

**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**

**DIVERSIDADE DE SOMACLONES DA CULTIVAR GRANDE
NAINE E DE ACESSOS DE BANANEIRA VIA MARCADORES
DE DNA**

Juliana Rodrigues Sampaio

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2024**

DIVERSIDADE DE SOMACLONES DA CULTIVAR GRANDE NAINÉ E DE ACESSOS DE BANANEIRA VIA MARCADORES DE DNA

Juliana Rodrigues Sampaio
Engenheira Agrônoma
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2021

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

Orientadora: Dr^a Cláudia Fortes Ferreira
Coorientador: Dr Edson Perito Amorim
Coorientadora: Dr^a Janay Almeida dos Santos Serejo

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

S192d	<p>Sampaio, Juliana Rodrigues. Diversidade de somaclones da cultivar Grande Naine e de acessos de bananeira via marcadores de DNA / Juliana Rodrigues Sampaio._ Cruz das Almas, BA, 2024. 73f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.</p> <p>Orientadora: Prof. Dra. Claudia Fortes Ferreira. Coorientador: Prof. Dr. Edson Perito Amorim. Coorientadora: Prof. Dra. Janay Almeida dos Santos Serejo.</p> <p>1.Banana – Variabilidade genética. 2.Banana – Melhoramento genético. 3.Biotecnologia vegetal – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 634.772</p>
-------	--

**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**

**DIVERSIDADE DE SOMACLONES DA CULTIVAR GRANDE NAINÉ E
DE ACESSOS DE BANANEIRA VIA MARCADORES DE DNA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Juliana Rodrigues Sampaio

Aprovada em 30 de julho de 2024



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



Dr^a Fernanda dos Santos Nascimento
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Examinadora)



Dr^a Tamyres Amorim Rebouças
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Examinadora)

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Beldade e Garibaldi (*in memoriam*), aos meus pais Reinadi e Deomar e minha sogra Aurora (*in memoriam*), por terem me ensinado que hoje é sempre o dia certo para se reinventar e que o estudo é uma via para libertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus! Paz, confiança e certeza amorosa que em mim habitam e me animam a pisar nessa terra com beleza, respeito e leveza. Cheguei aqui e continuo agradecendo.

Agora a Cezar, o que é de Cezar!

Agradeço à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por nos permitir sonhar e realizar.

Agradeço, especialmente, a todos que compõem o Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais por toda possibilidade de aprendizado acadêmico, profissional e humano. Aqui, meus agradecimentos especiais às Coordenadoras Dr^a Lydiane Aona e Dr^a Simone Silva pelo aprendizado como Representante Discente no Colegiado.

Agradeço à CAPES pelo fomento à permanência dos pesquisadores em formação, com a concessão da Bolsa de Estudo, que possibilitou a estabilidade necessária à minha dedicação exclusiva à Pós-Graduação.

Agradeço à Embrapa Mandioca e Fruticultura pela concessão de uso de sua estrutura física e de seus recursos materiais e imateriais que contribuíram para a execução dessa pesquisa.

À minha orientadora, Dr^a Claudia Fortes Ferreira, agradeço por sua dedicação e paciência no processo de orientação de uma pesquisadora em formação. Por sua gentileza na construção e partilha do conhecimento em melhoramento vegetal e biotecnologia, nas contribuições e correções, agradeço imensamente.

Agradeço ao Dr Edson Perito Amorim e Dr^a Janay Almeida dos Santos Serejo, pela orientação e contribuições na realização deste trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Ricardo Moreira por desmistificar a estatística em biomol.

Agradeço aos técnicos Dr. Zalmar Gonçalves, Dr. Bruno Laecio Pereira e Rafael Aragão Vieira, responsáveis pelos campos experimentais e BAG-Banana, pela orientação dada sempre que se fez necessário.

Agradeço ao corpo técnico dos Laboratórios de Biologia Molecular e Cultura de Tecidos, pelo acolhimento, orientação e muita partilha de conhecimento (muitas vezes à base de cafezinho, risos e pipocas). Meu agradecimento nominal a Honorato Pereira da Silva Neto por toda espera paciente pela última a sair do laboratório (muitas e muitas vezes).

Agradeço especialmente, e imensamente, à Dr^a. Andresa Ramos por toda orientação dada e por sua contribuição à minha formação no Laboratório de Biologia Molecular. Agradeço pelos momentos de partilha de conhecimento, pela confiança no que eu estava realizando e principalmente por todas as palavras que acalmaram a minha alma. Seu conhecimento e envolvimento nas pesquisas são primordiais, indispensáveis (mesmo em sonho!).

Ao Grupo de Pesquisa em Banana, pesquisadores discentes e pós doutores, meu agradecimento. Imagino que vocês têm noção da importância que essa equipe tem na formação acadêmica de todos os envolvidos. A colaboração intelectual (e o apoio

moral) é a marca que vocês deixam em mim e levarei adiante. Não se faz pesquisa sozinho.

Luíz Carlos, Rodrigo e Ana Carolina, eram bolsistas PIBIC quando iniciei as atividades no laboratório. Não é possível mensurar a contribuição de vocês no meu aprendizado, na prática, em um Laboratório de Biologia Molecular. Muitíssimo obrigada!

Aos colegas, na labuta prática da biologia molecular (Paula, Manuela, Thaís, Wanderley, Fernanda, Mileyde), grata não só pelo conhecimento partilhado mas também, pelo apoio moral e emocional. Paula, saiba que sua alegria, firmeza e convicção 'são' referências para mim.

Wanderley Diaciso dos Santos Oliveira. Um agradecimento com nome e sobrenome. Você foi LUZ no meu caminho. Queira Deus que todo iniciante na pesquisa, seja ela genética ou não, encontre no seu processo de aprendizado, pessoas como você. O quanto persisti, tenha certeza que você faz parte disto. Agradeço e agradeço.

Rodrigo Araújo e Pablo, já sabem. Agradeço pela oportunidade de ter cursado o mestrado junto a vocês, que fizeram com que meu retorno à academia fosse confiante (com muito mais certezas que incertezas) e....pró-ativo (mesmo com todo cansaço que isso traz). "Será lindo".

E se pude experienciar a continuidade do aprimoramento acadêmico na Pós-Graduação, no Mestrado, agradeço e muito à professora Dr^a Teresa Soares de Freitas por ter me recebido de braços abertos na pesquisa. Obrigada, Teresa, por ter acreditado que minha experiência na extensão seria a cereja do bolo na pesquisa em laboratório. Obrigada por sua orientação, que continua até hoje. Obrigada por sua amizade. Faz parte da mudança de rumo que dei em minha vida.

À minha imensa família "Sampaio, Rodrigues e Colaço" agradeço a oportunidade de ter contado com o apoio irrestrito e incondicional de cada um de vocês para minha permanência no Mestrado. Tia Reisânia, Tia Rosa, minha mãe Flor (Reinadi), tio Urbano e tia Nida, por serem guarida e proteção do chão ao teto, de alimento pro corpo e alma. Se estou aqui, foi porque tive o SIM de cada um de vocês.

Agradeço à minha irmã Ana Paula. Minha amiga. Minha primeira e principal apoiadora. O ser humano que nunca duvidou da minha vontade e potencial e que esteve junto todos esses anos, salvaguardando essa semente. Plantamos!

Mateus, meu filho lindo, pedaço de mim. Obrigada por sua companhia nas madrugadas viradas (todas e foram muitas...e muitas estão por vir), por sua preocupação com minha sanidade mental (agora eu ri alto!), pelo controle e fiscalização do uso de redes sociais, por toda água que me fez beber, por todos os elogios e pelo suporte incondicional na tecnologia. Agradeço tanto e muito!

