência dos locos provenientes das duas bibliotecas, verificar a diversidade genética de acessos representantes do BAG-Bananeira, e criar uma “*core collection*” de acessos com possível resistência à Foc RT 4 e com porte reduzido utilizando marcadores do tipo SCAR.

REFERÊNCIA

ALVES, E.J. (1991). A cultura da banana no Brasil e proposições para o seu melhoramento. **EMBRAPA/CNPMF**, Cruz das Almas, BA, p 40

ALVES, E.J.; OLIVEIRA, M.A (1999) Práticas culturais. In: ALVES, E.J. (Ed.). A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. 2.ed. Brasília: Embrapa- SPI; Cruz das Almas: **EMBRAPA-CNPMF**, p.335-352.

AMORIM, E.P; LESSA, L.S.; LEDO, C.A.S.; AMORIM, V.B. de O.; REIS, R.V. dos ;SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SILVA, S.O (2009). Caracterização agronômica e molecular de genótipos diploides melhorados de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.1, p.154-161.

BONAMICO, N. C; BALZARINI, M.G; ARROYO, AT; IBAÑEZ, M.A; DÍAZ, D.G; SALERNO, J.C; DI RENZO, M.A (2010): Association between microsatellites and resistance to Mal de Río Cuarto in maize by discriminant analysis. **Phyton (B. Aires)**, v.79. n.1. p, 31-38

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S (2004).O cultivo da bananeira. Cruz das Almas: **EMBRAPA** ,p. 279.

BORGES, A.J.S.; TRINDADE, A.V. ; MATOS, A.P.; PEIXOTO, A. M.S (2007). Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.42, n.1, p. 35-41.

BRAMMER, S.P. (2000). MARCADORES MOLECULARES: PRINCÍPIOS BÁSICOS E USO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL. **EMBRAPA** Trigo. Disponível em<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.pdf > Acesso 28 de agosto 2014.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S (2009). Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). Marcadores moleculares. **Viçosa**, MG: DFT/UFV, p.11-93.

CARELLI, B.P (2003). Estimativa de variabilidade genética em acessos crioulos e cultivares comerciais de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) do sul do Brasil e avaliação da presença do gene Mi. (**Tese de Doutorado**), São Carlos, UFSCAR, p. 115.

CARVALHO, L. P. de; LUKEFAHR, M. J.; FARIAS, F. J. C.; VIEIRA, R. de M.; MOREIRA, J. de A. N.; COSTA, J. N (1996). da. Seleção de algodoeiro com resistência ao bicudo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n.3, p. 195 -199.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S. de O.; FIGUEIRA, A (2003). Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica, Wageningen**, v.132, n.3, p.259 - 268.

CRESTE, S.; BENATTI, T.; ORSI, M.R.; RISTERUCCI, A.M.; FIGUEIRA, A. (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n.2, p.303-306.

CHAMPION, J (1967.) Les bananiers et leur culture; Tome I: Botanique et genetique. Paris: **IFAC**, v.1, p.214.

DAMASCO OP, SMITH MK, ADKINS SW, GODWIN ID (1998) Use of SCAR based marker for early detection of dwarf off-types in micropropagated 'Cavendish' bananas. **Acta Hort.** v. 461, p. 157–164.

DANTAS, J. L. L.; SHEPERD, K.; SOARES FILHO, W. DOS S.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA, S. DE O. E; SOUZA, A. DA S (1993). Citogenetica e melhoramento de genético da bananeira (*Musa* spp.). Cruz das Almas: **EMBRAPA-CNPMPF**, p. 61.

D' HONT, A.; DENOUD, F., MARC-JEAN, A et al(2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, London, v. 488, n 7410, p. 213–217.

DUTRA FILHO, J.A; RESENDE. L.V; BASTOS, G.Q; SIMÕES NETO, D.E¹; MACHADO P.R (2013). Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronomica**,v.44, n.1, p. 141-149.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília: **EMBRAPA – CENARGEN**, p. 220.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITES NATIONS
FAO. Database (2014). United States: FAO/FAOSTAT.

GELETA, L.F.; LABUSCHAGNE, M.T.; VILJOEN, C.D (2005). Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. **Biodiversity & Conservation** . v. 14, p 2361-2375.

GOLDSTEIN BG & SCHLOTTERER C.(1999). Microsatellites Evolution and Applications. **New York:Oxford University Press**, p 368.

HÄKKINEN, M. (2013) Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **Taxon**, v. 62, n.4, p 809–813.

LIBRELON, S. S; COSTA, M, R; NIETSCHKE, S.; PEREIRA, M. C. T.(2013). Diversidade genética de clones de bananeira 'Prata-Anã' (AAB) por meio de marcadores SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 809-817.

MISSIO, R.F; CAIXETA, E.T; ZAMBOLIM,E.M; PENNA¹; P.F; RIBEIRO,A.P; ZAMBOLIM, L PEREIRA, A.A; SAKIYAMA,N.S (2009). Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. **Bragantia**, v.68, n. 3, p. 573-581.

MOREIRA, R. S (1999). **Banana - teoria e prática de cultivo**. São Paulo: **Fundação Cargill**, 2a edição, p. 335.

NING, S.P.; XU, L.B.; LU, Y.; HUANG, B.Z.; GE, X.J (2007). Genome composition and genetic diversity of *Musa* germplasm from China revealed by PCR-RFLP and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.114, n.4, p. 281-288.

OLIVEIRA M.V.C; BALIZA D.P; SOUZA G.A; CARVALHO S.P; ASSIS L.H.B (2012) Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microsatélites. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p 170-176.

OSELEBE, H.O.; TENKOUANO, A.; PILLAY, M (2006). Ploidy variation of *Musa* hybrids from crosses. *African Journal of Biotechnology*, **Nairobi**, v.5, n. 11, p. 1048-1053.

OSELEBE, H.O. AND A. TENKOUANO (2009). Ploidy versus gender effects on inheritance of quantitative traits in *Musa* species. *Australian Journal of Crop Science*, v 3, n. 6, p. 367-373.

PALMIERI; D.A; NOVELLI; V.M; BASTIANEL; M; CRISTOFANI-YALY; M; ASTÚA-MONGE, G; CARLOS, E.F; OLIVEIRA; A. C; MACHADO, M.A (2007). Frequency

and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. **Genetics and Molecular Biology**, v.3, n.3 p. 1009 -1018.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor.Applied Genetics**. v. 85, n. 8, p. 985-993.

PEREIRA, V.M; BORGES.C.V; BRANDÃO,L.P, OLIVEIRA,L.S; SOUZA,C.P.F, GONÇALVES, Z,S, SILVA,S.O; SANTOS-SEREJO,J.A, FERREIRA,C.F; AMORIM, E.P; LEDO,C.A.S (2012). Genetic diversity between improved banana diploids using canonical variables and the Ward-MLM method. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47,n. 10, p.1480-1488.

PUA, E.C.; LEE, Y.C (2003). Expression of a ripening related cytochrome P450 cDNA in Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Williams). **Gene**, Amsterdam, v. 305, p. 133-140.

PUA, E.C (2007). Banana In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops V* (PUA, E.C.; DAVEY, M.R. (Eds.) Springer-Verlar Berlin Heidelberg. v. 60, p. 32.

RAMALHO, M.A.P.; FURTINI, I.V(2009). Técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento vegetal: alcance e limites. **Revista Ceres**, v. 4,n. 4, p. 473-479.

RAMAGE C.M., BORDA A.M.; HAMILL S.D.; SMITH M.K (2004). A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. **Scientia Horticulturae** .v. 103, p.145-151.

SANTOS AM.; DALL'AGNOL M. ; JANKE A. ; BORTOLINI F. ; HUBER KGC (2011). Análise da diversidade genética de cornichão com o uso de marcadores microsatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v, 40, n.6, p. 1188-1194.

SILVA, S. O. e; SHEPHERD, K (1991). Análise do germoplasma de banana do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical - CNPMF. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 13, n.3, p.115-127.

SILVA, S. de O. e; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, A. da S.; CARNEIRO,M.S (1997). Germoplasma de banana. In: ALVES, E.J. (ed.). A cultura da banana.Aspectos técnicos socioeconômicos e agroindustriais. Brasília, DF: **EMBRAPA-SPI**, p 61-84.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R (2002). da. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, v. 1, p. 101-157.

SIMMONDS N.W. 1962. The evolution of the bananas. Tropical Agricultural Series. **Longman Scientific and Technical**, UK. p. 170.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K (1995). The taxonomy and origin of the cultivated bananas. **The Botany Journal of Linnean Society of London**, Londres, v. 55,n. 359, p. 302-312.

SLATKIN, M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, p.457-462.

SRIVASTAVA, M.K. ; LI, L. C-N. ; LI,Y.R (2012). Development of sequence characterized amplified region (SCAR) marker for identifying drought tolerant sugarcane genotypes. **Crop Science**, AJCS. v. 6, p.763-767.

SUPRASANNA, P.; MEENAKSHI, S.; GANAPATHI, T. R (2008) Characterization of radiation induced and tissue culture derived dwarf types in banana by using a SCAR marker. **Australian Journal of Crop Science**. v. 2, p. 47-52.

VALMAYOR R. V (2001). Classification and characterization of *Musa exotica*, *M. alinsanaya* and *M. acuminata* ssp. *Errans*. **The Philippine Agricultural Scientist**, v.84, n. 2, p. 325-331.

VILLELA, J.C.V. ; BARBIERI, R.L ,CASTRO, C.M. ; NEITZKE.; R.S. ;VASCONCELOS,C.S. ; CARBONARI,T. ; MISTURA,C.C. ; PRIORI, D. (2014) Caracterização molecular de variedades crioulas de pimentas (*Capsicum baccatum*) com marcadores microssatélites. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p 131-137

WANG, G. X.; CHEN, Y.; ZHAO, J. R.; LI, L.; KORBAN, S. S.; WANG, F. G.; LI, J. S.; DAI, J. R.; XU, M. L (2007). Mapping of defense response gene homologs and their association with resistance loci in maize. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n.5, p. 1580-1598.

WANG, W; HU, Y; STAEHELIN, D.S.C; XIE, X.J (2012) Identification and evaluation of two diagnostic markers linked to *Fusarium* wilt resistance (race 4) in banana (*Musa* spp.). **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 451–459.

WENG, C.; KUBISIAK, T.L.; STINE, M (1998). SCAR markers in a longleaf pine x slash pine F1 family, **Forest Genetics**, Zvolen, v.5, n.4, p. 239-247.

CAPÍTULO 1

Avaliação de *locos* microssatélites de bibliotecas oriundas de diploide selvagem de bananeira Calcutta 4 e da cultivar Ouro

Avaliação de *locos* microssatélites de bibliotecas oriundas de diploide selvagem de bananeira Calcutta 4 e da cultivar Ouro

Autora: Patrícia Reis de Oliveira Silva

Orientador(a): Prof^a. Dr^a Cláudia Fortes Ferreira

Coorientador(a): Prof. Dr. Edson Perito Amorim

Coorientador(a): Prof. Dr. Onildo Nunes de Jesus

RESUMO: Os marcadores moleculares, em particular microssatélites, têm sido amplamente utilizados na quantificação de variabilidade genética, na escolha de genitores em estudos filogenéticos em bananeira e no melhoramento genético, principalmente por serem altamente informativos, multialélicos e possuírem alta repetibilidade. Com o avanço das técnicas de NGS, diversos marcadores microssatélites vem sendo identificados como subproduto desse sequenciamento e são utilizados em diversas culturas. No entanto, muitos desses marcadores ainda estão sendo validados em bananeiras dentro dos programas de melhoramento da espécie. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o poder discriminatório de marcadores microssatélites oriundos de bibliotecas genômicas do diploide selvagem Calcutta 4 e da cultivar Ouro e analisar a diversidade genética de 30 acessos representativos do banco de germoplasma de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Do total de 134 *locos* testados, 44 foram utilizados em *Musa* spp., 23 oriundos da biblioteca Calcutta 4, 15 oriundos da biblioteca Ouro, 3 da biblioteca Calcutta 4 (EST-SSR) e 3 da biblioteca Pisang Klutuk Wulung. Primeiramente, procedeu-se a uma análise de diversidade de 30 acessos interpretando os marcadores SSR como dominantes, devido à presença de triploides representativos do BAG-Bananeira. Nessa análise inicial, o valor do PIC para os 44 *locos* polimórficos variou de 0,063 para os *locos* MaO-EC02, MaO-FD02, MaC-CEN56 e mMaCIR151 a 0,533 para o *loco* MaC-CEN39, com média de 0,240. O dendrograma separou os acessos em quatro grupos. Os acessos Ouro e o Muísa Tia foram os mais dissimilares, 0,93 %, e os acessos mais próximos geneticamente, Pacovan e Walha, com valor igual a 0,35 %, sendo que a média encontrada das distâncias genéticas entre todos os acessos foi de 0,74. Na segunda análise, considerando apenas 14 indivíduos diploides e os marcadores SSR como codominantes, o valor do PIC variou de 0,483 a 0,788 e de 0,380 a 0,752, para os *locos* da biblioteca Calcutta 4 e Ouro, com média geral de valor de PIC de 0,627 e 0,611, respectivamente. A análise de dissimilaridade genética conduzida apenas com os indivíduos diploides mostrou que os acessos Diploide Bélgica e Calcutta 4, Birmani e Pa Mysore 3 foram os mais dissimilares, 0,85 %, e os acessos mais próximos geneticamente, Calcutta 4 e Ouro, com valor igual a 0,32 %, sendo que a média encontrada entre os acessos foi de 0,68. A porcentagem de valores de PIC acima de 0,5 para os *locos* oriundos da biblioteca Calcutta 4 e Ouro nos acessos diploides, foi de 90 e 87 %, respectivamente. Diante dos altos valores dos PICs verificados, pode-se concluir que os marcadores validados neste estudo poderão ser amplamente usados em análise de diversidade genética em *Musa* spp.

Palavra Chave: melhoramento de bananeira, caracterização molecular, Musa spp.,

Evaluation of microsatellite locos originated from libraries of wild diploid Calcutta 4 and Ouro cultivar

Author: Patrícia Reis de Oliveira Silva

Advisor: Prof^a. Dr^a Cláudia Fortes Ferreira

Co-advisor: Prof. Dr. Edson Perito Amorim

Co-advisor: Prof. Dr. Onildo Nunes de Jesus

Abstract: Molecular markers, in particular microsatellites, are broadly used in quantification of genetic variability, choice of genitors, phylogenetic studies and banana breeding especially because they are highly informative, multiallelic and have high reproducibility. With the advance of NGS techniques, many microsatellite markers are being identified as a sub-product of sequencing and are used in many crops. However, many of these markers are still being validated in bananas in the genetic breeding program of the species. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the discriminatory power of microsatellite markers originated from the wild diploid Calcutta 4 and Ouro genomic libraries and evaluate the genetic diversity of 30 representative accessions of the Banana Germplasm Bank at Embrapa Cassava and Fruits. From a total of 134 locos tested, 44 were used in *Musa* spp., 23 from the Calcutta 4 library, 15 from the Ouro library, 3 from the Calcutta 4 (EST-SSR) library and 3 from the Pisang Klutuk Wulung library. Firstly, the analysis of 30 accesions was carried out interpreting the makers as dominant due to the presence of representative triploids in the BGB. For this initial analysis, the PIC value for the 44 locos varied from 0.063 for locos MaO-EC02, MaO-FD02, MaC-CEN56 and mMaCIR151 to 0.533 for loco MaC-CEN39, with average of 0.240. The dendrogram separated the accessions into four groups. The Ouro and Muísa Tia accessions were the most dissimilar, 0.93 % and the most close were Pacovan and Walha, 0.35 % with average of 0.74. In the second analysis, considering only 14 diploid individuals and the SSR markers as codominant, PIC value varied from 0.483 to 0.788 and from 0.380 to 0.752, for locos of the Calcutta 4 and Ouro libraries with average PIC value of 0.627 and 0.611, respectively. Analysis of genetic dissimilarity with only the diploid accessions showed that the Diploide Bélgica and Calcutta 4, Birmani e Pa Mysore 3 accessions were most dissimilar (0,85 %) and the closest genetically, Calcutta 4 and Ouro (0,32 %) with average distance of 0.68. The percentage of PIC values above 0.5 for locos from the Calcutta 4 and Ouro libraries in the diploid accessions was 90 and 87 %, respectively. Given the high PIC values, the SSR markers in this study may be broadly used in genetic diversity analysis of *Musa* spp.

Key words: banana breeding, molecular characterization, *Musa* spp.,

INTRODUÇÃO

A bananicultura possui considerável expressão econômica e social distribuída nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, onde é cultivada por pequenos, médios e grandes produtores. O Brasil, em 2012, ocupou a quinta posição no ranking dos países que produzem banana, com 503.354 hectares de área cultivada e produção de 7,3 milhões de toneladas da fruta (FAO, 2014). É o quarto produto alimentar mais consumido em território nacional e no mundo, que perde em volume de produção, apenas para laranja (ANUÁRIO BRASILEIRO, 2014).

Mesmo diante do grande número de cultivares encontradas no Brasil, apenas uma pequena parcela mostra-se com potencial agrônomo para fins comerciais, sobretudo em relação às necessidades do mercado, como, porte baixo das plantas, produtividade, tamanho e qualidade dos frutos (SILVA et al., 1999). Uma das alternativas para solucionar esses problemas é a seleção de novos genótipos com características superiores (SILVA et al., 1999), que pode ser auxiliada pelo uso de marcadores moleculares.

O melhoramento genético de bananeira tem gerado tetraploides promissores por meio de cruzamentos de cultivares triploides e diploides melhorados, que possuem caracteres agrônômicos de interesse, como, resistência às principais pragas, qualidade físico-química dos frutos e porte reduzido (SILVA et al., 2005). Os genótipos diploides são de grande importância por serem fontes de alelos de resistência e tolerância a fatores bióticos e abióticos (JENNY et al., 1999). Desta forma, a avaliação de acessos desse grupo reveste de grande importância para subsidiar ações de melhoramento genético.

Os marcadores moleculares como os microssatélites são considerados ferramentas úteis para os melhoristas, principalmente na seleção de genitores e avaliação da diversidade genética de acessos em coleções e bancos de germoplasma. Além disso, os marcadores contribuem para o entendimento básico da genética das culturas e das características que se deseja estudar e posterior desenvolvimento de indivíduos melhorados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Auxiliam também em estudos de taxonomia, genotipagem, evolução (AMORIM et al., 2008; JESUS et al., 2009; D'HONT et al. 2012; JESUS et al., 2013; LIBRELO et al. 2013) e saturação de mapas de ligação em bananeira

(FAURÉ et al. 1993; MBANJO et al., 2009; HIPPOLYTE et al., 2010). Estes locos microssatélites pode ser obtido através do isolamento de clones positivos de uma biblioteca genômica após hibridização com sonda específica.

Apesar dos microssatélites serem bastante usados em estudos com bananeira, é possível verificar que a maioria foi desenvolvido a partir de bibliotecas oriundas de espécies selvagens, fato que limita a amplificação em cultivares comerciais (CROUCH et al., 1998, CRESTE et al., 2003, 2004). Portanto, o desenvolvimento e validação de novos locos microssatélites oriundos do genoma de cultivares de *Musa spp.*, pode trazer informações mais robustas quando comparadas ao polimorfismo encontrado, quando utiliza-se *locos* provenientes do genoma de espécies selvagens. Isso permite auxiliar de forma mais completa os programas de melhoramento genético na caracterização de germoplasma, estudos evolutivos e seleção assistida por marcadores (CRESTE et al. 2004, 2006).

O objetivo do presente estudo foi validar e comparar o poder discriminatório de marcadores microssatélites provenientes de bibliotecas genômicas do diploide selvagem Calcutta 4 e da cultivar Ouro e avaliar a diversidade genética de acessos representativos do BAG-Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Foram utilizados 30 acessos representativos do Banco de Germoplasma de Bananeira (BGB) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas - Bahia (Tabela 1). Sendo caracterizados oito acessos diploides (AA), cinco triploides homozigotos (AAA), quatro triploides heterozigotos (AAB), oito triploides heterozigotos (ABB) e cinco acessos diploides homozigotos (BB) (Tabela 1).

Tabela 1. Acessos de bananeira pertencentes ao BAG-bananeira usados no estudo de diversidade genética via marcadores SSRs provenientes de bibliotecas de Calcutta 4 e Ouro.

N°	Acesso	Genoma	Subgrupo/ subespécie	Origem
1	PA Mysore 3	AA	<i>ssp malaccensis derivada</i>	Tailândia
2	NiyarmaYik	AA	<i>ssp banksii</i>	Nova Guiné
3	TuuGia	AA	-	Havaí
4	Krasan Saichon	AA	-	Tailândia
5	Calcutta 4	AA	<i>Sspburmannicoide</i>	Jamaica
6	Birmanie	AA	<i>spp. burmanica</i>	França
7	Malaccensis	AA	<i>Sspmalaccensis</i>	Honduras
8	Ouro	AA	-	Brasil
9	Markatooa	AAA	-	Nova Guiné
10	Pagatow	AAA	-	Nova Guiné
11	Nam	AAA	-	Tailândia
12	Yangambi Km 5	AAA	<i>Ibota</i>	França
13	Canela	AAA	-	Brasil
14	Adimoo	AAB	-	Nova Guiné
15	Yangambi N°2	AAB	<i>Silk(maça)</i>	França
16	Samurá "B"	AAB	-	Brasil
17	Pacovan	AAB	<i>Prata</i>	Brasil
18	Walha	AAB	<i>Prata</i>	Havaí
19	Muísa Tia	ABB	<i>Pisanawak</i>	França
20	Namwa Daeng	ABB	-	Tailândia
21	Saba Honduras	ABB	<i>Saba</i>	Honduras
22	Pelipita	ABB	<i>Pelipita</i>	Honduras
23	Cacambou Naine	ABB	<i>Bluggoe</i>	Equador
24	Ice cream	ABB	-	Havaí
25	Butuhan	BB	<i>Balbisiana</i>	Filipinas
26	Diploide Bélgica	BB	<i>Balbisiana</i>	Bélgica
27	BB França	BB	<i>Balbisiana</i>	França
28	BB Panamá	BB	<i>Balbisiana</i>	Panamá
29	IAC BB	BB	<i>Balbisiana</i>	Brasil
30	Musa balbisiana	BB	<i>Balbisiana</i>	Brasil

Caracterização de locos microssatélites provenientes de bibliotecas genômicas.

Foram testados 134 locos microssatélites, destes 44 foram utilizados nas análises de diversidade genética, sendo um loco (série MaOCEN) da cultivar diploide Ouro (AA) desenvolvido por Creste et al. (2006) e outros 19 (série MaC) e 15 locos (série MaO) validados por Jesus et al. (2013), desenvolvidos a partir do diploide selvagem Calcutta 4 (AA) e da cultivar Ouro (AA), respectivamente. Ambas as bibliotecas foram desenvolvidas pela Dra. Silvana Creste no Laboratório de Plantas do CENA/USP adotando o procedimento descrito por Billotte et al., 1999.

Foram testados também locos SSR da série mMaCIR, descritos por Mbéguié-A-Mbéguié et al., (2007), provenientes de biblioteca enriquecida para microssatélites (CA)_n, (TC)_n, de *M. acuminata* (Calcutta 4) e *M. balbisiana* ('Pisang Klutuk Wulung') (mMaCIR151, mMaCIR156, mMaCIR241). Além destes, ainda foram utilizados locos provenientes de biblioteca EST-SSR oriundos de *M. acuminata* (Calcutá 4) (mMECIR 510, mMECIR 519, mMECIR 584) (MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ et al., 2007). Outros dois locos também foram testados, o AGMI 121/122 (LAGODA et al., 1988) e o Ma 1/17 (CROUCH et al., 1998).

Extração de DNA

Foram coletadas folhas jovens de bananeiras do BAG-Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura para extração do DNA genômico a partir do método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (DOYLE; DOYLE, 1990).

Brevemente, ± 300mg de folhas jovens foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e transferidos para microtubos de 2,0 mL, onde foi adicionado o tampão de extração (1,4 M NaCl; 100 Mm Tris-HCl pH 8.0; 20Mm EDTA pH 8.0; 1% polivinilpirrolidona MVV 10,000, 2% CTAB e 0,4% β-mercaptoetanol) previamente aquecido a 65 °C e os tubos homogeneizados por 5 min. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C por 45 min. e homogeneizadas a cada 15 min. Após esta etapa, foi adicionado às amostras clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) e as mesmas centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. (etapa realizada por duas vezes), seguida da adição de álcool isopropílico

gelado ao sobrenadante. Posteriormente, o material foi incubado em freezer por 30 min a - 20 °C e centrifugado 10.000 rpm por 10 min. O DNA foi lavado com etanol 70 % e logo após a lavagem, o *pellet* foi ressuspensão em TE (10 Mm Tris-HC, pH 8.0, 1 EDTA) mais ribonuclease (10 mgmL⁻¹ RNase), colocado na estufa a 37 °C e adicionado acetato do sódio 3.0 M. O material foi então centrifugado por 20 segundos a 3.000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado etanol absoluto gelado e as amostras centrifugadas a 10.000 rpm, o DNA lavado mais duas vezes com etanol 70% e ressuspensão em TE. Por fim, o DNA extraído foi armazenado em freezer à temperatura de - 20 °C. A avaliação da quantidade e qualidade do DNA foi efetuada mediante análise comparativa das amostras em gel de agarose 1.0 %, utilizando-se marcadores de peso molecular conhecido.

Amplificação de DNA

As reações de amplificação foram completadas para volume final de 15 µL, contendo: MgCl₂ 2,5 mM, Tampão 1x, dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de cada *primer*, 20 ng de DNA genômico e uma Unidade de Taq DNA polimerase 1U/µl. As amplificações foram conduzidas em termociclador Applied Biosystems (ABI), Veriti 96-well Thermal Cycler, utilizando temperatura de anelamento específica para cada *primer*. A condição de amplificação incluiu um ciclo de desnaturação de 5 min. a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 1min a 94 °C, 1 min. de anelamento com a temperatura de anelamento (Ta) específica de cada *primer*, 1 min. de extensão a 72 °C, com uma extensão final de 10 min. a 72 °C e 14 °C ∞.

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, a 100 V, em tampão TBE 0.5X e corados em brometo de etídio (0.5 µl mL⁻¹). Os fragmentos amplificados foram fotodocumentados utilizando fotodocumentador Vilber Lourmat. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados baseados em padrão molecular de 50 pb (DNA Ladder Biolabs).

Análise dos dados

Primeiramente, pelo fato da presença de acessos de bananeiras triploides, procedeu-se a uma análise de dados binários (0 e 1) com 30 acessos. Posteriormente, foram retirados os indivíduos triploides e feita a análise por meio

dos tamanhos dos pb (pares de bases) dos fragmentos para 14 acessos diploides. Procedeu-se também a uma análise para avaliação e comparação dos valores de PIC (*Polimorphism Information Content*) entre as duas formas de avaliação (avaliação dos SSRs como dominantes – com acessos diploides e triploides-30 e avaliação dos SSR como codominantes – apenas com acessos diploides-14).

A matriz de distância genética foi calculada utilizando-se o programa estatístico GENES versão 2009.7.0 (CRUZ, 2006), tomando como base o índice do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e Nei e Li (1973) para as análises dos SSRs como dominantes e codominantes, respectivamente. Os agrupamentos foram gerados a partir do método do UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*) e o dendrograma construído utilizando-se o software STATISTICA (STATISTICA, 2002). Os grupos foram separados por ponto de corte seguindo os critérios sugeridos por Mingoti et al. (2005). O PIC, foi calculado aplicando-se a fórmula: $PIC = 1 - \sum p_i^2$, onde pi é a frequência do alelo i na população (POWELL et al.,1996) utilizando o software POWERMARKER (LIU & MUSE, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização de *locos* microssatélites provenientes das bibliotecas genômicas de Calcutta 4 e da cultivar Ouro em acessos de bananeira.

1.2 Considerando os marcadores microssatélites como dominantes

Inicialmente foram testados 134 *locos* microssatélites em cinco acessos de bananeira para otimização e validação dos mesmos. Destes, 44 (33%) apresentaram bandas bem definidas e polimórficas, 18 (13%) foram monomórficas, 40 (30%) não apresentaram produto de amplificação e 32 (24%) amplificaram algumas amostras com bandas pouco definidas (Figura 1).

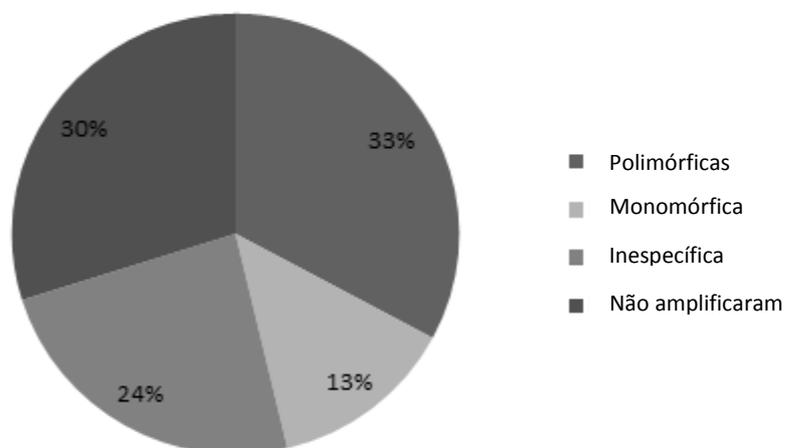


Figura.1: Representação da porcentagem do teste para a validação de 134 *locos* SSR. polimórficos, monomórficos bandas pouco definidas e não amplificado.

Para avaliar a capacidade de discriminação dos locos microssatélites, foram utilizados 30 acessos de bananeira (Tabela 1) genotipados com 38 locos, sendo 23 locos provenientes da biblioteca Calcutta 4 (série MaCCEN, AGMI 121/122, Ma 1/17 e mMaCIR305) e 15 locos da biblioteca Ouro (série MaO). Os dados foram interpretados como dominantes (1-presença e 0- ausência), totalizando 196 bandas polimórficas, sendo 80 da cultivar Ouro e 116 do diploide selvagem, Calcutta 4. Na biblioteca Ouro, o maior número de alelos foi para o *loco* MaOED01, com 8 alelos, enquanto que, para a Calcutta 4, destacou-se o *loco* MaC-CEN39, com 10 alelos. O número médio de alelos por biblioteca, Calcutta 4 e Ouro analisada, foi de 5,13 e 5,06, respectivamente (Tabela 2).

Para auxiliar no estudo de diversidade genética, além dos locos supracitados, ainda foram utilizados mais 3 *locos* da bibliotecas Calcutta 4, de EST-SSR: mMECIR 510, mMECIR 519, mMECIR 584 e 3 provenientes da biblioteca de 'Pisang Klutuk Wulung' (BB): mMaCIR151, mMaCIR156, mMaCIR241 e revelaram 28 bandas, que ao serem contabilizadas com as 196 banda encontradas pelos locos das bibliotecas Calcutta 4 e Ouro totalizam 224 bandas produzidas, sendo todas polimórficas.

Tabela 2 Locos microssatélites validados em acessos de bananeira sentido Forward (5'-3') e Reverso (5'-3') número de alelos, conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), temperatura de anelamento (Ta), tamanho dos pares de base(pb).

Biblioteca	Loco SSR	Motivo SSR	Sentido F (5'-3')	Sentido R (5'-3')	N° Alelos	PIC	Ta	pb
Ouro	MaO-EC02	(GA)11	ggggaaggtggttagga	ggcaaatggaagagaggag	5	0.233	58°C	200-300
	MaO-EC05	(GA)13	tgagtcgcttttgccttt	gtggtgattccgagtggtt	5	0.228	58°C	100-200
	MaO-EC11	(TC)16	gcacaacttactcccatcac	cactacaactcacctccaatc	7	0.197	58°C	200-300
	MaO-FA12	(TC)8	cccgtgtattgggtcgtag	gagactgatggcaaggatg	4	0.360	55°C	250-350
	MaO-FD02	(AC)8	ggcatcacacacgcaaaa	attacattcccagcccacac	5	0.209	56°C	150-250
	MaO-FF10	(GA)11	ctcctgttctacctccgtgt	cgatgactggctttactgtg	5	0.144	56°C	200-300
	MaO-FG09	(AG)16	ttcttcctgaccaccttttc	ccaagtatcacaccaacacca	5	0.231	58°C	100-200
	MaO-EH12	(AG)17	aacccaacaccaaaggaaga	atggaagcatgtggaggaac	4	0.315	57°C	200-300
	MaO-EC09	(AG)22	ggactgtattttgtctcttc	atcatctccagccatctcc	6	0.190	57°C	100-200
	MaO-ED01	(CT)12	tgtccacagtttctcca	cgcctatgatgacaacagcaa	8	0.223	57°C	100-400
	MaOCEN03	(GA)10	acc acgaggagcaggaagtagc	ttcgggataggaggaggag	6	0.277	55°C	200-350
	MaO-ED09	(CT)16	tgtcagataggtcggagttg	cgcctatgatgacaacagcaa	6	0.234	52°C	300-350
	MaO-EC12	(GA)11...(GA)8	aacccaacaccaaaggaaga	tgtggcgagaaataaatc	5	0.290	52°C	100-250
	MaO-2B10	(CT)19	acgaggagcaggaagtagc	ttctctatcccgtggttg	5	0.335	52°C	200-250
	MaO-FH03	(AG)14	ctatggcggtgagtgcaatccaagtttggtaag	tctcttccctctctgcat	4	0.227	52°C	200-300
	Calcutta 4	MaCEN3	(AG)21	ggaggaggaagaggagaagg	tgaactgacaccctgagcac	6	0.210	57°C
MaCEN4		(ACC)5.(CT)16	tgtcagataggtcggagttg	agtgcctctgttaggtttcc	6	0.274	57°C	100-300
MaCEN5		(GA)10.(GA)6	atctcgctcacctcgtcttc	tcatagacagcccagcagaa	5	0.234	58°C	200-300
MaCEN6		(AG)13	ttctgctgggctgtctatga	aagggcagttcacacacaa	5	0.247	57°C	250-300
MaCEN10		(TC)14	atctgtgggcttatgtctgt	gcaggtttgggagaagacat	6	0.216	57°C	100-300
MaC-CEN13		(GA)15	ttgttcctctgtctcttga	tctcttccctctctgcat	6	0.249	59°C	200-300
MaCEN1		(CT)18	agatgatgacccccacctc	ttctcctatcccgtggttg	4	0.274	58°C	200-300
MaC-CEN18		(TC)15	gcttctgaccgctctcac	gcgttcatcattttcatc	4	0.272	56°C	200-250
MaC-CEN19		(TC)13	ttcctgccttgcctgta	ggtttaccattgctctgac	5	0.133	56°C	250-350
MaC-CEN23		(TC)17	atagaaggaaacgggaaatc	aaaggagttgtgtaggaagc	5	0.214	56°C	200-400
MaC-CEN34		(AG)10-(GA)16	gagaatggcaaatgtcaagt	ggtcccagtggttattgtc	5	0.256	56°C	200-400
MaC-CEN17		AG)13-(AG)13	agaaacaaacagataaccga	ttccctatgtagtagacca	4	0.200	57°C	200-400
MaC-CEN39		(CT)19	tgggtcgtgaattgaatctga	cgccacgaatacatctatct	8	0.177	50°C	100-350
MaC-CEN42		(CT)10	aatcttggtggcttctgta	caaataaacctggggcattc	5	0.193	54°C	200-300
MaC-CEN44		(TC)16	gaaggcagggaacacgaa	tgagaagagcagagagaagc	4	0.228	56°C	100-300
MaC-CEN46		(GA)12	tgtaaaggacctctgtgtgc	gagatgggattgggttctgt	4	0.227	52°C	200-300
MaC-CEN52		(AG)15	tcactggcaggttcacaaag	gacttcatctcggcaatgg	5	0.301	52°C	200-300
MaC-CEN56	(AG)10	cgaggagcaggaagtagc	tgtggcgagaaataaatc	6	0.222	52,5°C	150-250	

Tabela 2. Continuação...