Miguel Colaço! Por ter acreditado mais em mim que eu própria. Por todas as orações que fez. Por todos os conselhos que me deu (e continua a dar...ficará orgulhoso da minha lista de agradecimentos!). Pela parceria nessa jornada possibilitando minha dedicação exclusiva aos estudos. Por todas as vezes em que precisou ser o único ouvinte das minhas apresentações (muitas vezes). Por estar aqui. Junto comigo. Agradeço tanto e tanto, meu companheiro de muitas vidas.

E agradeço a mim. Que docemente acolhi e abasteci com estudos, essa minha fome sem fim por conhecimento (não economizei texto na Pós-Graduação...e não economizaria aqui. Só agradeço).

DIVERSIDADE DE SOMACLONES DA CULTIVAR GRANDE NAINÉ E DE ACESSOS DE BANANEIRA VIA MARCADORES DE DNA

RESUMO: O objetivo geral desta pesquisa consistiu na caracterização genética de acessos de *Musa* spp. por marcadores moleculares de DNA, visando contribuir para o avanço do Programa de Melhoramento Genético de Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura (PMGB). Assim, na linha de melhoramento de triploides comerciais, os objetivos específicos consistiram na identificação de variação somaclonal e caracterização genética de quatro somaclones derivados da cultivar Grande Naine (AAA) que foram selecionados em estudo prévio como resistentes ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 4 subtropical e estudo da diversidade genética entre 22 diploides melhorados (AA) e 7 triploides comerciais (AAA e AAB) envolvendo o subgrupo Cavendish, Prata, Maçã e Plátano. No estudo dos variantes somaclonais, foram usados marcadores moleculares baseados em retrotransposons, especificamente *Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism* – IRAP e *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism* – REMAP. Para o primeiro estudo, não houve um número satisfatório de bandas polimórficas para o cálculo da matriz de diversidade genética, no entanto, três bandas polimórficas entre os somaclones e o controle (GN), foram sequenciadas (*paired-end*) e analisadas utilizando-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), complementando as informações da função biológica. As três bandas que se destacaram como polimórficas foram: banda 1AF: LTR6149 (T1B2P6) + Nikita (T1B2P6: 1-12); banda 2AF: 3' LTR (T1B2P2) + Nikita (T1B2P2: 1-12) e C) banda 3AF: Sukula + LTR6150 (T1B2P2: 1-11). Apenas a banda 1AF teve resposta relacionada ao estresse com proteína de função de ligação com cálcio (*Calcium-binding protein*). Essas proteínas são de extrema importância para resistência das plantas a doenças atuando como mensageiros secundários nas células durante as primeiras horas da infecção por patógenos ativando os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e iniciando a cascata de sinais de defesa da planta. O fato dela estar presente em todos os somaclones, reforça as avaliações anteriores de resistência à FocST4. Já no estudo da diversidade entre diploides melhorados e triploides comerciais, foram usados marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* – ISSR, *Simple Sequence Repeat* – SSR e IRAP. Com base na matriz de dissimilaridade genética, os diploides melhorados mais dissimilares foram o DM23 e DM15 (74%); DM16 e DM15 (74%), enquanto as menores distâncias genéticas entre diploides melhorados e triploides comerciais foram observadas entre TCGN25 e DM17 (50%), TCN26 e DM17 (50%). A matriz também revelou materiais para cruzamentos importantes visando manter as características interessantes nos triploides comerciais. No geral, os marcadores de DNA utilizados possibilitaram identificar bandas de interesse para possível uso da seleção assistida por marcadores (SAM) e melhor direcionar as estratégias de cruzamentos dentro do PMGB que visa, além de ampliar a base genética de *Musa* spp., incorporar a SAM de forma mais precisa.

Palavras Chave: IRAP; ISSR; REMAP; sequenciamento genético; SSR

DIVERSITY OF SOMACLONES OF THE GRANDE NAINÉ CULTIVAR AND BANANA ACCESSIONS USING DNA MARKERS

ABSTRACT: The general objective of this research was the genetic characterization of *Musa* spp. accessions by molecular DNA markers aiming to contribute to the advancement of the Banana Genetic Breeding Program at Embrapa Mandioca e Fruticultura (BGBP). Thus, for the breeding of commercial triploids, the specific objectives consisted of the identification of somaclonal variation and genetic characterization of four somaclones derived from the cultivar Grande Naine (AAA) that were selected in a previous study as resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* subtropical race 4 and study of genetic diversity between 22 improved diploids (AA) and 7 commercial triploids (AAA and AAB) involving the Cavendish, Prata, Silk and Platain subgroup. In the study of the somaclonal variants, molecular markers based on retrotransposons were used, specifically Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism – IRAP and Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism – REMAP. For the first study, there was not a satisfactory number of polymorphic bands for the calculation of the genetic diversity matrix, however, three polymorphic bands between the somaclones and the control were sequenced (paired-end) and analyzed using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) complementing the information on biological function. The three bands that stood out as polymorphic were: band 1AF: LTR6149 (T1B2P6) + Nikita (T1B2P6: 1-12); band 2AF: 3' LTR (T1B2P2) + Nikita (T1B2P2: 1-12) and C) band 3AF: Sukula + LTR6150 (T1B2P2: 1-11). Only band 1AF had a stress-related response with calcium-binding protein. These proteins are extremely important for plant resistance to diseases, acting as secondary messengers in cells during the first hours of infection by pathogens, activating the molecular patterns associated with pathogens. The fact that it is present in all somaclones reinforces previous evaluations of resistance to FocST4. In the study of the diversity between enhanced diploids and commercial triploids, molecular markers Inter Simple Sequence Repeat – ISSR, Simple Sequence Repeat – SSR and IRAP, were used. Based on the genetic dissimilarity matrix, the most dissimilar improved diploids were DM23 and DM15 (74%); DM16 and DM15 (74%), while the smallest genetic distances between improved diploids and commercial triploids were between TCGN25 and DM17 (50%), TCN26 and T17 (50%). The distance matrix also revealed interesting materials for important crosses in order to maintain good traits in commercial triploids. In general, the DNA markers used made it possible to identify bands of interest for possible use in marker-assisted selection (SAM) and to better direct the strategies of crosses within the PMGB that aims not only to expand the genetic base of *Musa* spp., but also use MAS more precisely.

Keywords: Genetic sequencing; IRAP; ISSR; REMAP; SSR

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERENCIAL TEÓRICO	14
As bananeiras e a resistência a doenças	14
A interação entre <i>Musa</i> spp. e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	16
Calcium-binding protein e resistência de plantas a patógenos	18
O melhoramento vegetal em <i>Musa</i> spp. e sua implicação na variabilidade e diversidade genética.....	20
Uso de marcadores moleculares de DNA na caracterização da diversidade e da Variabilidade genética vegetal	21
<i>LTR Retrotransposons</i>	22
<i>Microsatélites</i>	23
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO I	36
Identificação e caracterização molecular de somaclones de ‘Grande Naine’ (<i>Musa</i> spp.), resistentes a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raça 4 subtropical	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1. <i>Material vegetal</i>	39
2.2. <i>Extração e quantificação do DNA genômico (gDNA)</i>	40
2.3. <i>Reação em cadeia de polimerase e caracterização molecular</i>	40
2.4. <i>Análise de dados moleculares e sequenciamento</i>	42
3. RESULTADOS	42
3.1. <i>Avaliação dos somaclones com base no perfil eletroforetico</i>	42
3.2. <i>Análise das bandas polimórficas e sequenciamento</i>	44
4. DISCUSSÃO	46
4.1. <i>Avaliação dos somaclones com base no perfil eletroforetico</i>	46
4.2. <i>Análise das bandas polimórficas e sequenciamento</i>	47
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO II	55
Diversidade de diploides melhorados e triploides comerciais de <i>Musa</i> spp., via marcadores moleculares	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. RESULTADOS	58
2.1. <i>Análise molecular do Polimorfismo genético por marcadores moleculares de DNA – SSR, ISSR e IRAP</i>	58
2.2. <i>Diversidade genética</i>	59
3. DISCUSSÃO	62
3.1. <i>Diversidade genética</i>	62
4. MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1. <i>Material vegetal</i>	65
4.2. <i>Extração de DNA</i>	66