Calcutta 4	Ma-1-27	(TC)14	gactatgggcgtgagtgcaatccaagtttggtcaag	caaaacactgtcccatctc	4	0.268	55°C	100-200
	Ma-CEN03	(AG)21	ggctaggaaggttagtgccggaggaggaagaggagaag	tgaactgacaccctgagcac	6	0.257	56°C	100-300
	AGMI121/122	(TG)x4TTT(CT)x9	accaacctaggaaacacagcagttggccgctgatctt	ggggtcaacatgtaagtct	4	0.128	56°C	500-700
	AGMI73/74	(TC)14	ggctaggaaggttagtgccaaccagagctgcctacg	agggccaagaaactcctcc	4	0.298	56°C	200-400
mMaCIR305	-	accaacctaggaaacacagtcctgatcaattcagcca	tatgagcaagaacagccc	3	0.289	56°C	300-350	
BB ¹	mMECIR510	-	gactatgggcgtgagtgcaatggcgttcccttgatg	atggttcggttgaagg	4	0.330	56°C	100-200
	mMECIR519	-	gactatgggcgtgagtgcatgattcttgctgtggttttag	cgtgaaactcaggaggg	6	0.223	56°C	100-250
	mMaCIR584	-	gactatgggcgtgagtgcatggagataaggaaagagagagagg	ctccaagcacagaagcac	3	0.261	56°C	100-200
Calcutta 4 EST ¹	mMaCIR156	(TG)23	ggctaggaaggttagtgcccttctgaaggaaattctgac	agtcgagcccaatgaa	4	0.300	56°C	200-250
	mMaCIR151	(CT)21	gactatgggcgtgagtgcaatccacctcctggcac	gccaacatcacccaac	6	0.238	56°C	100-200
	mMaCIR241	(TC)20	accaacctaggaaacacagtgctaagcatcaagtagccc	acgaacaagcaatcaagtag	5	0.244	56°C	250-300
Média	Geral	-	-	-	5.1	0.2529	55.7	-
	Ouro	-	-	-	5.06	0.2462	55.5	-
	Calcutta 4	-	-	-	5.13	0.2334	55.6	-
	BB	-	-	-	4.0	0.271	56	-
Calcutta-4 EST	-	-	-	4.5	0.261	56	-	

¹Primes utilizados apenas no estudo da diversidade genética entre os acessos, (PIC): *Polymorphism Information Content*, (Ta): Temperatura de anelamento, (pb): pares de base - tamanho -amplitude do fragmento no gel de agarose.

O número de amostras que não amplificaram com os *locos* provenientes das bibliotecas Calcutta 4 e Ouro foram de 15 (3,3%) e 38 (8,4%), respectivamente. Tal fato mostra que de maneira geral, a biblioteca Ouro apresenta maior número de *locos* que não amplificaram em algumas das amostras avaliadas. Esses *locos* possivelmente podem estar amplificando *locos* consideradas como alelos nulos e/ou falha de ancoramento total dos mesmos ao DNA template.

O perfil eletroforético de 30 acessos de bananeira amplificados com o *loco* MaO-EC11, proveniente da biblioteca Ouro, encontra-se na Figura 2

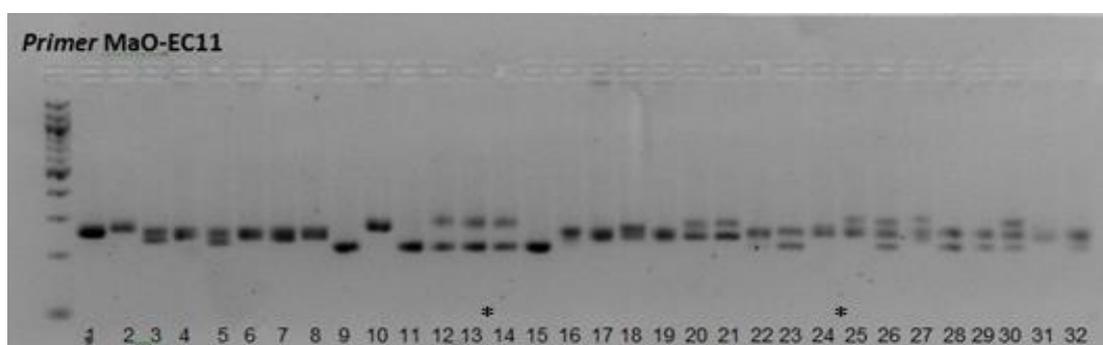


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1000, 3%. M = ladder 100 pb (Invitrogen), *loco* MaO-EC11. Amostras de 1 a 32: Pa Mysore AA, Calcutta 4 AA, Birmanie AA, Niyarma Yik AA, Malaccensis AA, Tuu Gia AA, Krasan Saichon AA, IAC BB BB, BB França BB, Butuhan BB, Diploide Bélgica BB, BB Panamá BB, (NBF- 9) * AA, Musa balbisiana BB, Canela AAA, Markatooa AAA, Nam AAA, Pagatow AAA, Adimoo AAB, Yangambi N°2 AAB, Muísa Tia ABB, Yangambi Km 5 AAA, Cacambou Naine ABB, Tomnam * AAB, Samurá "B" AAB, Namwa Daeng ABB, Ice cream ABB, Pelipita ABB, Pacovan AAB, Walha AAB, Saba Honduras ABB, Ouro AA.

*Acessos que não participaram de todas as análises por não estarem mais presentes no BAG Banana no ato da segunda coleta mediante da necessidade de uma nova extração de DNA genômico para continuidade das análises. Por esse motivo, os mesmos foram excluídos da genotipagem.

O valor do PIC para os 44 *locos* polimórficos em diploides e triploides de bananeira variou de 0,063 para os *locos* MaO-EC02, MaO-FD02, MaC-CEN56 e mMaCIR151 a 0,53 para o *loco* MaC-CEN39, com média total de 0,24. A princípio, o valor médio encontrado é relativamente baixo devido a avaliação ter ocorrido em acessos triploides, onde apenas a ausência (0) e presença (1) de bandas podem ser avaliadas, levando à perda de informação e portanto, ao baixo valor de PIC.

Quando comparado às médias dos PICs entre os *locos* provenientes das bibliotecas oriundas de diploide selvagem Calcutta 4 e da cultivar Ouro, pode-se verificar que não houve diferença entre as mesmas, onde as médias dos PICs para as duas bibliotecas foram de 0,233 e 0,246, respectivamente (Tabela 2).

O maior grau de polimorfismo foi obtido com o *loco* MaO-2H03 (10 alelos), e os menores, pelos *locos* mMecir584, mMaCRI305, mMaCRI1510, mMaCRI241-F (3 alelos) (Tabela 2).

Esses resultados corroboram com os encontrados por Creste et al.(2003) e Creste et al. (2004), em estudos com bananeira *Musa* spp., onde utilizando marcadores SSR, os fragmentos também foram computados como dados binários em decorrência da natureza genômica complexa de ploidia diversificada que envolve muitas duplicações cromossômicas do germoplasma de *Musa*. Esse fato faz com que ocorra perda da natureza codominante dos marcadores SSRs e portanto, uma diminuição dos valores do PIC; fato este já esperado (CROUCH et al.,1998).

A matriz de dissimilaridade (Anexo C e D) com base no índice de Jaccard foi utilizada para comparar a capacidade de discriminação dos acessos com base nas duas bibliotecas analisadas (Figura 3). De maneira geral, os *locos* da biblioteca Ouro, discriminaram melhor os acessos, uma vez que 65,98% (287 de 435 pares de acessos) dos pares de acessos apresentaram dissimilaridade superior a 80%, apesar do maior número de *locos* analisados na biblioteca Calcutta 4, que apresentou 59,77% dos pares com dissimilaridade superior a 80% (Figura 3).

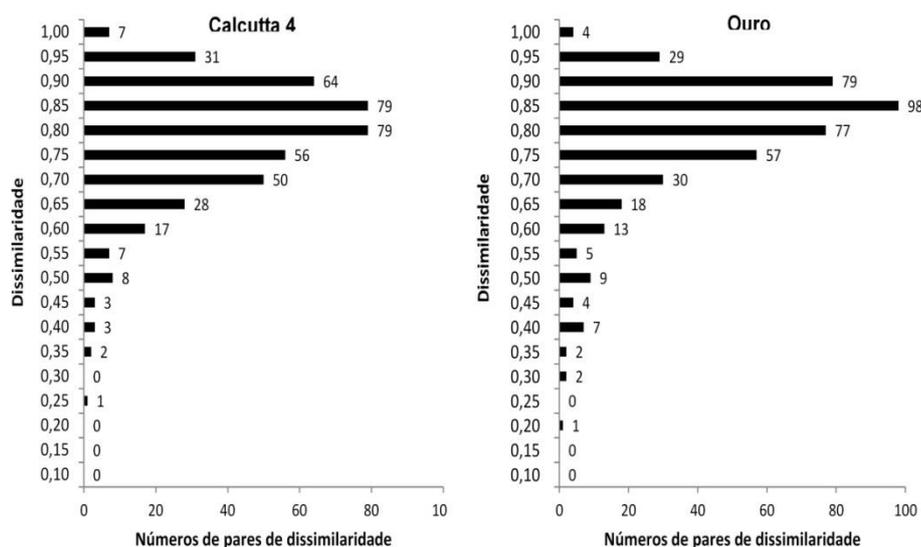


Figura 3. Dissimilaridade entre os pares de acessos utilizando marcadores microssatélites derivado da biblioteca Calcutta 4 e Ouro ,com base no índice Jaccard.

1.2 Considerando os marcadores microssatélites como codominantes

Foram genotipados 14 acessos diploides de bananeira por meio de 44 *locos* microssatélites, contabilizados como marcadores codominantes. Isso permitiu uma análise mais robusta em comparação ao uso de *locos* das diferentes bibliotecas, principalmente quanto à discriminação e conteúdo de informação dos mesmos. Para essa segunda análise, o valor de PIC variou de 0,380 a 0,795 para os *locos* MaC-CEN39 da biblioteca Calcutta 4 e MaO-EC02 da biblioteca Ouro, respectivamente, com média geral de 0,614 (Tabela3).

Estes resultados demonstram que, quando a análise é conduzida considerando a codominância dos marcadores, apresenta maior valor de PIC. Isto provavelmente em decorrência também da maior variabilidade genética que existe em acessos diploides, em especial de *M. acuminata*, resultados corroborados por Creste et al., (2003). Amorim et al., (2008) avaliando diploides de bananeira, observaram que o PIC variou de 0,35 a 0,88, com média de 0,77.

Tabela 3. *Locos* microssatélites validados em diploides de bananeira Motivo SSR, sentido Forward (5'-3') e Reverso (5'-3') número de alelos, conteúdo de informações polimórficas (PIC), temperatura de anelamento (Ta), tamanho dos pares de base(pb).

Biblioteca	Loco SSR	Motivo SSR	Sentido F (5'-3')	Sentido R (5'-3')	Nº Alelos	PIC	Ta	Tamanho (Amplitude)
Ouro	MaO-EC02	(GA)11	Ggggaaggtggtgtagga	Ggcaaatggaagagaggag	4	0.3803	58°C	200-300
	MaO-EC05	(GA)13	Tggagtcgcttttgctttt	Gtggtgatttccgagtggtt	4	0.7352	58°C	100-200
	MaO-EC11	(TC)16	Gcacaaccttactcccatcac	Cactacaactcacccttccaatc	5	0.7476	58°C	200-300
	MaO-FA12	(TC)8	Cccgtgtattggtgctgtag	Gagactgatggcaaaggatg	3	0.6141	55°C	250-350
	MaO-FD02	(AC)8	Ggcatcacacacgcaaaa	Attacattcccagcccacac	5	0.5849	56°C	150-250
	MaO-FF10	(GA)11	Ctcctgtttacctccgtgt	Cgatgactggctttactgtg	3	0.3803	56°C	200-300
	MaO-FG09	(AG)16	Ttcttctgaccaccttttc	Ccaagtatcacaccaacacca	5	0.5645	58°C	100-200
	MaO-EH12	(AG)17	Aacccaacaccaaaggaaga	Atggaagcatgtggaggaac	3	0.5363	57°C	200-300
	MaO-EC09	(AG)22	ggactgtattttgtcttctc	Atcatctccagccatctcc	6	0.7385	57°C	100-200
	MaO-ED01	(CT)12	Tgtccacaggtttctcca	Cgcatctatgacaacagcaa	7	0.7366	57°C	150-400
	MaOCEN03	(GA)10	acc acgaggagcaggaaagtagc	Ttcgggataggaggaggag	5	0.5653	55°C	200-300
	MaO-ED09	(CT)16	tgtcagatagtcggagttg	Cgcatctatgacaacagcaa	6	0.7521	52°C	100-300
	MaO-EC12	(GA)11...(GA)8	aacccaacaccaaaggaaga	Tgtggcggagaaataaatc	4	0.6037	52°C	250-350
	MaO-2B10	(CT)19	acgaggagcaggaaagtagc	Ttctcctatcccgtggttg	4	0.6660	52°C	200-250
	MaO-FH03	(AG)14	ctatggcgctgagtcattgaatccaagttggtcaag	Tctcttccctctctgccat	4	-	52°C	200-250
Calcutta 4	MaCEN3	(AG)21	ggaggaggaagaggagaagg	Tgaactgacacctgagcac	5	0.6457	57°C	100-200
	MaCEN4	(ACC)5.(CT)16	tgtcagatagtcggagttg	Agtgctctgttaggttcc	6	0.6805	57°C	100-300
	MaCEN5	(GA)10.(GA)6	atctcgctcacctcgtcttc	Tcatagacagcccagcagaa	5	0.4874	58°C	200-300
	MaCEN6	(AG)13	ttctgctgggctgtctatga	Aagggcagttcacaacacaa	5	0.6574	57°C	250-300
	MaCEN10	(TC)14	atctgtgggcttatggtcgt	Gcaggttgggagaagacat	6	0.7287	57°C	100-300
	MaC-CEN13	(GA)15	ttgttctcctgtgcttttga	Tctcttccctctctgccat	5	0.6725	59°C	200-300
	MaCEN1	(CT)18	agatgatgacccccacctc	Ttctcctatcccgtggttg	3	0.5035	58°C	250-300
	MaC-CEN18	(TC)15	gcttcgtaccgctctcac	Gcgttcatccattttcatc	4	0.6926	56°C	150-200
	MaC-CEN19	(TC)13	ttcctgcctttgcctgta	Ggtttaccattgctctgac	4	0.5186	56°C	250-350
	MaC-CEN23	(TC)17	atagaaggaaaacgggaaatc	Aaaggagtgtgttaggaagc	4	0.7127	56°C	250-400
	MaC-CEN34	(AG)10-(GA)16	gagaatggcaaatgtcaagt	Ggtcccagtggttattgtc	5	0.7886	56°C	200-400
	MaC-CEN17	AG)13-(AG)13	agaaacaacagataaccga	Ttcccttatgtagtagacca	4	0.6198	57°C	250-350
	MaC-CEN39	(CT)19	tggtgctgaattgaatctga	Cgccacgaatacatctatct	7	0.7953	50°C	100-350
	MaC-CEN42	(CT)10	aatctggttggcttctgta	Caaataaacctggggcattc	5	0.5106	54°C	200-300
	MaC-CEN44	(TC)16	gaaggcagggaacacgaa	Tgagaagagcgagagaagca	4	0.5730	56°C	150-300
	MaC-CEN46	(GA)12	tgtaaggagcctctgtgtgc	Gagatgggattggttctgt	3	0.5395	52°C	200-300
	MaC-CEN52	(AG)15	tcactcggcagttcacaag	Gactcatcttccgcaatgg	5	0.7261	52°C	200-300
	MaC-CEN56	(AG)10	cgaggagcaggaaagtagc	Tgtggcggagaaataaatc	6	0.6816	52,5°C	150-250

Tabela 3. Continuação...