4.3. <i>Análise IRAP</i>	66
4.4. <i>Análise SSR</i>	67
4.5. <i>Análise ISSR</i>	67
4.6. <i>Eletroforese e análise de dados</i>	68
5. REFERÊNCIAS	68
CONCLUSÃO GERAL	73

INTRODUÇÃO GERAL

As bananeiras (*Musa* spp.) são plantas herbáceas, perenes, que se destacam na fruticultura de países tropicais e subtropicais gerando renda no mercado interno e externo. A produção e comercialização de seus frutos contribuem para a segurança alimentar e geração de renda, principalmente em regiões de população em situação de vulnerabilidade socioeconômica (FAO, 2024). Neste contexto, a produção global de bananas em 2022 foi de 135 milhões de toneladas (t) da fruta em uma área total aproximada de 5,9 milhões de hectares (ha) com rendimento médio de 22,9 t ha⁻¹. Neste mesmo ano, o continente asiático foi responsável por 51,8% da produção mundial de bananas, enquanto as Américas produziram 23,8%, seguidas da África (22,8%), Oceania (1,2%) e Europa (0,4%) (FAO, 2024).

O Brasil, o quinto maior produtor mundial desta fruta e o primeiro maior das Américas, produziu, em 2022, 6,8 milhões de toneladas do fruto, em uma área de 460 mil ha. Assim, o cultivo das bananeiras ocupou o segundo lugar na fruticultura nacional, com movimentação de R\$ 12 bilhões no agronegócio, equivalentes a 10,26% do valor total gerado pela comercialização dos produtos das lavouras permanentes no Brasil (IBGE, 2024a; IBGE, 2024b). Embora os produtos da bananicultura brasileira sejam absorvidos internamente, a exportação de bananas da cultivar “Grande Naine”, apresentou incremento pelo quarto ano consecutivo, com a remessa de 108 mil toneladas em 2021, principalmente para países do Mercosul, movimentando US\$ 37 milhões (FOB). Já em 2022, a exportação respondeu pela remessa de 78 mil toneladas para o exterior, das quais 68 mil toneladas foram destinadas ao Mercosul (CEPEA, 2022; CEPEA, 2023).

As bananeiras (*Musa* spp.) podem ser classificadas de acordo com seu grupo genético e nível de ploidia, em diploides (AA, AB, BB), triploides (AAA, AAB, ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB) (Simmonds; Shepherd, 1955; Häkkinen, 2013). No Brasil, os principais tipos e variedades cultivados são os diploides ‘Ouro’ (AA) e os triploides ‘Nanica’, ‘Nanicão’, ‘Grande Naine’ (AAA), ‘Prata’, ‘Pacovan’, ‘Prata Anã’ (AAB), ‘Maçã’ (AAB), ‘Terra’ e ‘D’angola’ (AAB) (Silva *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2013).

Com reduzida diversidade de genes relacionados à resistência a doenças, (Rijzaani *et al.*, 2021), as bananeiras são suscetíveis a fitopatologias fúngicas e uma das principais doenças que ocorrem na cultura, é a murcha de *Fusarium* (Mena *et al.*, 2014), causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). O melhoramento genético da bananeira visando a obtenção de novas variedades resistentes às novas raças de Foc, ainda é a medida de controle mais viável e ambientalmente correta (Altendorf, 2019; Ploetz, 2006; Ploetz, 2015).

No melhoramento genético tradicional de plantas, geralmente recorre-se aos cruzamentos entre genótipos contrastantes para a obtenção de híbridos com características desejáveis herdadas de seus parentais. No entanto, as bananeiras são partenocárpicas, com baixa produção de sementes viáveis, onde a propagação vegetativa se caracteriza como a principal forma de multiplicação (Silva *et al.*, 2013; Backiyarani *et al.*, 2021).

A cultura de tecidos vegetais *in vitro*, é uma das principais técnicas da biotecnologia utilizada no melhoramento de bananeiras no que diz respeito à micropropagação, à indução de mutação e à variação somaclonal (Silva *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2023); esta última, pode gerar uma importante fonte de variabilidade genética (Jain, 2001; Peredo *et al.*, 2009), possibilitando a seleção de novos materiais com possível resistência às doenças. Dentre as técnicas utilizadas para

indução de variação somaclonal na cultura de tecidos, pode-se citar o uso de substâncias mutagênicas, como tidiazuron (TDZ) (Bello-Bello *et al.*, 2014; Dewir *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2020), isoladamente ou constituindo tratamento em associação com quantidade de subcultivos (Rebouças *et al.*, 2021).

As principais técnicas e ferramentas utilizadas para estudos de diversidade e detecção de variação somaclonal incluem a análise de características morfológicas, bioquímicas e/ou fisiológicas e também as características moleculares de DNA (Bairu *et al.*, 2011). Os marcadores genéticos desempenham importante função nos estudos de diversidade e variabilidade por possibilitar a sinalização de regiões polimórficas específicas (Kalendar *et al.*, 2011), que podem estar relacionadas às respostas de defesa das plantas ao estresse biótico ou abiótico.

Neste sentido, o uso de marcadores moleculares como os SSRs (*Simple Sequence repeat*), ISSR – *inter simple sequence repeat*, e baseados em retrotransposons, como o IRAP – *inter retrotransposon amplified polymorphism*, e o REMAP – *retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*, são atrativos por serem de número ilimitado e suas respostas serem independentes das condições ambientais em que as plantas se encontram (Arvas *et al.*, 2022; Carracedo *et al.*, 2021; Kalendar *et al.*, 2011). Esses marcadores são capazes de gerar padrões eletroforéticos diferenciados entre os indivíduos, fornecendo subsídios à gestão de recursos genéticos vegetais e auxiliando decisões estratégicas em programas de melhoramento de plantas.

Neste contexto, o objetivo geral desta pesquisa consistiu no estudo da variabilidade e diversidade genética em acessos de *Musa* spp., com uso de marcadores de DNA, especificamente IRAP, REMAP, SSR e ISSR, visando a caracterização molecular de somaclones e diploides melhorados de forma a serem usados no programa de melhoramento genético da bananeira (PMGB) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Assim, os objetivos específicos estão focados na caracterização molecular de somaclones do subgrupo Cavendish (AAA) previamente selecionados como resistentes ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*, raça 4 subtropical com uso de marcadores IRAP e REMAP, e o estudo de diversidade genética de vinte e nove acessos de *Musa* spp. representativos de cultivares diploides melhorados e triploides comerciais, com uso de marcadores IRAP, SSR e ISSR.

Estruturalmente, essa dissertação foi organizada em cinco partes:

Introdução Geral: apresentação sucinta dos temas que foram abordados ao longo da dissertação; delimitação do objetivo geral e específicos e divisão dos capítulos. Os capítulos relacionam-se com os objetivos específicos.