Calcutt4	Ma-1-27	(TC)14	gactatgggcgtgagtgcaattgaatccaagtttggtcaag	caaaacactgtccccatctc	4	0.5260	55°C	100-200
	Ma-CEN03	(AG)21	ggctaggaaggttagtggcggaggaggaagaggagaagg	tgaactgacaccctgagcac	5	0.6606	56°C	150-250
	AGMI121/122	(TG)x4TTT(CT)x9	accaacctaggaaacacagcagttggccgcttgatctt	ggggtcaacatgtaagtct	3	0.4836	56°C	500-700
	AGMI73/74	(TC)14	ggctaggaaggttagtggccaaccagagctgcctacg	agggccaagaaactcctcc	4	0.6433	56°C	200-400
	mMaCIR305	-	accaacctaggaaacacagtcctgatcaattcagcca	tatgagcaagaacagccc	3	0.5723	56°C	300-350
BB ¹	mMECIR510	-	gactatgggcgtgagtgcaattggcgttctcttgatg	atggttcggttgaagg	3	0.5674	56°C	100-200
	mMECIR519	-	gactatgggcgtgagtgcatgattcttgctggitttag	cgtaaacactcaggagg	5	0.6189	56°C	100-250
	mMaCIR584	-	gactatgggcgtgagtgcatggagataaggaagagagagagg	ctccaagcacagaagcac	2	0.5891	56°C	100-200
Calcutt4 EST ¹	mMaCIR156	(TG)23	ggctaggaaggttagtggccttctgaaggaaattctgac	agtcagccaatgaa	4	0.4042	56°C	200-250
	mMaCIR151	(CT)21	gactatgggcgtgagtgcaattccacctcctggcac	gccaaacatcacccaac	5	0.6775	56°C	100-200
	mMaCIR241	(TC)20	accaacctaggaaacacagtgctaaagcatcaagtagccc	acgaacaagcaatcaagtag	4	0.6007	56°C	250-300
Média	Geral	-	-	-	4.4	0.614	55.7°C	
	Ouro	-	-	-	4.5	0.615	55.5°C	
	Calcutta 4	-	-	-	4.5	0.6267	55.6°C	
	BB	-	-	-	3.3	0.592	56°C	
	Calcutta-4 EST	-	-	-	4.0	0.561	56°C	

¹Locos utilizados apenas no estudo da diversidade genética entre os acessos, (PIC): Polymorphism Information Content, (Ta): Temperatura de anelamento,(pb): pares de base - amplitude do fragmento no gel de agarose.

O número médio de alelos por *locos* SSR encontrados neste estudo (4,4) é semelhante aos encontrados em outros trabalhos realizados em bananeira (AMORIM et al., 2009; MATTOS et al., 2010).

Os tamanhos dos produtos amplificados por meio dos pares de *locos* SSRs tiveram amplitudes que variaram de 100 a 500 pb (Tabela 3). Esta amplitude dos pares de base encontrados possibilita também o uso de metodologias como PCR/multiplex. Essa técnica é considerada interessante, pois viabiliza a análise de um grande número de amostras, permitindo a caracterização mais rápida de recursos genéticos, e com menor dispêndio de reagentes e tempo para realização do trabalho.

O perfil eletroforético de 14 acessos diploides de bananeira amplificados com o *loco* MaC-CEN52, encontra-se na Figura 4.

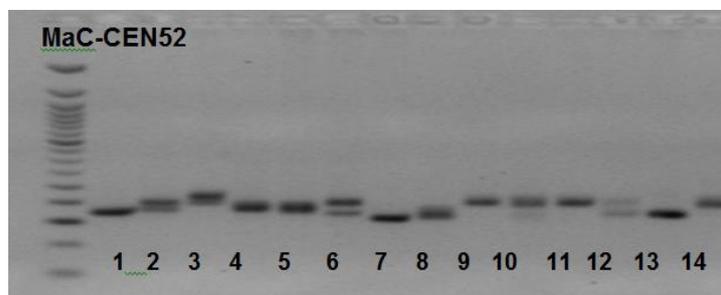


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1000, 3%. M = ladder 100 pb (Invitrogen), *loco* MaC CEN 52. Amostras de 1 a 14: Pa Mysore 3, Calcutta, Birmanle, Niyama Ylk, Tuu Gla, Krasan Salchon, BB Franca, Butuhan, Diploide de Belgica, BB Paraná, Balbisiana Franca, Musa Balbisiana, BB IAC, Ouro (Tabela 1).

Os marcadores SSRs oriundos das bibliotecas de Calcutta 4 e Ouro testados no presente trabalho, podem ser amplamente usados em análise de diversidade genética, estudos de população e mapeamento genético da bananeira. Os altos valores de PIC encontrados demonstram a viabilidade do uso direto desses marcadores dentro do programa de melhoramento da bananeira.

De acordo com a Figura 5 (a e b), 90 e 87%, dos *locos* da biblioteca de Calcutta 4 e Ouro, respectivamente, possuem PIC acima de 0,50.

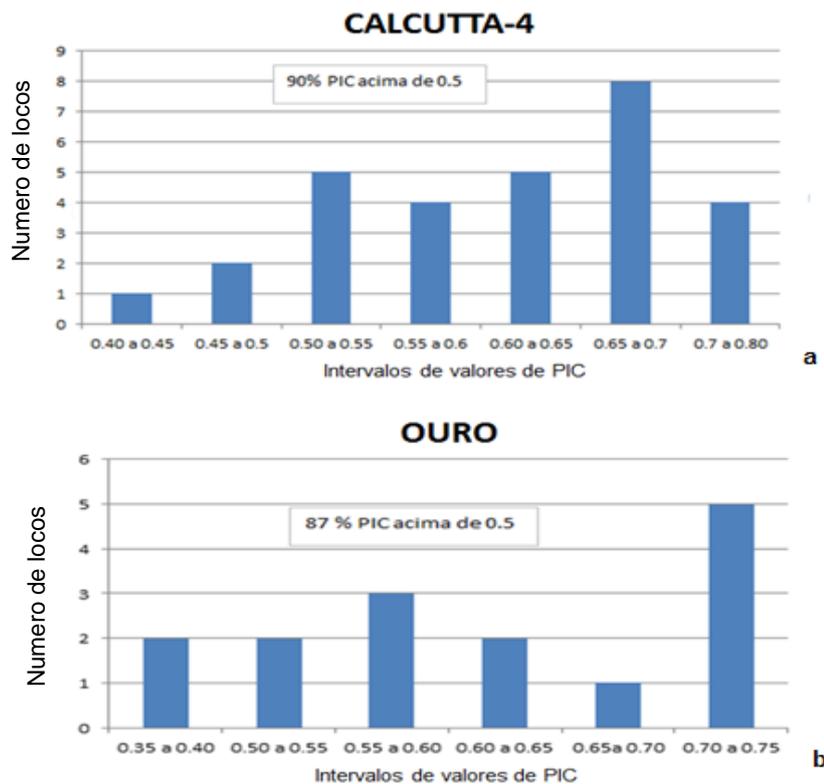


Figura 5 (a e b): Distribuição dos valores de PIC, acima de 0.50 - 90 e 87%, para os *locos* derivados de biblioteca Calcutta 4 e Ouro, respectivamente.

Esse valor é bastante alto e reflete a capacidade de discriminação dos mesmos e a maior variabilidade genética que existe em acessos diploides de bananeira.

Com base na Figura 6, os *locos* da biblioteca Calcutta 4 discriminaram melhor os acessos, onde 49,45% dos pares dos acessos apresentaram dissimilaridade acima de 80%, em comparação com 27,47 % do poder discriminatório dos *locos* da biblioteca Ouro.

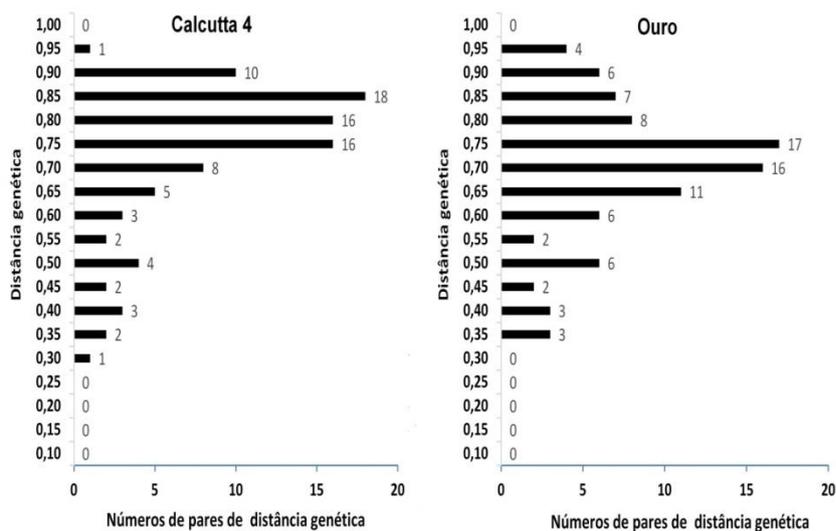


Figura 6. Dissimilaridade entre os pares de acessos utilizando marcadores microsatélites derivado da biblioteca Ouro e Calcutta 4, com base no índice de Nei e Li (1973).

Isso pode ter ocorrido devido ao maior número de *locos* da biblioteca Calcutta 4, e que devido aos altos valores dos PICs, melhor refletiu o seu desempenho no poder discriminatório entre os acessos.

2. Análise da diversidade genética em acessos de bananeira

2.1. Considerando os marcadores microsatélites como dominantes

Dos 134 *locos* SSR testados, 83, 30, 17 e 4 são provenientes de bibliotecas oriundas do diploide selvagem Calcutta 4, da cultivar Ouro, Calcutta 4 (ETS-SSR) e 'Pisang Klutuk Wulung', respectivamente. Destes, 44 foram validados em 30 acessos de bananeira diploides e triploides (Tabela 1) por apresentarem resultados satisfatórios de amplificação, gerando de 3 a 10 alelos por loco (Tabela 2).

Os *locos* que não apresentarem produtos de amplificação para todas as amostras, ou que produzirem bandas muito inespecíficas nos testes conduzidos, foram excluídos do estudo. Entretanto, os mesmos serão validados em outra oportunidade após novas tentativas de otimização das reações.

No total, foram obtidas 224 bandas polimórficas, com média de 5,1 bandas por *loco*; valor que permitiu realizar com eficiência a caracterização dos acessos analisados. O

número médio de alelos por iniciador SSR encontrados neste estudo são semelhantes aos encontrados também por Creste et al., (2004) e Jesus et al (2006).

É possível verificar em estudos presentes na literatura, trabalhos onde o número de marcadores SSRs usados para genotipar acessos distintos de bananeira foram inferiores ou aproximados aos utilizados no presente estudo. Mattos et al. (2010) genotiparam 26 acessos de bananeira com 13 SSRs e 94 alelos. Em estudo recente, Wang et al., (2010) detectaram uma média de 3,76 alelos/*loco* ao avaliar a variabilidade genética em 26 cultivares de bananeira por meio do uso de 21 *locos* SSR. Os trabalhos supracitados demonstram que o presente estudo alcançou resultados satisfatórios por trabalhar com amostragens (numero de acessos e de *locos* microssatélites) significativas para análise de diversidade.

Para o estudo da variabilidade genética de 30 acessos de bananeira utilizando os dados interpretados como dominantes, foi gerado um dendrograma a partir de 44 *locos* e 224 bandas polimórficas (Figura 7).

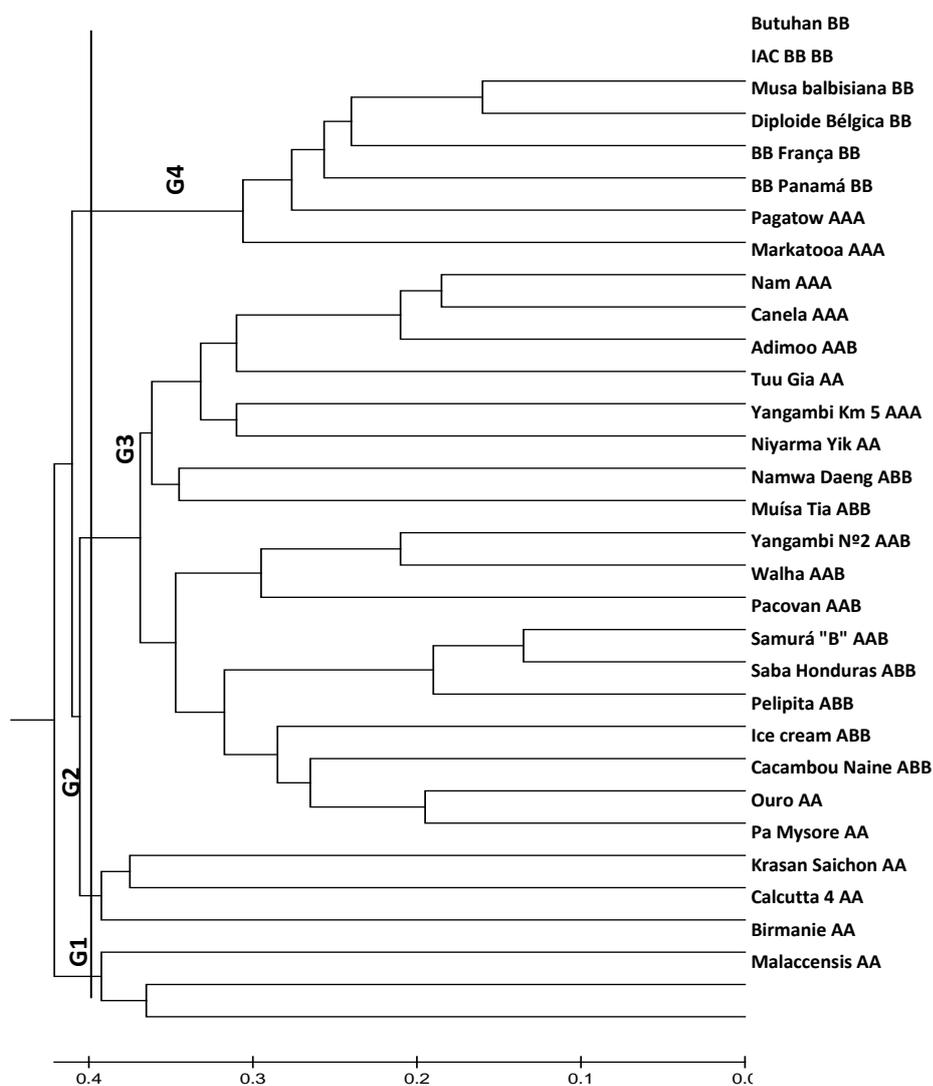


Figura 7. Análise da distância genética entre 30 acessos de bananeira a partir de 44 *locos* e 224 bandas polimórficas. Malaccensis, Birmanie, Calcutta 4, Krasan Saichon, PA Mysore 3, Ouro, Cacambou Naine, Ice cream Havai, Pelipita, Saba Honduras, Samurá "B", Pacovan, Walha, Yangambi N°2, Muísa Tia, Namwa Daeng, Niyarma Yik, Yangambi Km 5, Tuu Gia, Adimoo, Canela, Nam, Markatooa, Pagatow, BB Panamá, BB França, Diploide Bélgica, Musa balbisiana, BB IAC e Butuhan, presentes na tabela 1. O dendrograma foi construído utilizando-se 44 *locos* e 244 bandas polimórficas. A matriz de distância foi gerada utilizando o índice de dissimilaridade genética de Jaccard e o programa GENES (Cruz et al 2003). Os grupos foram formados a partir do método do UPGMA por meio do software STATISTICA (Statistica, 2002).

Com base no ponto de corte seguindo os critérios sugeridos por Mingoti et al. (2005), houve formação de 4 grupos principais: grupo 1 (G1): com três diploides AA; Calcutta AA, Birmanie AA, Malaccensis AA; grupo 2 (G2): com três diploides AA; Ouro AA, PA Mysore 3 AA, Krasan Saichon AA, grupo 3 (G3): com dois diploides e dezesseis triploides; Cacambou Naine ABB, Ice cream (Havai) ABB, Pelipita ABB, Saba Honduras ABB, Samurá "B" AAB, Pacovan AAB, Walha AAB, Yangambi N°2 AAB, Muísa Tia ABB, Namwa Daeng ABB, Niyarma Yik AA, Yangambi Km 5 AAA, Tuu Gia AA, Adimoo AAB, Canela AAA, Nam AAA, , Markatooa AAA, Pagatow AAA e grupo 4 (G4) com seis diploides; BB, Panamá BB, BB França BB, Diploide de Belgica BB, *Musa balbisiana* BB, BB IAC BB e BB Butuhan BB.