Referencial Teórico: apresentação dos conceitos e métodos de análises relacionados à variabilidade e diversidade genética em *Musa* spp.

Capítulo I: “Identificação e caracterização molecular de somaclones de ‘Grande Naine’ (*Musa* spp.), resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* raça 4 subtropical”. O objetivo geral deste capítulo consistiu na caracterização da variabilidade genética em somaclones resistentes à Foc ST4, visando identificação de padrões genéticos e mutações induzidas, que podem estar relacionadas a respostas de defesa das plantas. Se confirmada a resistência em campo, em etapas posteriores, as fontes de variabilidade, genes ou as informações genéticas identificadas poderão ser usadas para direcionar estratégias no PMGB com vistas à ampliação da base genética de *Musa* spp. e aceleração das etapas de cruzamento pelo uso da SAM.

Capítulo II: “Diversidade em diploides melhorados e triploides comerciais de *Musa* spp., via marcadores moleculares”. O objetivo geral do último capítulo consistiu no estudo da diversidade genética entre 29 acessos de cultivares representativas de bananeiras diploides melhoradas e triploides comerciais, visando identificar materiais a serem usados em cruzamentos futuros dentro do PMGB da Embrapa Mandioca e Fruticultura para desenvolvimento de cultivares mais resistentes/tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos.

Conclusão Geral: apresentação sucinta dos principais resultados e suas implicações práticas, destacando as contribuições e possibilidades no âmbito do melhoramento genético de bananeiras.

De forma geral, essa dissertação amplia o conhecimento sobre variabilidade e diversidade genética em *Musa* spp., e fornece insights e diretrizes que na prática viabilizam a otimização das estratégias de melhoramento genético, impactando a promoção da segurança alimentar e sustentabilidade nos sistemas produtivos agrícolas da espécie.

REFERENCIAL TEÓRICO

As bananeiras e a resistência a doenças

As bananeiras (Zingiberales: Musaceae) são plantas herbáceas, monocotiledôneas, perenes, estoloníferas e rizomatozas (Cheesman, 1947), agrupadas sob os gêneros *Musa* L., *Ensete* Horam, e seu gênero irmão, *Musella* F C.Y Wu ex H.W. Li (Liu *et al.*, 2010; Rijzaani *et al.*, 2021), com sua única espécie *Musella lasiocarpa* (Franch.) C.Y. Wu ex. H.W. Li (Fu *et al.*, 2022). Originadas no sudeste asiático, as bananeiras do gênero *Musa* spp. são cultivadas em quase todos os continentes, exceto o Antártico, destacando-se na fruticultura de países tropicais e subtropicais (FAO, 2024; Rijzaani *et al.*, 2021; Fu *et al.*, 2022). São classificadas nas seções infragenéricas: *Musa* seção *Musa*, com 33 espécies e *M.* seção *Callimusa*, com 37 espécies (Häkkinen, 2013; Fu *et al.*, 2022).

As bananeiras de frutos comestíveis (*Musa* spp.) resultantes de hibridações naturais intra ou interespecíficas, mutações, ou de programas de melhoramento, têm sua origem nas espécies silvestres diploides *Musa acumminata* Colla (AA) e *M. balbisiana* Colla (BB) e podem ser classificadas, de acordo com seu grupo genômico e nível de ploidia, em diploides (AA, AB), triploides (AAA, AAB, ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB) (Simmonds; Shepherd, 1955; Häkkinen, 2013). Quanto à morfologia floral, são díclinas e monóicas ou eventualmente hermafroditas. As flores femininas ocupam a porção proximal da inflorescência, enquanto as flores masculinas ocupam a região distal e as eventualmente hermafroditas estão distribuídas tanto na região proximal quanto na região distal (Vilhena *et al.*, 2019).

As bananeiras também foram classificadas em subgrupos, de acordo com quinze descritores para suas características morfoagronômicas (Baurens *et al.*, 2019). No entanto, as bananeiras do subgrupo ‘Cavendish’ (AAA) e ‘Terra’ (AAB), dominam os cultivos, estreitando a base genética dessa importante atividade econômica mundial, o que aumenta o risco de ataques por pragas e o acometimento por doenças (Ghag *et al.*, 2015).

No Brasil, os principais tipos e variedades cultivadas são o diploide ‘Ouro’ (cultivar Ouro – AA) e os triploides ‘Nanica’, ‘Nanicão’, ‘Grande Naine’ (subgrupo

Cavendish – AAA), ‘Prata’, ‘Pacovan’, ‘Prata Anã’ (subgrupo Prata – AAB), ‘Maçã’ (tipo Maçã – AAB), ‘Terra’ e ‘Dangola’ (subgrupo Terra – AAB) (Silva *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2013). Embora estas cultivares estejam presentes no Brasil, as bananeiras do grupo AAB, notadamente, Maçã, Prata, Prata Anã e Pacovan, são suscetíveis às principais doenças que acometem a cultura. Destaque é dado à cultivar Grande Naine, atribuída à incipiente exportação brasileira, seguindo a tendência mundial (Amorim *et al.*, 2011; CEPEA, 2023).

Uma relevante consequência da ampla distribuição e adaptação das bananeiras a variados ambientes, é a diversidade de interações entre os genótipos de bananeiras de frutos comestíveis e patógenos locais, com o agravante da reduzida diversidade de genes relacionados à resistência a doenças, característica genômica do gênero *Musa* e *Ensete* (Rijzaani *et al.*, 2021). Assim, as bananeiras são suscetíveis a fitopatologias bacterianas (Ocimati *et al.*, 2019), virais (Simbare *et al.*, 2020) e fúngicas, como as manchas foliares (Castelan *et al.*, 2012) e murcha de *Fusarium* (Mena *et al.*, 2014).

As características das bananeiras de frutos comestíveis derivadas do genoma A tem origem no complexo de subsespécies que constituem o gênero *Musa acuminata*, como *banksii*, *burmannica*, *malaccensis* e *zebrina* (Liu *et al.*, 2023). Dentre as principais contribuições do germoplasma AA aos programas de melhoramento estão a resistência a doenças, como Sigatoka amarela e negra e murcha de *Fusarium*, e resistência a pragas, como nematoides (Silva *et al.*, 1998). Quanto à espécie silvestre *M. balbisiana* (BB), a importância da sua contribuição advém da sua maior tolerância ao estresse biótico e abiótico, maior vigor e ao enriquecimento do seu genoma com genes de expressão dominante relacionados à rota de biossíntese de etileno e de produção e degradação de amido, com forte influência no amadurecimento e qualidade pós-colheita dos frutos (Wang *et al.*, 2019). Assim, com todo conhecimento específico já acumulado sobre a constituição genômica das espécies silvestres, ainda é um desafio compreender a herdabilidade e a interação entre os genes envolvidos nas respostas de defesa em *Musa* spp, principalmente devido à complexidade genética resultante dos diferentes grupos genômicos (A e B) e diferentes níveis de ploidia constituindo o gênero.

Variados estudos demonstram como genótipos diploides e triploides do gênero *Musa* apresentam resistência diferenciada a doenças como a BBTD - doença do topo da bananeira (Ngatat *et al.*, 2022), murcha da bananeira causada por bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Xcm) (Tripathi *et al.*, 2019), Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet (Timm *et al.*, 2016) e a murcha de *Fusarium* causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Rocha *et al.*, 2022).