De maneira geral, a análise de clusters permitiu separar os acessos de acordo com a constituição genômica. Entretanto, não foi possível agrupar todos os acessos exclusivamente em função da sua ploidia, subgrupo/subespécie e ou procedência, já que dois acessos diploides também agruparam-se com triploides do tipo ABB, AAB ou AAA.

No agrupamento (G1), os diploides (AA) Birmanie, Calcutta 4 e Malaccensis compartilham a mesma ploidia e constituição genômica. Além disso, os acessos Birmanie, Calcutta fazem parte do complexo das subespécies burmannica/ burmannicoides/ siamea e possuem origens no Nordeste da Índia, Burma e Sudeste da China, Tailândia. Este fato, segundo Jesus et al. (2013), justifica o agrupamento, pois são considerados geneticamente próximos da subespécie malaccensis (Península da Malásia).

Os acessos Ouro, PA Mysore 3 e Krasan Saichon agruparam-se no grupo G2, pois possuem mesma ploidia AA. Vale destacar que os acessos PA Mysore 3 e Krasan Saichon compartilham a mesma procedência; ambos originários da Tailândia.

O arranjo do dendrograma permitiu alocar todos os triploides AAA, AAB, ABB no grupo G3, além de dois diploides AA. O triploide Markatooa e Nam agruparam-se por compartilharem semelhantes altura, diâmetro do pseudocaule, diâmetro e peso do fruto, número de frutos, peso do cacho e peso do engaço (MATTOS et al., 2010). Neste mesmo grupo, agruparam-se os acessos Pacovan e Walha que pertencem ao subgrupo Prata

caracterizado por apresentar frutos adocicados, aroma suave, pouco ácida e de digestão leve (MOREIRA, 1999). Resultados semelhantes foram observados por Jesus et al. (2010) ao estudar acessos do subgrupo Prata utilizando marcadores microssatélites.

Os acessos Cacambou Naine, 'Ice Cream, ambos de ploidia ABB agruparam-se no G3. Resultado similar foi encontrado por Brandão et al. (2011) ao analisar a variabilidade genética em acessos de bananeira por meio de caracterização fenotípica. Os acessos Niyarma Yik, Markatooa, Pagatow e Adimoo agruparam-se provavelmente por compartilharem a mesma origem (Nova Guiné), fato que pode sugerir troca de alelos mediante cruzamentos naturais. No G4, foram alocados todos os acessos de ploidia BB. Resultados similares foram observados por Jesus et al. (2013) e Brandão et al. (2011).

Percebe-se, por meio do dendrograma, haver variabilidade genética entre os acessos presentes no BAG-Banana da Embrapa. Este resultado pode estar relacionado às diferentes origens e níveis de ploidia dos acessos analisados. Corroborando com esses resultados, Mattos, (2009) ressalta que não foi possível obter uma perfeita separação entre os acessos em função da presença ou não do genoma B.

Em todos os grupos formados há variabilidade suficiente a ser explorada no programa de melhoramento genético da bananeira. Com relação à distância genética, os acessos Ouro e o Muísa Tia apresentaram maior distância com um valor de 0,93 (Anexo A). Os acessos mais próximos geneticamente foram Pacovan e Walha com valor igual a 0,35, sendo que a média encontrada entre todos os acessos estudados foi de 0,74. Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Mattos, (2009) em que a distância genética média entre os acessos de bananeira foi 0,34, variando de 0,001 para o triploide Pacha Nadan e o diploide Jaran a 0,76 entre os acessos M-48 e Caru. A avaliação da similaridade genética refletida pelos microssatélites em acessos poliploides possui baixo nível de associação com a similaridade real, pois impossibilita uma avaliação conduzida de forma a captar a máxima discriminação com base nos pb dos fragmentos. Entretanto, apesar da avaliação de acessos poliploides via SSRs de forma dominante não possibilitar um alto poder discriminatório devido aos baixos valores de PIC, como acontece com bananeira, ainda é a forma mais adequada de avaliação (CRESTE et al., 2002).

2.2. Considerando os marcadores microssatélites como codominantes

Para a análise de diversidade genética considerando os marcadores microssatélites como codominantes, foram genotipados 14 acessos diploides de bananeira por meio de 44 *locos* (Figura 8).

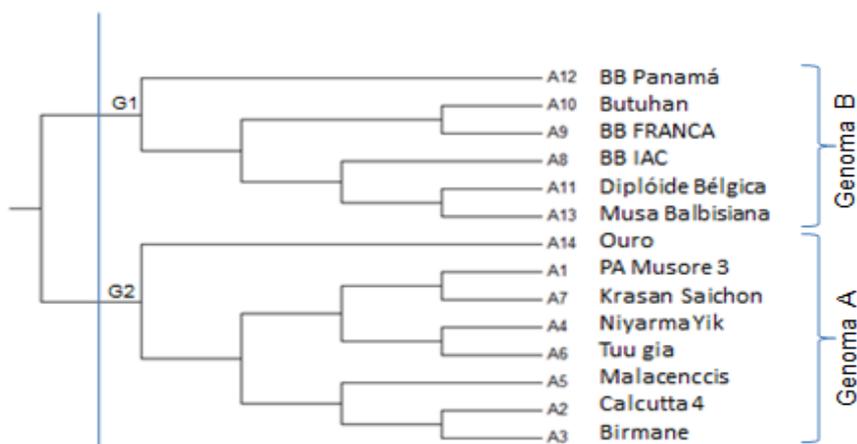


Figura 8: Distância genética entre 14 diploides de bananeira obtida a partir de 44 marcadores microssatélites e 224 bandas polimórficas. A matriz de distância genética foi gerada a partir do índice de Nei e Li (1973), os grupos pelo comando UPGMA por meio do software POWERMARKER (Liu & Muse, 2005).

Houve formação de dois grupos distintos, G1 e G2. O grupo G1 foi formado apenas por acessos de genoma B enquanto o grupo G2 foi formado por acessos de genoma A. Este resultado corrobora como os encontrados por Jesus et al. (2013) onde o mesmo afirma que é possível observar perfeita separação entre os acessos contendo os genomas A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), sendo o resultado esperado por se tratarem de espécies diferentes e a robustez dos marcadores SSR codominantes, mostra ainda que estes locos podem ser usado como sucesso na caracterização do germoplasma de bananeira .

A matriz de dissimilaridade (Anexo B) com base no índice de Nei e Li (1973) foi utilizada para discriminar as distâncias genéticas entre os diploides analisados. Os acessos Diploide Belgica e Calcutta 4, Birmani e Pa Mysore 3 foram os mais dissimilares, 0,85%, e os acessos mais próximos geneticamente, Calcutta 4 e Ouro , com valor igual a 0,32, sendo que a média encontrada das distâncias genéticas entre os acessos foi de 0,68%. Resultados próximos foram encontrados no estudo de Creste (2002) onde os acessos Pa Mysore 3 e Birmani também exibiram maior dissimilaridade genéticas.

Creste et al., (2004) trabalhando com acessos deste mesmo germoplasma, estudaram a diversidade genética existente entre 49 acessos diploides por meio de marcadores SSR e encontraram uma similaridade genética média de 0,10.

Librelon et al. (2013) estudando a diversidade genética de clones de bananeira Prata-Anã, observou que os clones de 'Prata-Anã Gorutuba' e a cultivar Prata-Anã, apresentou a partir da matriz de distância genética gerada, similaridade variando de 0 a 89%, com distância média de 40,77%, revelando elevada variabilidade genética entre os clones e cultivares avaliados.

A variabilidade genética é de fundamental importância para o melhoramento de qualquer espécie (VENKATACHALAM et al., 2007). Amorim et al. (2008) relatam que combinações parentais podem ser identificadas com embasamento na distância genética entre acessos diploides, colaborando com o desenvolvimento de diploides melhorados, tornando acessível nova variabilidade genética para a seleção e impedindo o estreitamento da base genética.

Comparando a análise das distâncias genéticas presentes nas matrizes de dissimilaridade (Anexo A e B) dominantes e codominantes, é possível verificar que a maioria os acessos mantiveram parcimônia nas distâncias genéticas aproximadas, como, Pa Mysore/Calcutta (0,77), Pa Mysore/ Birmame (0,82), e Tu Guia/IAC BB (0,87). Ainda comparando os resultados das distâncias genéticas entre a análise codominante e as análises separada para os bibliotecas Calcutta 4 e Ouro, foi possível perceber que as distâncias genéticas entre os acessos mantiveram-se relativamente constantes.

O reconhecimento da diversidade genética do genoma de *Musa* spp. necessita de atenção especial, visando recolhimento de informações relevantes sobre características agronômicas que podem ser utilizadas em futuros programas de melhoramento da espécie.

CONCLUSÃO

A validação dos 44 *locos* SSR em *Musa ssp.*, mostra que os mesmos podem ser utilizados em estudos moleculares para os acessos avaliados. Os *locos* que não apresentaram produto de amplificação para o genoma em estudo podem ser reavaliados na tentativa de otimizar a PCR. Testes com diferentes gradientes de temperaturas de anelamento podem ser eficazes para aumentar a estringência das análises e, conseqüentemente, possibilitar a amplificação em estudos futuros.

Os marcadores SSR validados neste trabalho mostraram-se eficientes na análise de diversidade genética em *Musa* spp.. Além disso, existe variabilidade genética suficiente entre os acessos avaliados; fato que traz informações importantes para o programa de melhoramento genético e possível desenvolvimento de novas cultivares com o uso de acessos diploides e triploides.

Os marcadores oriundos das duas bibliotecas, tanto do diploide selvagem Calcutta 4 quanto da cultivar Ouro, podem ser usados igualmente em análises de diversidade genética em *Musa* spp.

REFERÊNCIAS

AMORIM, E.P.; REIS, R.V.; AMORIM, V.B.O.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA, S.O (2008). Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 43, n. 8, p. 1045-1052.

AMORIM, E.P.; LESSA, L.S.; LEDO, C.A.S.; AMORIM, V.B. de O.; REIS, R.V. dos ;SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SILVA, S.O (2009). Caracterização agrônômica e molecular de genótipos diploides melhorados de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.1, p.154-161.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA (2009). Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, p136.

BRANDÃO, L, P.; AMORIM, A.P.; SOUZA, CP.F. ; SEREJO, J.A.S.; SILVA, S. O (2011). **Variabilidade Genética em Acessos de Bananeira por Meio de Procedimentos Uni e Multivariados**. Congresso Brasileiro de Melhoramento genético de plantas no Brasil: [anais]. Búzios, 1 CD-ROM, p.4.

BILLOTTE N, LAGODA PJL, RISTERUCCI AM, BAURENS FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54, 277–288. Buhariwalla HK, Jarret RL, Jayashree B, Crouch JH, Ortiz R (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana*. **Molecular Ecology Notes**, v.5, p. 327–330.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL Z. P.de S (2003). Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular técnica 20, EMBRAPA**, p 11.

CRESTE, S. Avaliação da variabilidade genética em *Musa* spp. utilizando marcadores microssatélites. (2002). **(Tese de Doutorado)** - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.86.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S. de O.; FIGUEIRA, A (2003). Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica, Wageningen**, v.132, n.3, p.259-268.

CRESTE, S.; NETO,A.T.; VENCOVSKY, R.; SILVA, S.O.; FIGUEIRA, A (2004). Genetic diversity of *Musa* diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.51, n.7, p.723-733.

CRESTE, S.; BENATTI, T.; ORSI, M.R.; RISTERUCCI, A.M.; FIGUEIRA, A. (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n.2, p.303-306.

CROUCH, H.K.; CROUCH, J.H.; JARRET, R.L.; CREGAN, P.B.; ORTIZ, R. (1998). Segregation at microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. **Crop Science**, Madison, v.38, n.1, p.211-217.

CRUZ, C. D. **Programa GENES** (2006.) aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, v.1 p.442.

D' HONT, DENOEUDE, F., JEAN-MARCAURY, BAURENS, F-C et al (2012) The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants, **Nature**, v .488, n. 7410, p. 213–217.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15.

DUTRA FILHO, J.A; RESENDE. L.V; BASTOS, G.Q; SIMÕES NETO, D.E¹; MACHADO P.R (2013). Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n. 1, p. 141-149.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITES NATIONS FAO. Database (2014). United States: FAO/FAOSTAT. Disponível em: [<http://faostat.fao.org>]. Acessado em 12 de junho, 2014

FAURÉ, S.; NOYER J.L.; HORRY, J.P. ; BAKRY, F.; LANAUD, C.; GOÑZALEZ DE LEÓN D. A (1993). Molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). **Theor Appl Genet**. v. 87,n. 4, p. 517–526

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília: **EMBRAPA – CENARGEN**, p. 220.

HIPPOLYTE I, BAKRY F, SEGUIN M, et al.(2010) A saturated SSR/DArT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 65.

JENNY, C.F.; CARREEL, F.; TOMEKPE, K.; PERRIER, X.; DUBOIS, C.; HORRY, J.P.; MONTCEL, H.T (1999) Les bananiers. In: HAMON, P.; SEGUIN, M.; PERRIER, X.;

GLAZMAN, J.C. (Ed). Divesité génétique des plantes tropicales. **Montpellier: Cirad**, p.113-139.

JESUS, O.N. de. ; CÂMARA, T.R.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S. O; PESTANA, K.N.; SOARES, T.L (2006). Diferenciação molecular de cultivares elites de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n. 12, p.1739-1748.

JESUS, O.N.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O.; CAMARA, T.R.; SOARES, T.L.; PESTANA, K.N (2009). Characterization of recommended banana cultivars using morphological and molecular descriptors. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 9, n. 2, p.164-173.

JESUS, O.N. (2010). Caracterização Molecular de acessos de bananeira do banco de germoplasma de Embrapa. (**Tese de Doutorado**), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', p 137.

JESUS, O.N., SILVA, S.O., AMORIM, E.P., FERREIRA, C.F., CAMPOS, J.M., SILVA, G., FIGUEIRA, A (2013). Genetic diversity and population structure of Musa accessions in ex situ Conservation. **BMC Plant Biology**, v. 13, p.1, doi:10.1186/1471-2229-13-41.

LAGODA, P.J.L.; NOYER, J.L.; DAMBIER, D.; BAURENS, F.C.; GRAPIN, A.; LANAUD, C (1998). Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, n.5, p.657-666.

LIBRELON, S. S; COSTA, M, R; NIETSCHKE, S.; PEREIRA, M. C. T.(2013). Diversidade genética de clones de bananeira 'Prata-Anã' (AAB) por meio de marcadores SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura** ,v.35, n. 3, p. 809-817.

LIU K., MUSE S.V (2005). Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics** ,v. 21, n. 9, p. 2128-2129.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A (2013). Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.48, n. 11, p. 1457-1463.

MATTOS, L. A (2009). Caracterização de acessos de bananeira. (**Dissertação de mestrado**). Universidade Estadual de Feira de Santana. Departamento de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, p. 96.

MATTOS, L. A.; AMORIM, E. P.; AMORIM, V. B. de. O.; COHEN, K. de. O.; SILVA, de S. O (2010.). Agronomical and molecular characterization of banana germplasm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.45, n. 2, p.146-154.

MATTOS, L. A.; AMORIM, E. P.; COHEN, K. O.; AMORIM, T. B.; SILVA, S. O (2010) Agronomical, physical and chemical characterization of banana fruits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 225-231.

MBANJO, E. G. N.; TCHOUMBOUGNANG, F.; NYINE, M.; DOCHEZ, C.; LORENZEN, J. **An EST-Based SSR genomic resource for bananas** (2009). International Plant and Animal Genomes XVII Conference, San Diego, CA, USA.

MOREIRA, R. S (1999) **Banana teoria e pratica de cultivo**. São Paulo: Fundação Cargill, 2ª edição, 335p.

MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ D, HUBERT O, SABAU X, CHILLET M, FILS-LYCAON B, BAURENS FC (2007) Use of suppression subtractive hybridization approach to identify genes differentially expressed during early banana fruit development undergoing changes in ethylene responsiveness. **Plant Science**, v. 172, p. 1025-1036.

MINGOTI S. A. (2005). Análise de dados através de métodos de estatística multivarida: uma abordagem aplicada, Editora **UFMG**, Belo Horizonte, p. 155-255.

NEI, M. AND W.-H. LI (1973) Linkage disequilibrium in subdivided populations. **Genetics** v. 75, p. 213-219.

PEREIRA, V. M. (2011).Variabilidade Genética Utilizando Marcadores SSR e Comportamento Agrônômico de Diploides Melhorados de Bananeira. (**Dissertação de mestrado**). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias Cruz das Almas – Bahia, p. 71

POWELL, WALTER W., KENNETH KOPUT, AND LAUREL SMITH-DOERR. (1996). "Interorganizational Collaboration and the Locus of Innovation: Networks of Learning in Biotechnology." **Administrative Science Quarterly** ,v. 41, n. 1, p. 116–45.

SILVA, S. de O.; SHEPHERD, K.; ALVES, E. J.; DANTAS, J. L. L.(1999). Cultivares de banana. In: ALVES, E. J. A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais 2. ed. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p.85-105.