A doença do topo da bananeira (*banana bunchy top disease* - BBTD), é induzida por vírus do gênero *Babuvirus*. Causa nanismo por atrofia severa de pecíolos (pseudocaule) e folhas e reduz drasticamente a produção em cultivos estabelecidos. Embora tenha sido introduzido na África subsaariana na década de 60, recentemente, houve notificação do primeiro caso de infestação na África oriental, região da Tanzânia (Shimwela *et al.* 2022). Genótipos diploides e triploides apresentam resistência diferenciada. Ngatat *et al.* (2022) reportou que o diploide ‘Tapo’ (AA) foi altamente suscetível, comparado aos diploides ‘Calcutta 4’ (AA) e ‘Balbisiana Los Banos’ (BB), que permaneceram sem sintomas no experimento em campo infestado, assim como os triploides ‘Balonkawe’ (ABB), e ‘PITA 21’ (AAB).

Em relação a murcha da bananeira causada por bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Xcm), todas as variedades e cultivares comerciais são

sucetíveis, excetuando-se a espécie silvestre *Musa balbisiana* (BB). A comparação entre os perfis transcriptômicos de *M. balbisiana* (BB), resistente, e a cultivar Pisang Awak (ABB), altamente suscetível, realizada por Tripathi *et al.* (2019) revelou em *M. balbisiana*, maior quantidade de genes diferencialmente expressos (540 regulados positivamente e 1.209 regulados negativamente), associados a ativação precoce de defesa contra estresse biótico, tanto das vias de defesa basal quanto das vias de defesa mediadas por proteínas de resistência (Tripathi *et al.*, 2019).

Os dados obtidos por Timm *et al.* (2016), no estudo comparativo da expressão gênica da cultivar resistente, Calcutta 4 (AA), e da cultivar suscetível, Williams (AAA), em resposta à inoculação com o fungo *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet, causador da doença Sigatoka negra, sugere que uma regulação específica entre quatro genes com funções diferentes gere resposta incompatível. Em 'Calcutta 4' foi possível identificar, que os genes PUK (proteína da família fosforibuloquinase/Uridina quinase), UCP (proteína não especificada), UTP (glicose-1-fosfato uridililtransferase - UGP) e RGA1 (proteína de resistência) foram positivamente regulados até doze dias após a inoculação, com pico aos nove dias para PUK e UCP e regulação negativa aos 15 dias. A cultivar Williams apresentou regulação positiva e estável (pico aos nove dias pouco pronunciado para PUC e UGP) até 15 dias após a inoculação, com exceção de RGA1, que neste período foi negativamente regulado (Timm *et al.*, 2016).

A interação entre *Musa* spp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*

Dentre as doenças fúngicas das bananeiras, a murcha de *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*, (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen (Foc), apresenta elevada severidade devido ao seu potencial para gerar perdas na produtividade e dizimar os cultivos que atualmente abastecem o mercado interno e externo. Apesar da doença ser conhecida na Austrália desde 1874 (Pegg *et al.*, 2019), o poder destrutivo de Foc teve destaque ao dizimar as plantações comerciais mexicanas do tetraploide 'Gros Michel' (AAAA) destinadas à exportação (Ghag *et al.*, 2015).

Quanto ao mecanismo de infecção, o Foc é um patógeno vascular de movimentação ascendente. Warman e Aitken (2018) observaram que, inicialmente, estruturas reprodutivas e de resistência, os micronídeos e clamidósporos, germinam sobre a superfície da extremidade da raiz e dos pelos radiculares, penetram nas células epidérmicas e alongam-se pelos espaços intra ou intercelulares ascendendo através do rizoma. Ao atingir o pseudocaule, crescem em direção à bainha foliar onde produzem, abundantemente, as estruturas de resistência que retornarão ao solo com o tombamento das folhas ou planta, ou serão espalhados pelo ar (Warman; Aitken, 2018).

Os sintomas podem ser observados externa e internamente e podem ser classificados em função do avanço da doença. De acordo com as observações de Dita *et al.* (2011; 2018), os sintomas perceptíveis vão desde a descoloração dos tecidos, à morte da planta. Assim, progride-se do amarelecimento inicial das folhas inferiores, seguindo para o amarelecimento de todas as folhas inferiores com alguma descoloração nas folhas novas. Internamente, os sintomas são perceptíveis com um corte transversal e caracterizam-se por descoloração inicial no rizoma, seguindo para descoloração ao longo de todo o sistema vascular. Então inicia-se a fase de necrose, culminando na necrose total dos tecidos internos do rizoma (Dita *et al.*, 2011; 2018).

Ploetz (2006) relatou que o Foc apresenta três raças que causam doença nas bananeiras e são classificadas pela interação com o genótipo-hospedeiro. A raça 1 dizimou a variedade Gros Michel (AAAA), que dominava o mercado internacional, e posteriormente, sua variedade melhorada Golden Beauty, assim como ataca atualmente o triploide (AAB) 'Maçã' e 'Rasthali' (AAB). A raça 2 coloniza todas as variedades suscetíveis à raça 1 e também a 'Bluggoe' (ABB). A raça 3 não é virulenta em *Musa spp.*, e ocorre no gênero *Heliconia spp.* (Zingiberales) (Castro *et al.*, 2008) na sua forma especial *heliconiae* (Swarupa *et al.*, 2014). A raça 4 compromete todos os triploides comerciais de bananeira, incluindo assim, os que são suscetíveis à raça 1 e 2, e cultivares do grupo 'Cavendish' (AAA), que são resistentes à raça 1. A raça 4 consiste no tipo subtropical (Foc ST4) e tropical (Foc TR4) (Ploetz, 2006, Swarupa *et al.*, 2014).

Foc ST4 difere de Foc TR4 na severidade e na existência de fator condicionante na colonização do grupo Cavendish. O Foc ST4 somente impacta as cultivares do grupo Cavendish em condições de inverno com baixa temperatura e com estresse hídrico por excesso ou escassez de água no solo; típico de regiões subtropicais. Ainda não houve notificação nos trópicos de doença em Cavendish causada por Foc ST4 (Pegg *et al.*, 2019) em condição de campo.

O Foc é um fungo de solo, de reprodução assexuada, que sobrevive por meio de estruturas de resistência, os clamidósporos, que podem persistir por anos nos plantios ou até mesmo nos solos na ausência das plantas hospedeiras, assim como por meio de suas estruturas de reprodução, os conídios (Swarupa *et al.*, 2014; Dita *et al.*, 2018). Então, considerando-se a forma de vida e propagação do Foc e o fato das bananeiras apresentarem longo ciclo de crescimento e produção, não seria viável implementar esquemas convencionais de combate à fusariose indicados para outras culturas (Ghag *et al.*, 2015; Ploetz, 2015), como aplicação de fungicidas. Outros agravantes relacionam-se à baixa quantidade necessária de inóculos para desencadear a doença na planta hospedeira, a difícil detecção antes da exteriorização dos sintomas e sua capacidade de sobreviver por longo período sobre matéria orgânica e plantas não hospedeiras; notadamente em plantas daninhas como fungo endofítico (Dita *et al.*, 2018; Pegg *et al.*, 2019). Neste sentido, o melhoramento de bananeiras visando a obtenção de variedades ou cultivares resistentes às novas raças de Foc é a medida de controle mais viável e ambientalmente correta (Ploetz, 2005; Ploetz, 2006; Altendorf, 2019; Rocha *et al.*, 2021).

Esforços são direcionados ao melhoramento genético da bananeira, principalmente em busca da resistência a doenças. No entanto, as cultivares comerciais são suscetíveis à infecção por Foc ST4; uma das principais ameaças atuais da cultura (Ploetz, 2005). Grande parte das estratégias empreendidas relacionam-se à obtenção de informações que possibilitam o desenvolvimento de cultivares resistentes a partir da identificação de genes de resistência das plantas (Rocha *et al.*, 2021) ou da compreensão da interação molecular patógeno-hospedeiro (Rocha *et al.*, 2022; Dong *et al.*, 2019).