SILVA, S. O.; MORAIS, L. S.; SANTOS-SEREJO, J. A (2005). **Melhoramento Genético de Bananeira para Resistência às Doenças**. In: ROMANO R.; RAMOS, R. R. S (eds). Recursos Genéticos Vegetais no Estado da Bahia. UEFS. Feira de Santana, p.49-67.

STATISTICA (2002) **STATISTICA** for Windows v. 6.0: Computer Program Manual. Editora StatSoft Inc. Tulsa, UK (CD-Rom).

ULHOA, B. A; PEREIRA, P.T; SILVA. R. N; RAGASSI, C. F. RODRIGUES,_R; PEREIRA, M.G; REIFSCHNEIDE, F, J.B (2014). Caracterização molecular de linhagens de pimenta do tipo Jalapeño amarelo .**Horticultura Brasileira**, v.32, n. 1, p. 35-40.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R.V.; BHAGYALAKSHMI, N(2007). Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso,v .10. n. 1, p.106-113.

WANG, J.Y.; ZHENG, L.S.; HUANG, B.Z.; LIU, W.L.; WU, Y.T (2010). Development, characterization, and variability analysis of microsatellites from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Gatersleben, v.57, n. 4, p.553- 563

Capítulo 2

Screening de acessos do Banco de germoplasma de Bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura por meio de marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Fragment*)

**Screening de acessos do Banco de germoplasma de Bananeira da Embrapa
Mandioca e Fruticultura por meio de marcadores SCAR (*Sequence
Characterized Amplified Fragment*)**

Autora: Patrícia Reis de Oliveira Silva

Orientador (a): Prof^a. Dra Cláudia Fortes Ferreira

Coorientador (a): Prof. Dr. Edson Perito Amorim

Coorientador (a): Dr. Onildo Nunes de Jesus

RESUMO: A banana é a fruta mais consumida no mundo, sendo fonte de nutrientes e de relevante importância econômica e social. No Brasil, a produtividade da cultura ainda é baixa, considerando o potencial das cultivares, devido principalmente à incidência de pragas e doenças. Uma das mais agressivas doenças que afetam a cultura é a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O objetivo do presente trabalho foi realizar um *screening* de potenciais acessos com tolerância a Foc raça tropical 4 (RT 4) e avaliação de nanismo em bananeiras presentes no BAG-Bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura usando *primers* SCAR. Inicialmente foram testados dois *primers* SCAR (Sca S0901 e Sca U1001) para resistência a Foc RT 4. O resultado deste estudo revelou que o *primer* SCAR Sca U1001 foi eficiente nas análises, sendo capaz de discriminar os indivíduos resistentes dos suscetíveis, apresentando a banda no tamanho esperado em 36,6 % dos acessos avaliados. Já o *primer* Sca S0901 foi monomórfico, apresentando a marca em 90 % dos acessos. Dessa forma, esse *primer* SCAR não permitiu a identificação correta dos acessos. Em relação ao *primer* usado na avaliação de acessos portadores do gene *dw1/dw2* responsável pelo nanismo em *Musa spp.*, não houve a formação de produtos de amplificação. Esse resultado seria esperado apenas para os acessos de porte baixo (anões), e não todos os acessos presentes no BAG-Bananeira devido à variabilidade presente e as diferentes origens dos acessos. Sendo assim, apenas o SCAR Sca U1001 apresentou resultados favoráveis, o que permitiu construir a “*core collection*” preventiva com acessos promissores para resistência a Foc RT 4.

Palavras chave: *core collection* preventiva, fusariose, resistência.

Screening of accessions of BAG-Banana Embrapa Mandioca and Fruticultura by markers SCAR (*Sequence Characterized Amplified Fragment*)

Author: Patrícia Reis de Oliveira Silva

Advisor: Prof^a. Dr^aCláudia Fortes Ferreira

Co-advisor: Prof. Dr. Edson Perito Amorim

Co-advisor: Dr. Onildo Nunes de Jesus

ABSTRACT: Banana is the most consumed fruit in the world and source of nutrients and relevant economic and social importance. In Brazil, yield is still low, considering the potential of cultivars, mainly due to the incidence of pests and diseases. One of the most aggressive diseases that affect this crop is fusarium caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. spp. *cubense*. The objective of the present work was to perform the screening of potential banana accessions with possible tolerance to Foc tropical race 4 (RT 4) and evaluation of dwarfism in banana plants present in the BAG-Banana of Embrapa Mandioca e Fruticultura using SCAR *primers*. Initially two SCAR *primers* (Sca S0901 and Sca U1001) were tested for possible resistance to Foc RT 4. The result of this study revealed that SCAR primer Sca U1001 was efficient in the analyzes, being able to discriminate susceptible from resistant individuals, with a band present at the expected size in 36.6% of the evaluated accessions. However, primer Sca S0901 was monomorphic presenting the band in 90% of accessions. Thus, this SCAR marker did not allow the correct identification expected. Regarding the primer linked to the *dw1 / dw2* gene responsible for dwarfism in *Musa* spp., there were no amplification products. This result would be expected only if all accessions were dwarf, but due to the different origins and the variability present in the banana germplasm bank, it was expected. Therefore, only SCAR Sca U1001 showed favorable results which allowed to develop a preventive "core collection" accessions with possible resistance to Foc TR 4.

Key words:, preventive core collection, fusariose,,resistance ,

INTRODUÇÃO

A banana é uma fruta tropical de grande importância, pois é alimento básico, tanto para a população de áreas urbanas quanto de áreas rurais. O seu plantio é bastante significativo nos sistemas agrícolas, principalmente das zonas agroecológicas dos trópicos (AZEVEDO et al., 2010).

A cultura da bananeira é dentre as atividades agrícolas, uma das mais expressivas econômica e socialmente no Brasil. Assim como ocorre em diversas espécies cultivadas, a bananicultura é comprometida por vários problemas fitossanitários, entre os quais a fusariose, ou mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), considerada uma das moléstias mais devastadoras da bananeira (SUTHERLAND et al., 2013, HADDAD et al., 2011, PLOETZ et al. 2006).

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* é classificado por 3 raças fisiológicas conhecidas, a citar: 1, 2 e 4, onde a raça 1 infecta bananeiras da variedade Maçã e Gros Michel. A raça 2, bananas da variedade Bluggoe e plátanos (também conhecidas como bananas da Terra). A raça 4 infecta variedades do subgrupo Cavendish e foi dividida em subtropical e tropical para diferenciar populações que afetam essas variedades em condições subtropicais ou tropicais, onde a raça 4 é considerada uma das raças mais devastadoras em plantios de bananeira no mundo (SUTHERLAND et al., 2013, PLOETZ, 2006). A Fusariose raça tropical 4, foi descrita no início da década de 1990 no Sul da Ásia, e ainda não ocorre no Brasil (MATOS, et al. 2012).

Apesar da Foc RT 4 ainda não estar presente no Brasil, a mesma vem causando danos irreparáveis nos países asiáticos (MOORE et al., 1993, MOLINA et al. 2009) e mais recentemente na África ([IITA press release, 2014](#)). As principais cultivares de bananeira plantadas no País, Prata-Anã, Pacovan e Maçã, são suscetíveis a Foc RT 4 e ocupam mais de 80 % da área cultivada.

O aparecimento de novas raças de Foc é motivo de preocupação constante para a bananicultura mundial (SUTHERLAND et al., 2013, PLOETZ 2006, PLOETZ, 1990), uma vez que o patógeno pode sobreviver no solo por um período superior a 20 anos, por meio de estruturas denominadas de clamidósporos (STOVER, 1990).

Com relação à importância da fruta, o seu cultivo enfrenta dificuldades devido à falta de variedades comerciais produtivas que apresentem, conjuntamente, além da resistência às principais doenças e pragas, como o mal-do-Panamá, características agrônômicas desejáveis e aceitabilidade pelo mercado. Diante das muitas questões relacionadas à qualidade e a resistência dos frutos da bananeira a diversas doenças, faz-se necessário a obtenção de variedades com características desejáveis, que venham reduzir as perdas no cultivo e atender as exigências de mercado.

Uma alternativa que vem sendo utilizada com sucesso para sanar tais entraves, é a tecnologia dos marcadores moleculares. O emprego dessas metodologias possibilita acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético podendo promover grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas (GUIMARÃES et al. 2009) e também serem usados na identificação de genes de resistência (WANG et al., 2012, BERALDO et al., 2009, RAMAGE et al., 2004).

Dentre as muitas classes de marcadores moleculares, as do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) são consideradas interessantes, pois são marcadores amplificados com *primers* específicos baseados em sequências geralmente já caracterizadas e mapeadas (PARAN & MICHELMORE, 1993). Estes *primers* são obtidos da conversão de outros marcadores, muitos deles a partir dos marcadores RAPD (SCOTTI et al., 1998).

Na literatura existem vários trabalhos com abordagens diferenciadas que utilizam marcadores SCAR em bananeira (RAMAGE et al. 2004, JAVED et al. 2004, NWAUZOMA et al. 2011, SUPRASSANA et al., 2008, DAMASCO et al., 1998, WANG et al. 2012). O trabalho de Wang et al. (2012) serviu de base para os nossos estudos, onde os autores demonstraram a presença da banda de marcador SCARs na identificação precoce de 'Williams 8818-1' e Goldfinger com resistência à Foc RT 4 e sua ausência em variedades de Gros Michel e Grande Naine, suscetíveis a Foc RT 4.

As informações encontradas no trabalho aqui apresentado, serão de grande valia para o programa de melhoramento da bananeira - PMB, em especial no que se diz respeito a iminente ameaça de entrada da Foc RT 4 no País. A construção de uma "core collection" com indicação de acessos com possível resistência a Foc RT 4 contribui com informações relevantes que poderão ser

utilizadas tanto pelos países onde a doença já ocorre, quanto para o Brasil, dada a chegada da doença, portanto, criada com caráter preventivo.

Assim sendo, este trabalho teve por objetivo realizar um *Screening* em acessos do BAG-Bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura por meio de marcadores SCAR para predição de indivíduos possivelmente resistentes a Foc RT 4 e porte reduzido, e posterior construção de uma “*core collection*” com indicação de acessos a serem utilizados no Programa de Melhoramento da Bananeira – PMB.

METODOLOGIA

Material genético

Foram utilizados 276 acessos da coleção de germoplasma de bananeira (BAG-Bananeira) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, incluindo acessos diploides selvagens e cultivados, tri- e tetraploides. Vale a pena ressaltar que essa coleção é uma das mais representativas da variabilidade genética de *Musa* spp. do mundo.

Marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*)

O *screening* de potenciais acessos com resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp cubense, Foc RT 4 e para nanismo, foi conduzido utilizando-se dois marcadores SCAR identificados por Wang et al. (2012) e um identificado por Damasco et al. (1996), para resistência a Foc e nanismo, respectivamente. Os *primers* SCAR utilizados no trabalho de Wang et al. (2012) (Tabela 1) foram depositados no banco de dados GenBank, com os seguintes números de acesso: HQ613949 e HQ613950, Sca U1001 e Sca S0901, respectivamente. Quanto ao trabalho de Damasco et al. (1996), o *primer* RAPD cuja sequência foi transformada em marcador SCAR, foi o OPJ-04, com sequência 5´CCGAACACGG 3´; trabalho também validado por Suprasanna et al. (2008), que serviu de base para os nossos estudos.

Tabela 1: Marcadores SCAR e *primer* do gene 18S rRNA utilizados no *screening* de 276 acessos pertencentes ao BAG-bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura para possível resistência a Foc RT 4.

SCAR	Ta °C	Pb	Sequência	Referência
Sca U1001	66.00	1694	AAC TCG GCA CTC GAA GAA GAC ACA T	Wang, (2012)
Sca U1001	63.00	-	ACC TCG GCA CTA TTA CCC ATC AT	Wang, (2012)
Sca S0901	57.00	1429	TCC TGG TCC CAG TAC AAA TAC	Wang, (2012)
Sca S0901	60.00	-	TCC TGG TCC CTC TGA ATT TTC	Wang, (2012)
<i>dw1/ dw2</i>	51.3/53.2	1500	5' CTG TGG TTG CAT TCT CAT AC- 3'/5'-CTG AAT CAT ACT CGC GAA CC-3'	Damasco et al. 1996
18S r RNA <i>gene</i>	54.5	500	5'-CAT CAC AGG ATT TCG GTC CT-3'	Ramage et al. 2004 (2012)
18S rRNA <i>gene</i>	55.5	500	5'-AGA CAA ATC GCT CCA CCA AC-3'	Ramage et al. 2004

Extração de DNA e PCR

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas jovens de bananeiras coletadas no campo, empregando o método CTAB proposto por Doyle e Doyle (1990) e quantificado em gel de agarose 1%.

As reações de amplificação foram completadas para o volume final de 25 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, 20 ng de DNA genômico e uma Unidade de Taq DNA polimerase. As amplificações foram conduzidas em termociclador da Applied Biosystems (ABI), Veriti 96-well Thermal Cycler. A condição de amplificação incluiu um ciclo de desnaturação de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 30s a 94°C, anelamento com a temperatura (Ta) específica de cada primer, 1 min. de extensão a 72°C, com uma extensão final de 14 min. a 72°C ∞.

Um PCR Multiplex também foi usado com um primer adicional que amplifica o gene 18S rRNA de *Musa acuminata*, sendo utilizado como controle da amplificação via PCR. A sequência do mesmo está depositada no *GenBank* com o número de identificação: U42083.

Eletroforese e detecção de polimorfismo

Os fragmentos foram separados em géis de agarose 1.5% (Invitrogen) sob condições padrão e os produtos da amplificação corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

Análise dos dados

As imagens obtidas dos géis foram digitalizadas em fotodocumentador Vilber Lourmat e os fragmentos amplificados via marcadores SCAR, interpretadas na forma de presença-resistente (1) ou ausência-suscetível (0) a Foc RT 4 (Wang et al. 2012).

1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A raça Foc RT 4 é considerada a mais importante ameaça à bananicultura global. A estimativa é que mais de 80 % das bananeiras cultivadas sejam suscetíveis a esta raça. O monitoramento da introdução da Foc RT 4 no Brasil é bastante relevante para a sustentabilidade da cultura da bananeira (MATOS et al, 2012, HADDAD et al., 2011).

No presente trabalho, dois marcadores SCAR, Sca S0901 e Sca U1001, que mostraram-se eficientes no trabalho de Wang et al. (2012) para resistência a Foc RT 4, foram testados em 276 acessos pertencentes à coleção de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

1.1 Sca S0901

Para o *screening* com o *primer* Sca S0901 em nosso trabalho, a banda no tamanho de 1429 pb esperado, esteve presente em mais de 90 % dos acessos analisados (dados não apresentados).

Para investigar possíveis erros nesse resultado, vários testes foram conduzidos de forma a otimizar as reações de PCR na tentativa de comprovar a não existência de erro laboratorial. Foram então estabelecidas experimentalmente novas condições de reação, tanto para as temperaturas de anelamento, quanto para as concentrações de cada componente da reação de PCR. Entretanto, este resultado foi encontrado repetidamente para esse *primer*.

Além dos testes supracitados, foi usado também o *primer* do gene 18S rRNA como controle de reação, mas infelizmente a reação de amplificação não funcionou. Esse resultado reforça observações feitas por Ramage et al. (2004), onde os autores comentam que as reações em multiplex (com o gene 18 S rRNA

de *Musa* spp.) são muito sensíveis e podem não serem bem sucedidas devido a essa sensibilidade e até mesmo em relação ao explante utilizado (necessidade de extração de DNA de folhas jovens).

Ainda considerando os dados dos perfis eletroforéticos para o marcador Sca S0901, os acessos (Azedinha), (PV 42-114), (YB 42-47), não apresentaram a banda, mostrando, a princípio, que esses acessos seriam considerados suscetíveis à Foc RT 4. Entretanto, a ausência de polimorfismo, fato ocorrido pelo aparecimento da banda em mais de 90 % dos acessos, não é um resultado esperado, uma vez que os acessos presentes no BAG-Bananeira possuem origem de vários locais do país e do mundo, com diferentes níveis de resistência e suscetibilidade a diversas doenças inclusive à Foc RT 4.

Diante dos perfis eletroforéticos obtidos com o marcador Sca S0901 (Figura 1), pode-se inferir que o mesmo apresentou baixa confiança, uma vez que o marcador mostrou-se praticamente monomórfico nos 276 acessos de *Musa* spp. testados.