O estudo conduzido por Chen *et al.* (2019), envolvendo diploides silvestres e híbridos poliploides inter e intra-específicos, demonstrou que a resistência a Foc é do tipo quantitativa, com ampla diversidade fenotípica, e possivelmente regulada de forma diferenciada em relação a Foc ST4 e Foc TR4. Os autores cogitam que há provável perda de um ou mais genes de resistência, que estão presentes nos representantes silvestres, ou perda de componentes da imunidade desencadeada

por padrão molecular associado a patógeno ou da imunidade desencadeada por efetor; duas importantes vias de resposta (Swarupa *et al.*, 2014).

A avaliação dos aspectos histológicos e da expressão gênica em bananeiras 'Cavendish' inoculadas por Foc 1 e Foc TR4, realizada por Dong *et al.* (2019), explicita diferenças em diferentes partes das plantas na regulação de genes de defesa contra os inóculos. Os maiores níveis de expressão gênica ocorreram nas plantas inoculadas com Foc 1, justificando a maior resistência desse subgrupo à doença. Da mesma forma, dez genes-chave avaliados (CERK1, FLS2, PBS1, PR-1, quitinase, LOX, JAZ, GST, celulose sintase e WRKY22), relacionados à defesa, apresentaram maiores taxas de expressão em resposta à inoculação com Foc 1. Em experimento adicional, os autores também comprovaram que o amido apresenta efeito inibitório sobre a fitotoxicidade induzida por ácido fusárico nos tecidos vegetais, levantando a hipótese de interação molecular gerando um complexo amido-ácido fusárico. Resultado semelhante na regulação diferenciada da resposta à Foc 1, Foc ST4 e Foc219A (supostamente Foc ST4, mais virulento e agressivo) foi identificado por Rocha *et al.* (2022) em 'Grande Naine', 'Prata-Anã' e 'BRS Princesa'.

Para Chen *et al.*, (2019), o rizoma é provavelmente o órgão chave da resistência, onde ocorre a inibição do crescimento do fungo para as outras estruturas da planta. Este entendimento converge para a hipótese de bloqueio da ascensão das hifas observado por Dong *et al.* (2019) por interação molecular do ácido fusárico com o amido, ainda no rizoma.

Wang *et al.* (2019) realizaram estudo comparativo entre os genomas A e B, visando subsidiar programas de melhoramento de *Musa* spp., com informações sobre o potencial de variações estruturais e expressão de alelos únicos. Os autores reportaram o enriquecimento do genoma B, no processo evolutivo do gênero *Musa*, com genes relacionados à fotossíntese e rotas de biossíntese de metabólitos secundários como inositol, amido, sacarose, ácido linoleico e araquidônico, com reconhecida função nas vias de defesa contra estresses bióticos e abióticos, direcionando a atenção para o papel do etileno e do amido na maturação de frutos e conservação pós-colheita.

Quanto ao papel complexo da poliploidia e grupos genômicos na resposta de defesa do gênero *Musa* spp., uma revisão sistemática recente, realizada por Rocha *et al.* (2021), sobre resistência de bananeiras à murcha de *Fusarium*, elencou 135 genótipos com diferentes níveis de tolerância ou resistência a Foc ST4, Foc TR4 ou a raça 1. Em relação a Foc ST4, os genótipos 'Williams' (AAA) e 'M61 Guadeloupe' (ploidia não informada) são ligeiramente suscetíveis; 'Ma851' (AA), 'Ma852' (AA), 'Calcutta4-IV9' (AA), 'SH-3362' (AA), 'SH-3142' (AA), 'Madang Guadeloupe' (AA), 'Ma850' (AA), 'Pisang Jari Buaya' (AA), 'GCTCV-119' (AAA), 'FHIA-25' (AAB), 'FHIA-01' 'Goldfinger' (AAAB) e 'FHIA-18' (AAAB), são fontes de resistência; enquanto 'Pahang' (AA) e 'Calcutta-4' (AA), são altamente resistentes.

Calcium-binding protein e resistência de plantas a patógenos

Para compreender os mecanismos que conferem resistência ou suscetibilidade às plantas, torna-se necessário entender os processos estabelecidos na co-existência das plantas com fatores bióticos e abióticos. Apesar de não ser possível falar de sistema imunológico vegetal, as plantas são dotadas da capacidade basal de reconhecimento de agentes estressantes e de inicialização estratégica de respostas de defesa (Peng *et al.*, 2018).

Tal habilidade decorre da interação dos padrões moleculares associados a micróbios ou patógenos (M/PAMP) com seus receptores de reconhecimento de padrões (RRP), quando localizados na superfície celular, ou receptores de repetição rica em leucina, de ligação à nucleotídeos (NLR), que são receptores intracelulares que detectam proteínas de patógenos (Zhou; Zhang, 2020). Quando esta relação é estabelecida, são iniciadas as estratégias de defesa, ou seja, a imunidade desencadeada por M/PAMPs – PTI, ou imunidade desencadeada por efector – ETI (Postel; Kemmerling, 2009; Peng *et al.*, 2018).

A PTI é a primeira linha de defesa das plantas. Quando o patógeno ou micrororganismo comensal é detectado por PPRs, ocorre o incremento na geração de ROS (espécies de oxigênio reativo) e o consequente influxo de íons cálcio através da membrana plasmática, além da superexpressão de genes relacionados à patogênese, alterações na sinalização por fitohormônios e incremento na deposição de calose (Dodds; Rathjen, 2010; Zhou; Zhang, 2020),

A cascata de eventos e sinalizações para ativação da resposta de defesa das plantas segue um caminho distinto para ETI, por ser diretamente relacionada à ativação de transcrição e expressão de genes de defesa, constituindo-se a segunda linha de defesa das plantas. No entanto, ambas, PTI e ETI, desencadeiam síntese de hormônios vegetais, reações oxidativas e influxos de íons, principalmente íons cálcio (Peng *et al.*, 2018), os quais são interceptados por proteínas de ligação ao cálcio – *calcium-binding proteins*.

Qualquer estímulo, por estresse biótico ou abiótico, traduz-se em alteração na concentração de íons Ca^{+2} na célula. A amplitude, a duração e a distribuição temporal e espacial desse Ca^{+2} são assinaturas passíveis de serem interpretadas por receptores, as proteínas ligadas ao cálcio, desencadeando respostas de defesa específicas (Lecourieux *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2019).

Nas plantas pode-se identificar tres tipos de proteínas de ligação ao cálcio, conhecidas como proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), proteína semelhante à calcineurina (CBL) e calmodulina (CaM) (Wang *et al.*, 2023). As proteínas quinase dependentes de cálcio (*calcium-dependent protein kinase* - CDPK) estão envolvidas em processos de resistência a estresses, ao crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando ao mesmo tempo na detecção de assinaturas de cálcio e na resposta ao estresse, fosforilando resíduos de serina e treonina de seus substratos (Dekomah *et al.*, 2022). As proteínas semelhantes à calcineurina (*calcineurin B-like protein* – CBL) estão relacionadas as respostas ao estresse abiótico, processos hormonais e de transporte de íons e interagem com as proteínas serinas-treoninas quinases que pertencem a família das quinases dependentes de CaM (Batistič e Kudla, 2009). As calmodulinas apresentam vários motivos *EF-hand*, que são estruturas conservadas do tipo hélice-alça-hélice, onde ligam-se os íons cálcio. Proteínas semelhantes à calmodulina (CML) apresentam no mínimo 16% de semelhança na sequência de aminoácidos presentes em CaM, porém sem o domínio quinase (Reddy *et al.*, 2004).