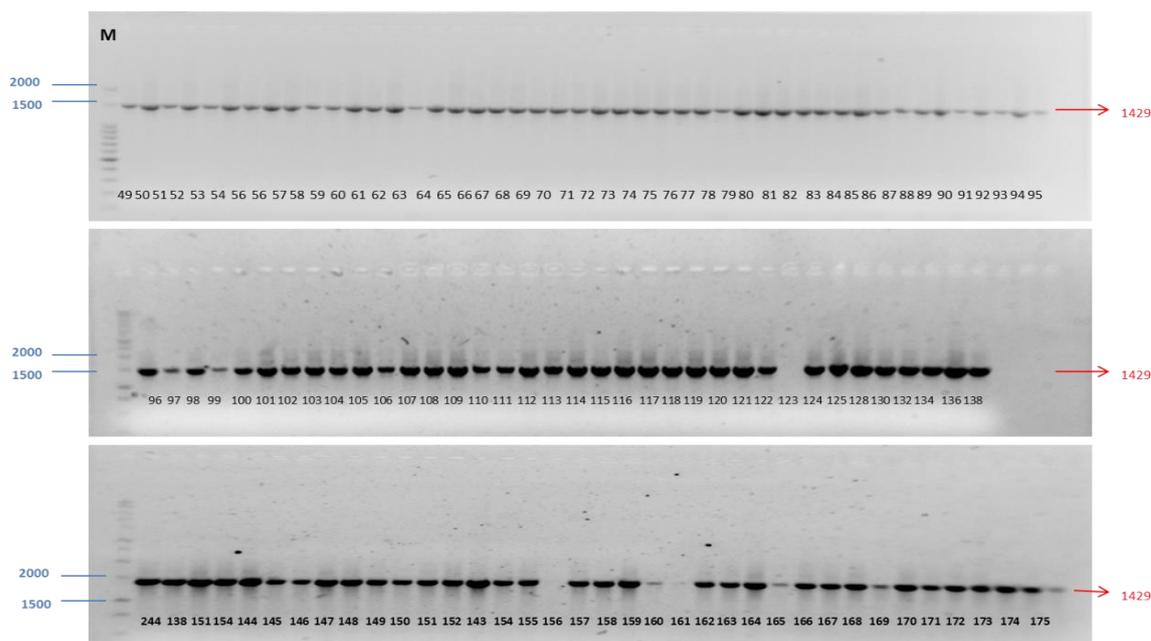


Figura 1: Perfil eletroforético primer Sca U0901 em gel de agarose 1,5%. Amostras 1 a 147 (Tabela 3). Seta vermelha: *Primer* Sca U0901, com 1429 pb; M = Ladder de 100 pb e 1Kb (Invitrogen™).

1.2 Sca U1001

A amplificação com o marcador SCAR Sca U1001, com tamanho de fragmento de 1694 pb, apresentou resultados bastante satisfatórios. Dos 276 acessos testados, 36,6 % apresentaram perfis eletroforéticos com presença da banda, o que indica presença de acessos com possível resistência a Foc RT 4. Este resultado é validado com a visualização da marca ligada ao *gene* 18S rRNA (seta verde) que mostra a qualidade da reação.

O perfil eletroforético do primer Sca U1001 e *gene* 18S rRNA em 143 acessos do BAG-Bananeira encontram-se na Figura 2.

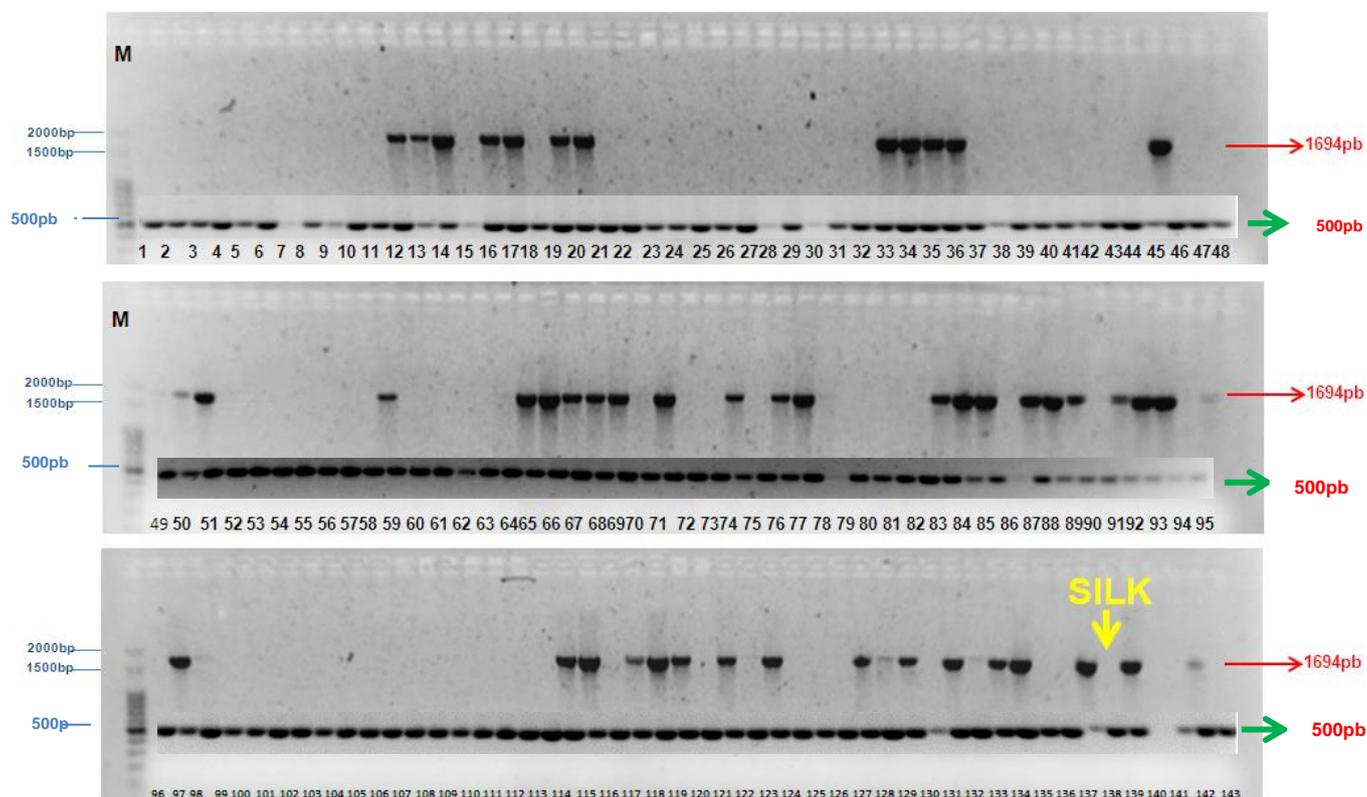


Figura 2: Perfil eletroforético do primer Sca U1001 em gel de agarose 1,5 %. Amostras 1 a 145-acessos pertencentes ao BGB. Seta vermelha: *Primer* Sca U1001, com 1649 pb-tamanho do fragmento esperado para o marcador ; Seta amarela: Maça Caule Roxo – controle de suscetibilidade a Foc. M = Ladder de 100 pb (Invitrogen™).

Com o uso do Sca U1001, onde a banda responsável pela resistência a Foc RT 4 apareceu em 36,6 % dos acessos, permitiu a criação da primeira “core collection” preventiva para a Foc RT 4 no País(Tabela 2).

Tabela 2: Acessos do BAG-Bananeira com possível resistência a Foc RT4. “Core collection” preventiva com base no marcador Sca U1001.

Nº	Genótipo	Nº	Genótipo
1	Jambi	52	Ouro da Mata FrancoFRF
2	Khae	53	Platina IAC
3	Khae Prae	54	PV42-68
14	Pisang Nangka	65	Pacovan
4	Khi Maeo	55	Introduzir (Njock Kon)
5	Khai Nai On	58	Adimoo
6	Lateína BT-100	57	Eslesmo
7	M48	58	Kune
8	Nº 118	59	Macaubal "A(FRF 1302"A")
15	Pisang Nangka	66	Pachanadan
16	SF-751	67	Walha
17	AAA desconhecida	68	Prata Anã
18	Ambei	69	Java IAC
19	Amritsagar	70	PV42-114
20	Bakar	71	Prata Anã Batico FRF
21	Canela	72	Prata Pacovan FRF
23	Caru Roxo	73	Samurá "B"
24	Cocos	74	Balbisiana Franca
25	Grande Naine IAC FRF	75	Balbisiana Franca
26	Grande Naine P.Formoso	76	Prata Jussara IAC FRF
27	FHIA 02	77	Monthan
28	PA 42-44	78	Pioneira
29	PV42-53	79	Calypso
30	YB42-47	80	Figue Pome Naine
31	Japira	81	JV42-44
32	Bucanero (Buccaneer)	82	Maravilha
33	Kongo FRF 1286	83	Curare Enano
34	Lacatan	44	D'Angola
35	Lacatan 47	85	PV 42-129
36	Maída	86	Princesa (YB42-07)
37	Markatooa	87	Pinha
38	Meywarvey	88	Vitoria
39	Muga	89	Chifre de Vaca
40	Nam	90	Comprida
41	Nanica	91	PV94-01
42	Nanição Franco Rio Claro	92	Preciosa (PV42-85)
43	Nanição Taperão FRF	93	Curare Enano
44	Torp	94	EX 33 (Prata Anã)
45	Tugoomomboo	95	Mongolo
46	Walebo	96	Padath
47	Wasolay	97	Prata Anã 3
48	Who-Gru	98	Prata Anã Rene FRF (1285)
49	Yangambi Km 5	99	Prata Branco
50	Azedinha	100	D'Angola
51	Ouro da Mata	101	Pinha

Em nosso trabalho, o acesso Maçã e Maçã Caule Roxo, controle para suscetibilidade a Foc R 1, não apresentou a banda referente ao gene que confere resistência; resultado esperado, uma vez que a resistência a Foc R1 é monogênica (JAVED et al, 2004) e possivelmente alguns poucos genes possam estar envolvidos na resistência a Foc RT 4.

Não era esperado o aparecimento da banda para os acessos pertencentes ao subgrupo Cavendish (Nanição Franco Rio Claro, Nanição Taperão FRF, Grande Naine IAC FRF e Grande Naine P. Formoso). Entretanto, esses acessos

são considerados mutações da banana Nanica e Grande Naine, respectivamente; ambas suscetíveis a Foc R1, e esse resultado está de acordo com o trabalho de Wang et al. (2012), onde os autores encontraram a banda do marcador SCAR em um mutante de variedade Williams-8818 (suscetível a Foc RT 4), o Williams 8818-1 (resistente a Foc RT 4).

Vários trabalhos com marcadores SCAR em programas de melhoramento são encontrados na literatura.

Hittalamani et al. (1995), utilizaram o marcador SCAR (SAP) para identificar plantas de arroz com gene de resistência ao acamamento. Esses autores encontraram resultados consistentes, verificando que a identificação dessas plantas utilizando um par de primer, foi de 100%.

A acurácia dos marcadores SCAR pode ser verificada nos estudos de Beraldo et al. (2009), onde os *primers* analisados (SB12, SY20, SH18, SAS13, SAB3, SZ20), foram totalmente eficientes na detecção de genes de resistência à antracnose em feijoeiro. Os autores salientam que é necessário realizar as inoculações com o patógeno para confirmar a possível resistência ou suscetibilidade do genótipo frente ao patógeno.

Zaccaro et al. (2007) analisando a eficácia de marcadores SCAR na identificação de isolados do *Fusarium subglutinans*, verificaram que dos quatro marcadores testados (Fs 4, Fs 5, Fs 14 e Fs 15), os três primeiros mostraram especificidade e apresentaram a banda no tamanho esperado. Assim, qualquer um dos três *primers* poderá ser utilizado na identificação do fungo *F. subglutinans* causador da malformação da mangueira.

Rodrigues (2011) ao usar três pares de *primers* SCAR derivados de um marcador AFLP verificou que dos três *primers* analisados, dois foram monomórficos e um não amplificou quando avaliados em indivíduos resistentes e suscetíveis à virose do mosaico dourado em feijão caupi de uma população F₂. Segundo o autor, este resultado ocorreu devido a problemas no sequenciamento, levando a uma limitação no uso dos marcadores desenvolvidos.

Srivastava et al. (2013) desenvolveram e validaram o marcador SCAR SCOPAK12 na predição de genótipos de cana tolerantes a seca. Segundo os autores, foi possível identificar genótipos comerciais e selvagens tolerantes a seca. De acordo com os autores, este marcador poderá ser utilizado na predição

destes genótipos e futuramente poderão ser usados em programas de melhoramento para o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes.

No estudo de Alkimim et al. (2013) trabalhando com resistência à ferrugem do cafeeiro, os autores obtiveram resultado satisfatório, no qual foram validados para SAM os marcadores SCARM18, SCARM20 e SCARM23, e poderão ser usados no monitoramento dos genes nas diferentes gerações e cruzamentos.

Carneiro (2014), trabalhando com alelos de resistência ao *Potato leafroll virus* (PLRV) em germoplasma de *Solanum tuberosum* (batata), observou que ao utilizar o marcador SCAR RGASC850 em clones (batata), que apenas 31 % apresentaram a banda que confere resistência ao vírus, resultado que difere do esperado, de 86% dos clones apresentando a banda, já que um dos genitores possui o alelo (R_{ladg}) ligado à resistência em condição duplex. Segundo eles, esse fato ocorreu devido a uma possível otimização incorreta da PCR ou ainda a ausência de banda que poderia indicar um falso positivo que teria ocorrido devido a possíveis eventos de recombinação, já que existe uma pequena possibilidade de permuta entre o gene de resistência e o marcador.

No estudo de Beraldo et al. (2009) usando marcadores SCAR, o primer SCARZ 04 não mostrou polimorfismo entre o padrão de amplificação dos acessos resistentes e dos susceptíveis à antracnose, mesmo após a otimização das reações. Este resultado explica a ineficiência desse marcador ao identificar e selecionar acessos resistentes e susceptíveis. Sendo assim, o referido marcador foi excluído das análises do programa de melhoramento do feijão do IAC.

Oliveira et al (2007) utilizaram o marcador SCAR W11 e verificaram a ineficiência do mesmo na predição do sexo em plantas de mamoeiro. Segundo os autores, este resultado pode ter ocorrido devido ao primer encontrar-se afastado dos genes que proporcionam a diferenciação sexual do mamão, tendo em vista que foram encontradas tanto plantas falso-positivas quanto falso-negativas em todas as cultivares avaliadas. Ao utilizarem o primer SCAR Cf, encontrou-se alto percentual de erros na genotipagem, o que limita o uso do mesmo, sendo possível inferir que existe baixo potencial de uso desse marcador para a predição do sexo do mamoeiro de forma precoce nestes genótipos.

Em bananeira, os marcadores SCAR vem sendo usados para diferentes objetivos com diversos resultados. Ramage et al. (2004) realizaram teste de PCR usando os marcadores SCAR B1 e B2 em associação com o gene 18S rRNA,

para a detecção precoce de indivíduos do tipo anão em plantas micropropagadas de (*Musa spp.* AAA). Segundo os autores, foi possível verificar que a técnica PCR/multiplex disponibilizou um método confiável e reprodutível para a detecção da bananeira tipo anão. No entanto, os autores ressaltam que a mesma é bastante sensível ao tipo de material escolhido para a análise, necessitando de material jovem, caso contrário, a reação PCR fica sujeita a falhar.

Nwauzoma et al. (2011) validando o marcadores SCAR 245 em pais e híbridos selecionados para avaliação de resistência a sigatokas em *Musa spp.*, observaram que o mesmo não foi capaz de discriminar as progênes resistentes das suscetíveis, pois não foi possível detectar polimorfismo entre os indivíduos.

1.3 SCAR Dwarf (dw_1/ dw_2)

Outra característica de importância no programa de melhoramento genético da bananeira é a obtenção de plantas de porte baixo. Em bananeira, a altura do pseudocaule, que é a distância que vai desde o solo até o pecíolo da folha mais alta, é usada para sub-agrupar os genótipos tipo terra em porte gigante, médio e pequeno. Clones de *Musa* com internódios curtos são denominados de cultivares “dwarf” por apresentarem porte reduzido (ORTIZ & VUYLSTEKE, 1998). Os cultivares de porte baixo são menos propensos aos danos causados pelos ventos, desenvolvem-se mais rapidamente e são mais produtivos.

A característica de nanismo em bananeira é governada por um *gene* recessivo *dw*, provavelmente localizado perto do centrômero, mostrando efeito de dosagem em nível de tetraploidia (ORTIZ, 2012). A bananeira é considerada anã quando apresenta até 2 metros de altura, de 2 a 3,5 m porte médio e de 3,5 a 6 m, porte alto.

As análises com o marcador SCAR (dw_1 / dw_2) para estudo de acessos tipo anão-porte baixo, não tiveram resultados satisfatórios, pois para os 276 acessos testados presentes BAG – Bananeira, não foi possível obter perfis eletroforéticos desejados para o *gene* ligado ao porte da bananeira descrito na literatura por Supasanna et al. (2008).

Suprasanna et al. (2008) observaram um padrão característico de banda para o iniciador SCAR (dw_1/dw_2), de um fragmento amplificado de 1500 pb, que foi observado no tipo anão normal , semi-anão mas não nos tipos de anões-dwarf.

Este padrão de bandas já era esperado, pois foi anteriormente descrito por Damasco et al. (1998). No entanto, este resultado não foi encontrado no atual estudo.

Assim como no trabalho de Suprassana et al. (2008), esta análise foi feita por meio do método multiplex, no qual foi, usado além do SCAR (dw_1/dw_2), o *primer* do *gene* 18S rRNA *Musa acuminata*, que serviu de controle da amplificação via PCR. O perfil eletroforético do uso do dw_1/dw_2 , encontra-se na Figura 3.

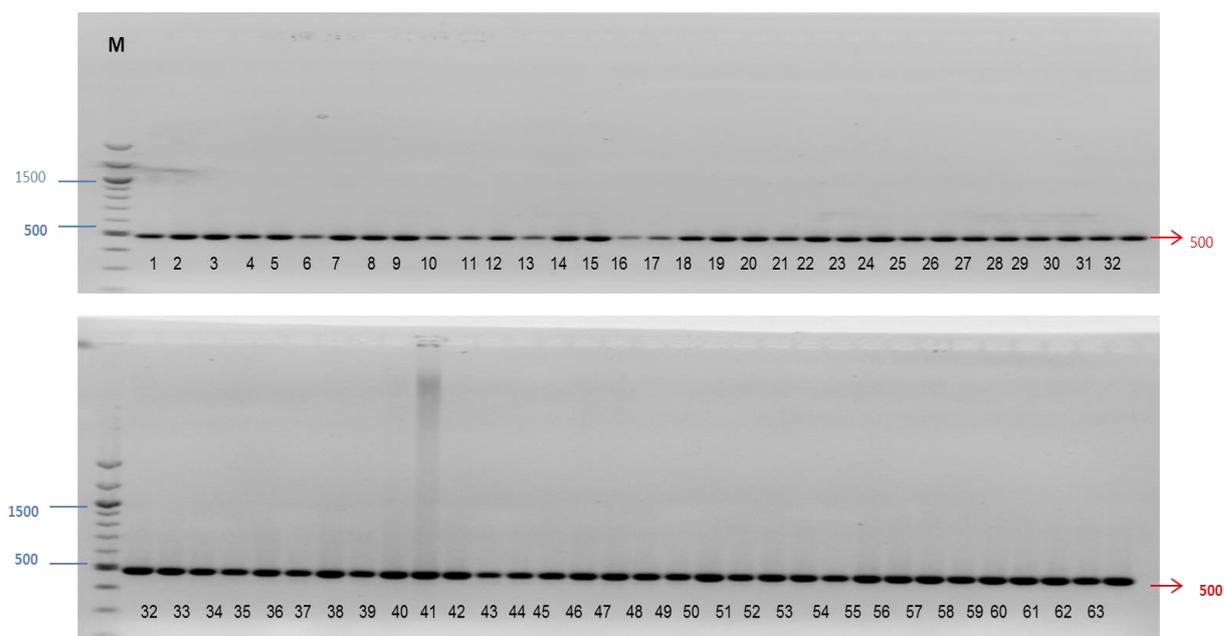


Figura 3: Perfil eletroforético do *primer* SCAR dw_1/dw_2 em gel de agarose 1.5 %. Amostras 1 a 63 (Tabela 3). Seta vermelha: *Primer* 18S rRNA com banda esperada em 500pb M = Ladder de 100 pb (Invitrogen™). Ausência de banda em 1500 pb indica nanismo.

Não houve amplificação desse *primer* nos acessos avaliados, onde a ausência indicaria supostos acessos de porte baixo, havendo apenas a amplificação do *primer* do *gene* do 18S rRNA de *Musa* spp.. Para confirmação deste resultado foi realizada uma reação de PCR usando apenas o *primer* SCAR (dw_1/dw_2). Ainda assim não foi possível obter perfil eletroforético do mesmo. No entanto, há vários acessos de porte alto dentre os acessos do BAG-Bananeira, onde a banda também esteve ausente, como Mysore e Prata comum, indicando erro nos resultados com o uso desse *primer*. Esperava-se pelo menos, ausência de bandas para os acessos Nanica, Prata anã e Nan, que serviram de controles para porte muito baixo. A fim de comprovar este resultado foram feitos diversos testes com o objetivo de otimizar a reação, promovendo mudanças na

concentração dos reagentes utilizados, assim como mudanças na temperatura de anelamento (T_a). Mesmo após as modificações realizadas nas condições laboratoriais, os resultados continuaram a se repetir. Sendo assim, pode-se dizer que o marcador não atingiu o objetivo esperado na identificação de variedades possuidoras de *genes* para o nanismo.

Com base na ausência de amplificação do marcador SCAR dw1/dw2, (Figura 3), ligado ao *gene* associado ao porte baixo da bananeira em acessos de porte médio e alto e também em todos os acessos do BAG-Bananeira, pode-se inferir que este marcador não apresentou potencial de uso para análise da característica em estudo nos acessos avaliados. A visualização da marca ligada ao *gene* 18S rRNA mostra que não houve erros no processo de reação ou ainda, na qualidade do DNA utilizado.

Vale ressaltar que a escolha dos marcadores SCAR para *screening* do BAG-Bananeira foi feita devido às vantagens desta técnica como; facilidade na obtenção e na avaliação dos dados, uma vez que a análise é feita através da observação da presença ou da ausência do fragmento único amplificado pelo marcador.

1.4 Identificação de marcadores SCAR em bananeira

No caso da bananeira, a identificação de marcadores SCAR é um tanto controversa, pois devido a sua própria natureza partenocárpica e número insuficiente de sementes nos cruzamentos de interesse, muitas vezes impossibilita análises em populações segregantes, que poderiam somar à identificação mais robusta de marcas ligadas a genes de interesse.

Outro ponto relevante é a forma como a maioria dos SCARs para bananeira foram encontrados até o momento, onde apenas poucos acessos foram avaliados quanto a resistência ou susceptibilidade a doenças (Wang et al. 2012, Nwauzoma et al. 2011), talvez não sendo suficiente para reprodução robusta desses resultados. Isso pode ter acontecido com o Sca S 0901, que não apresentou resultados satisfatórios em nosso estudo.

No trabalho de Wang et al. (2012), que serviu como base para o nosso trabalho, foram identificados dois marcadores SCAR utilizando-se 500 *primers* RAPD amplificados em apenas 7 genótipos de bananeira (entre genótipos

resistentes e suscetíveis a Foc RT 4). Desses, os *primers* de RAPD OPU10 e OPS09, deram origem aos marcadores SCAR Sca U1001 e Sca S0901, utilizados em nosso trabalho. Esses marcadores mostraram-se interessantes por apresentarem bandas nos genótipos resistentes, `Williams 8818-1´ e Goldfinger, e ausência em cinco genótipos (Williams 8818-(AAA), Grande Naine (AAA), Gros Michel (AAA), cv Brazilian (AAA), cv Tinabao (AAA), suscetíveis a Foc RT 4.

Já no trabalho de Nwauzoma et al. (2011), os autores utilizaram apenas dois genótipos resistentes (Calcutta 4 e Manoranjitham) e dois suscetíveis (Anaikomban e Grande Naine) para a construção do marcador SCAR, não sendo talvez suficientes para uma análise mais robusta, explicando o insucesso do uso do mesmo na identificação de genótipos de bananeira com resistência à Sigatoka amarela (*Mycosphaerella musicola*).

O fato dos autores supracitados terem usado um número muito pequeno de acessos para identificarem marcadores SCAR, limita um pouco a reprodutibilidade desses marcadores onde pode-se levar em consideração que a banda não esteja completamente ligada ao gene de interesse (MUTENGWA et al., 2005). Isso pode ter acontecido com o Sca S0901 em nosso trabalho.

É necessário ressaltar que, um marcador estreitamente ligado ao loco de interesse, torna a genotipagem de indivíduos para a seleção assistida por marcadores (SAM) acurada e eficiente, com resultados reprodutíveis e assim podem ser facilmente aplicados ao melhoramento de plantas (HITTALMANI et al., 1995).

Em nosso trabalho, onde foram usados os marcadores Sca S0901 e Sca U 1001 (WANG et al., 2012), enfatiza a necessidade das inoculações dos acessos apresentados na Tabela 1 com isolados virulentos da Foc RT 4. Essa inoculação deverá ser feita no exterior aonde a doença já vem ocorrendo para que se possa assegurar resultados confiáveis quanto a resistência dos acessos a Foc RT 4 da core collection preventiva. Essa etapa é imprescindível e deverá contar com a ajuda dos parceiros da Embrapa na Ásia e África para validar o resultado aqui encontrado.

O uso do marcador SCAR Sca U1001 será um passo inovador em relação ao uso de SAM no melhoramento da espécie no País. A confiabilidade do *screening* do BAG-Bananeira com o primer (Sca U1001), permitiu a construção de uma “*core collection*” preventiva com indicação de acessos a serem utilizados no

Programa de Melhoramento da Bananeira - PMB, que visa dentre as suas prioridades, o desenvolvimento de variedades mais produtivas, frutos de qualidade e resistência à Fusariose.

Conclusão

O marcador Sca U1001 permitiu a identificação de acessos promissores para uso no programa de melhoramento da bananeira por possibilitar a identificação de possíveis acessos com resistência a Foc RT 4 visando a construção de uma “*core collection*” de caráter preventivo;

Há necessidade de otimização dos marcadores Sca S0901 e dw_1/dw_2

Referências

ALKIMIM, L.R.; CAIXETA, E.T.; SOUSA, T.V.; OLIVEIRA, A.C.B.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, E.M; ZAMBOLIM, L; SAKIYAMA, N.S (2013). Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência à ferrugem do cafeeiro. **VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil** 25 a 28 de novembro de 2013, Salvador – BA.

AZEVEDO, V. F.; DONATO, S. L. R.; ARANTES, A, M.; MAIA V, M.; SILVA, S. O. (2010). Avaliação de bananeiras tipo prata, de porte alto, no semiárido. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n. 6, p. 1372-1380.

BERALDO, A.L.A.; COLOMBO, C. A; CHIORATO, A.F; ITO, M.F; CARBONELL, S.A.M.(2009). Aplicação de Marcadores SCARS para Seleção de Linhagens Resistentes à Antracnose em Feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.1, p.53-61.

CARNEIRO, O.L.G. (2014) Introgessão do alelos *Rl_{adg}* de Resistencia ao *Potato leafroll virus*(PLRV)em germoplasma de *Solanum tuberosum*. (**Dissertação de Mestrado**). Universidade Federal de Lavras, p.59.

DAMASCO O.P.; GRAHAM G.C.; HENRY R.J.; ADKINS S.W.; SMITH M.K (1996) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off types in micropropagated Cavendish bananas. **Acta Horticulturae**, v.461, p. 157-164.

DAMASCO OP, SMITH MK, ADKINS SW, GODWIN ID (1998) Use of SCAR based marker for early detection of dwarf off-types in micropropagated 'Cavendish' bananas. **Acta Horticulturae**, v. 461, p.157–164.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.1315.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALLIÃES, J.V.; LANZA, M.A.; SCLIUSTER (2009) Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n. 253, p. 24-33.

HADDAD, F.; OLIVEIRA, S.A.S.; PERITO. E. A.; CORDEIRO, Z.J.M, MATOS, A.P.(2011). Coleção Biológica de trabalho de *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense do Laboratório de Fitopatologia. **EMBRAPA Mandioca e Fruticultura**, p.4.

HITTALAMANI, S.; FOOLAND, M.R.; MEW, T.; RODRIGUEZ, R.L.; HUANG, N.(1995) Development of a PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, Pi-2(t), in a segregating population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.91, n. 1, p. 9-14.

IITA press release. Disponível em: <(http://www.iita.org/2013-press-releases/-/asset_publisher/CxA7/content/new-banana-disease-to-africa-found-in-mozambique?redirect=%2Fhome#.VCB-BXYg-Um). Acesso em: 25 de setembro de 2014.

JAVED, M. A.; CHAI, M. ; OTHMAN, R.Y (2004). **Study of resistance of *Musa acuminata* to *Fusarium oxysporum* using RAPD markers**. BIOLOGIA PLANTARUM. v. 48, n. 4, p. 93-99.

MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z .J. M.; HADDAD. F (2012). FUSARIOSE EM FRUTÍFERAS. **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Bento Gonçalves-RS 22 a 26 de outubro 2012.**

MOORE, N. Y.; K. PEGG; A. R. ALLEN; J. A. G (1993) Irvin: «Vegetative Compatibility and Distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* in Australia. Australia, **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 33, n. 6, p. 797-802.

MOLINA, A. B.; FABREGAR, E.; SINOHIN, V. G.; VILJOEN, A. (2009) Recent occurrence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* tropical race 4 in Asia. Proc. IS on Banana Crop Prot, Sust, Prod & Impr. Livelihoods. Eds: D. Jones and I Van den Bergh. **Acta Horticulture**, ISHS, v. 828, p 109-115.

MUTENGWA C. S.; TONGOONA P. B, SITHOLE-NIANG I (2005). Genetic studies and search for molecular markers that are linked to *Striga asiatica* resistance in sorghum. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 12, p. 1355-1361.

NWAUZOMA, A. B.; SARASWATH, S(2011). Developing markers for Sigatoka leaf spot disease(*Mycosphaerella musicola* Leach) resistance in banana(*Musa* spp.) i, M. S.2 and Mustafa, M2. **African Journal of Biotechnology** ,v. 10, n. 33, p. 6213-6219.

OLIVEIRA, E.J.; DANTAS, J.L.L.;CASTELLEN, M.S; LIMA, D.S; BARBOSA, H.S; MOTTA, T.B.M.(2007) Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1747-1754.

ORTIZ, R. E VUYLSTEKE, D (1998). Quantitative variation and phenotypic correlations in banana and plantain. **Scientia Horticulturae**.v.72, p.239–253.

ORTIZ, R.(2012) Mapping and Tagging of simply inherited traits in Musa. In: Pillay, M, Ude, G., Kole, C. Genetics, Genomics and Breeding of bananas. **CRC Press**, p. 109-115.

PARAN, I. ; MICHELMORE, R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 85, n. 8, p. 985-993.

PLOETZ, R. C (1990). Variability In *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Canadian Journal of Botany**, v.68, n. 6, p.1357-1363.

PLOETZ, R.C(2006). *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Phytopathology*, **Saint Paul**, v. 96, n. 6, p. 653-656.

RAMAGE C.M.;BORDA A.M.; HAMILL S.D.; SMITH M.K (2004). A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 1, p.145-151.

RODRIGUES, M.A (2011). Identificação e mapeamento de marcadores associados a locos de resistência a virose do mosaico dourado em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (**Dissertação de Mestrado**). Universidade Estadual de Feira de Santana, p 54.

SCOTTI, I.; TROGGIO, M.; SORANZO, N.; VENDRAMIN, G.G.; BUCCI, G. A. (1998) new set of PCR-based, locus-specific markers for *Picea abies*(L.) Karst. **Molecular Ecology**, Loughborough, v.7, p.783-785.

SRIVASTAVA, M.K.; LI, L. C-N.; LI,Y.R (2012). Development of sequence characterized amplified region (SCAR) marker for identifying drought tolerant sugarcane genotypes. *Australian Journal of Crop Science* , **AJCS**. v. 6, n. 4, p.763-767.

SUPRASANNA, P.; MEENAKSHI, S.; GANAPATHI, T. R.; (2008) Characterization of irradiation induced and tissue culture derived dwarf types in banana by using a SCAR marker. *Australian Journal of Crop Science*. v. 1, n. 2, p .47-52 .

SUTHERLAND, R.; VILJOEN, A.; MYBURG, A.A.; VAN DEN BERG, N (2013). Pathogenicity associated genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* race 4 (2013) South African **Journal of Science**, v. 109, n 5/6, p. 1-10.

STOVER, R.H. (1990) *Fusarium* wilt of banana: some history and current status of the disease. In: Ploetz RC, ed. *Fusarium Wilt of Banana*. St Paul, MN, USA: **APS Press**, p. 1–7.

ZACCARO, R.P.; ALVES, L.M.C.; TRAVENSOLO, R.F.; WICKERT, E; LEMOS, E.G.M (2007). Utilização de marcador molecular SCAR na identificação de *Fusarium subglutinans*, agente causal da malformação da mangueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 563-570.

WANG, W; HU, Y.; STAEHELIN, D.S.C.; XIE, X.J (2012) Identification and evaluation of two diagnostic markers linked to *Fusarium* wilt resistance (race 4) in banana (*Musa* spp.). **Molecular Biology Reports**, v.39, p. 451–459.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral a validação dos marcadores microssatélites foi eficiente, disponibilizando 44 novos locos microssatélites que poderão ser usados em diferentes estudos genéticos como: análise de diversidade genética, estudo de filogenia, *fingerprinting* da espécie, entre outros.

O estudo de diversidade usando marcadores SSR revelou expressiva variabilidade genética entre os 30 acessos de *Musa spp.* e poderá contribuir para programas de melhoramento genético da espécie.

O polimorfismo observado pelos marcadores microssatélites mostra-se útil na avaliação de variabilidade de bananeira. Estes locos microssatélites poderão trazer valiosa contribuição no mapeamento do genoma de *Musa spp.*

Tanto os *primers* derivados das bibliotecas oriundas Calcutta 4 quanto os derivados da biblioteca Ouro revelaram similar poder discriminatório na análise de diversidade genética e poderão ser usados igualmente em estudos futuros.

O marcador Sca U1001 mostrou-se um forte candidato a ser utilizado em seleção assistida por marcadores moleculares, para identificação de acessos com possível resistência a Foc RT 4, diferente do *primer* Sca 0901 o qual apresentou potencial reduzido na discriminação de possíveis acessos resistentes de suscetíveis à Foc RT 4.

O marcador SCAR dw1/dw2 para análise de *gene* ligado ao porte da bananeira, não reproduziu o resultado esperado e observado em trabalhos anteriormente realizados, mostrando a priori que o mesmo não poderá ser utilizado em estudos futuros.

ANEXOS