Uma recente revisão realizada por Wang *et al.* (2023) sintetiza as principais funções das proteínas CML mediando, nas plantas, respostas de crescimento e de defesa frente a estresses abióticos e bióticos. A mediação inclui percepção, tradução e expressão de genes à jusante. No estresse biótico podem atuar regulando positivamente ou negativamente a resistência às doenças (Wang *et al.*, 2023).

O melhoramento vegetal em *Musa* spp. e sua implicação na variabilidade e diversidade genética

O melhoramento da bananeira consiste na obtenção de tipos híbridos intra e interespecíficos diploides ($2n = 22$), triploides ($2n = 33$) e tetraploides ($2n = 44$) por método convencional, com o objetivo de agregar genes que conferem menor estatura, resistência a doenças, maior produtividade e boas características organolépticas para o consumidor, (Shepherd; Alves, 1981; Shepherd, 1987; Silva *et al.*, 2001; Amorim *et al.*, 2011). Em Shepherd (1987), estão resumidas as possíveis vias de melhoramento por cruzamentos em *Musa* spp., visando principalmente a obtenção de triploides e tetraploides (Creste *et al.*, 2003).

Os triploides podem ser obtidos por cruzamentos entre diploides e tetraploides e os tetraploides são obtidos por cruzamentos entre triploides e diploides (Shepherd, 1987). Na verdade, os produtos de cruzamentos em bananeira são bastante imprevisíveis, uma vez que pode ocorrer o desbalanceamento meiótico e recombinação homóloga entre os genomas A e B podendo gerar conjuntos de diferentes ploidias do esperado (Perrier *et al.* 2009).

Devido ao fenômeno da partenocarpia e propagação assexuada das bananeiras, o melhoramento clássico se torna bastante demorado, e a biotecnologia pode ajudar a acelerar a obtenção dos resultados desejados (Silva *et al.*, 2013). A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é uma das principais técnicas da biotecnologia utilizadas no melhoramento de bananeiras no que diz respeito à micropropagação e à indução de mutação e variação somaclonal (Ferreira *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2001). Apesar de ser uma técnica que possibilita a produção massal de clones, os vários subcultivos realizados em somaclones podem resultar em elevada taxa de variação genética quando comparada à produção convencional de mudas, consistindo em importante fonte de variabilidade (Jain, 2001; Peredo *et al.*, 2009).

Estas variações somaclonais são um conjunto de alterações que podem ser expressas fenotipicamente, resultantes de diversidade genética ou epigenética em relação à planta de origem e podem ser causadas por estresse durante o processo de multiplicação *in vitro* (Roux *et al.*, 2021). A variação epigenética não surge de alteração na sequência primária do DNA, mas sim de metilação do DNA (Peredo *et al.*, 2009) ou de alterações nas histonas por exemplo, podendo ser transitórias ou herdáveis, estando relacionadas à replicação do DNA (Iglesias; Cerdán, 2016; Gehring, 2019).

A variação somaclonal genética decorre de alterações na sequência do DNA, alterações nos genes ou cromossomo e apresenta estabilidade e herdabilidade (Roux *et al.*, 2021). Embora a delimitação conceitual entre mutações e variações somaclonais permaneça parcialmente na obscuridade (Bairu *et al.*, 2011), as variações somaclonais são similares a mutações sem envolvimento de fatores químicos ou físicos, cujas causas ainda são pouco entendidas (Roux *et al.*, 2021).

As fontes de variação somaclonal podem estar relacionadas às condições de variação pré-existent, como as aberrações cromossômicas que levam à instabilidade genética nas plantas regeneradas com consequente ativação de elementos transponíveis e metilações, silenciando ou ativando genes; ou estão relacionadas às próprias especificidades da cultura de tecido, como a desorganização na fase de crescimento, o uso de tecidos diferenciados em detrimento dos indiferenciados, o tipo e concentração de fitorreguladores, número e duração dos subcultivos e interação entre o genótipo e o ambiente (Bairu *et al.*, 2011). A partir dessa compreensão, vários estudos abordaram o uso de substâncias

(Ferreira *et al.*, 2020), toxinas (Rebouças *et al.*, 2021) e condições de cultivo (Santos; Rodrigues, 2004) potencialmente indutores de mutação na micropropagação de plantas *in vitro*, com o objetivo de obter variação somaclonal genética relacionada à resistência, principalmente, ao estresse biótico.

Uma das formas de se aumentar a indução de variantes somaclonais em meio de cultura é pelo uso de reguladores de crescimento sintéticos que podem provocar a superbrotação e estresse em plantas, como thidiazuron e pacobutrazol. Visando corroborar à hipótese da resistência a doenças induzida em cultura de tecidos, Ferreira *et al.* (2020) promoveram a regeneração de plantas derivadas de ápices caulinares de bananeiras da cultivar Prata Anã (AAB), conduzindo a micropropagação por 12 subcultivos em meio MS suplementado com sete diferentes combinações de fitoreguladores. A pesquisa resultou em dois somaclones resistentes a Foc ST4, dentre as 360 plantas que compuseram o tratamento com 1 ml.L⁻¹ de TDZ (thidiazuron).

Rebouças *et al.* (2021) induziram variação somaclonal em ápices caulinares das cultivares Grande Naine (AAA) e Maçã (AAB) que foram micropropagadas e subcultivadas em meio MS suplementado com 1 mg.L⁻¹ de PBZ (pacoblutrazol) e 1 mg.L⁻¹ de TDZ (thidiazuron). Após desafio com diferentes concentrações de ácido fusárico, com isolado de Foc ST4, duas plantas sobreviventes não apresentaram sintomas da doença, sendo selecionadas como resistentes a Foc ST4.

Embora a indução resulte em baixo percentual de mutantes resistentes (Ferreira *et al.*, 2020), independente da natureza da fonte de indução, a variação somaclonal pode gerar plantas resistentes ou tolerantes a estresse biótico ou abiótico com potencial aplicação prática da biotecnologia em programas de melhoramento (Silva *et al.*, 2001). Para esta finalidade, os clones variantes devem ser identificados em estágios iniciais do desenvolvimento das mudas, e devem apresentar estabilidade ao longo do processo (Jain, 2001). Assim, evita-se perdas com variantes indesejáveis a longo prazo e otimiza-se processos de melhoramento vegetal.

Uso de marcadores moleculares de DNA na caracterização da diversidade e da variabilidade genética vegetal

Os marcadores genéticos desempenham importante função nos estudos de diversidade e variabilidade por sinalizar regiões polimórficas (Arvas *et al.*, 2023; Kalendar *et al.*, 2011). De forma geral, os marcadores genéticos podem ser categorizados como marcadores clássicos e marcadores moleculares de DNA. Os principais marcadores clássicos são morfológicos, citológicos e bioquímicos. Os marcadores de DNA, conhecidos também como marcadores moleculares, são tipificados em função do método de detecção ao qual estão associados (Nadeen *et al.*, 2018) e possibilitam a identificação de variação entre sequências de nucleotídeos de uma determinada região do genoma auxiliando na caracterização de relações filogenéticas inter ou intraespecíficas (Kalendar *et al.*, 2011).

Os genomas das plantas apresentam abundantes regiões do DNA com sequências repetitivas, como elementos transponíveis e microssatélites, que são conservados, frequentes, e por vezes, comuns a várias espécies, possibilitando seu uso como marcadores moleculares em métodos de detecção de polimorfismo. No gênero *Musa*, 41,85% e 55,75% dos genomas A e B, respectivamente, são constituídos por elementos repetitivos (Wang *et al.*, 2019).

LTR Retrotransposons

Os elementos transponíveis são fragmentos do DNA que apresentam como características a repetição de seus elementos constitutivos, em tandem, além da capacidade de se deslocarem no DNA, geralmente ativada por situações de estresse biótico e abiótico (Kalendar *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2024). Acredita-se que esses elementos móveis repetitivos foram adquiridos ao longo do tempo pela transcrição de um RNA intermediário e possuem um papel importante na evolução dos genes em plantas.

Em função do mecanismo de deslocamento, que pode ser por recorte ou por transcrição, são classificados como transposons de DNA e retrotransposons. Os transposons de DNA, apresentam genes que codificam a enzima transposase, necessária para sua excisão e inserção em diferentes regiões do DNA com o mecanismo do tipo “corta-e-cola” e representam 2,12% do genoma B e 2.03% do genoma A em *Musa*. Os retrotransposons não apresentam as condições necessárias para seu recorte, mas utilizam o mecanismo “copia-e-cola” por transcrição para seu deslocamento (Morgante *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2019).

Os retrotransposons são considerados resquícios genéticos de retrovírus que se amplificam por ativação de mecanismo de transcrição reversa mediada por RNA (Arvas *et al.*, 2023), enquanto resposta adaptativa e de co-evolução com o genoma hospedeiro (Du *et al.*, 2006). Sua movimentação pode resultar na inserção em regiões próximas a genes, e seus elementos regulatórios e de sinalização podem interferir no padrão da expressão destes genes, bem como inativá-los por ação de silenciamento por metilação. Outra possibilidade é a inserção de transposon em um retrotransposon, que poderá copiá-lo e inseri-lo em novos locos (Du *et al.*, 2006).

Quanto a conformação, podem apresentar longo terminal repetitivo, os denominados LTR-retrotransposons, ou podem não apresentá-lo, denominando-se não-LTR retrotransposons. Retrotransposons LTR são os elementos móveis mais abundantes, constituindo de 45.1% a 21.1% da sequência genômica de milho e arroz, respectivamente (Du *et al.*, 2006), bem como no genoma A e B do gênero *Musa* spp., principalmente dos grupos Ty3-Gypsy and Ty1-Copia, com tendência à concentração em regiões conservadas próximas ao centrômero ou pericentroméricas (Wang *et al.*, 2019).

Na ativação por estresse, os LTR retrotransposons iniciam o processo de transcrição a partir de suas próprias enzimas codificantes gerando uma fita simples de RNA mensageiro, a qual dará origem a uma fita dupla de cDNA por transcrição reversa. Prossegue-se com a clivagem da molécula de DNA, integração do retrotransposon em novo locus e reparo da ligação (Papolu *et al.*, 2022; Arvas *et al.*, 2023).

O fato de retrotransposons apresentarem ampla inserção no genoma e apresentarem regiões conservadas, possibilita também que primers sejam desenhados para serem utilizados na amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por métodos de marcadores moleculares baseados em retrotransposons (Kalendar *et al.*, 1999). Dois desses métodos são o IRAP – *inter retrotransposon amplified polymorphism*, e REMAP - *retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism* (Kalendar *et al.*, 2011; Arvas *et al.*, 2022).

O método de marcadores IRAP foi desenvolvido a partir da proximidade entre dois LTRs (*Long Terminal Repeats*) (Kalendar *et al.*, 1999) e amplifica a região entre a porção LTR final de um retrotransposon e outro. O marcador REMAP identifica polimorfismos intragenéricos e intraespecíficos e amplifica a região entre a

porção LTR e o próximo microsatélite. IRAP e REMAP são marcadores dominantes e por este motivo, não possibilitam diferenciar indivíduos heterozigotos e homozigotos e a ausência de banda pode significar mutação no locus de inserção do primer ou falhas no procedimento (Kalendar *et al.*, 2011).

Arvas *et al.* (2022) investigaram o comportamento de retroransposons a partir de amostras de DNA genômico extraído em diferentes tempos, de folhas e raízes de plantas de *Oryza* spp. mutantes e não mutantes, cultivadas sob diferentes concentrações salinas em cultura de tecido. Usando marcadores moleculares IRAP e REMAP, os autores concluíram que os retrotransposons apresentam comportamento diferenciado nas diferentes partes da planta e detectaram ativação adicional desses elementos nas plantas mutantes.

Visando seleção de mamoeiros resistentes ao vírus da mancha anelar do mamão (PRSV), Rashid *et al.* (2014) realizaram a caracterização molecular de plantas das variedades Tainung 5, Eksotika 6 e seus híbridos usando marcadores IRAP. Os autores detectaram correlação entre genitores e progênes resistentes e combinação dos primers LTR 6150 e Nikita, sugerindo sua aplicação na seleção assistida por marcador.

Microsatélites

Os microsatélites constituem os elementos repetitivos do genoma de eucariotos e procariotos e são caracterizados por sequências curtas de 1 a 6 pares de bases, dispostas sequencialmente - em tandem, repetidas inúmeras vezes (Morgante *et al.*, 2007; Christelová *et al.*, 2011). Por esta característica, são denominados SSR - *Single Simple Repeat* ou ainda, STR - *Short Tandem Repeat* (Bagshaw, 2017).

No genoma, estes elementos repetitivos localizam-se tanto em regiões codificantes quanto não-codificantes (Zane *et al.*, 2002) e podem ser classificados quanto ao seu tamanho e à natureza da sua composição. Assim, os microsatélites podem ser, por exemplo, mononucleotídeos (A)_n, dinucleotídeos (GT)_n, trinucleotídeos (CAC)_n e podem ser do tipo simples (CA)_n ou composto (AAT)_nGT. Quanto ao tamanho, podem ser classificados como Classe I, quando apresentam 20 ou mais pares de bases ou Classe II quando apresentam menos de 20 pares de bases (Miah *et al.*, 2013; Arora *et al.*, 2018; Biswas *et al.*, 2024).

No gênero *Musa*, aproximadamente 80% dos microsatélites localizam-se em regiões intergênicas, representados por SSR classe I, enquanto os SSR curtos da classe II predominam tanto na região gênica, codificante, quanto intergênica (Biswas *et al.*, 2024). As principais características que permitem sua exploração como marcadores relacionam-se ao elevado percentual de polimorfismo, herança codominante e elevada reprodutibilidade, além da abundância e ampla dispersão no genoma e especificidade (Miah *et al.*, 2013).

O polimorfismo em microsatélites decorre dos mecanismos de deslizamento de replicação, bem como da recombinação, com forte interação entre ambas (Li *et al.*, 2002). Na replicação pode ocorrer erro no pareamento e conseqüente erro no deslizamento da fita, formando regiões instáveis que podem formar estruturas secundárias que escapam da correção. Na meiose ou mitose, a recombinação pode ser desequilibrada devido a elevada afinidade de regiões repetitivas por enzimas de recombinação. Ambas resultam em contração ou amplificação das repetições (Li *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2018; Hodel *et al.*, 2016).

Por serem marcadores codominantes podem explicitar ambos os alelos existentes no mesmo locus, permitindo a avaliação da homozigosidade em avaliação de linhagens ou elucidação de aspectos reprodutivos (Chiu *et al.*, 2015). Nos estudos de polimorfismo, a variabilidade genética é detectada por alterações no seu comprimento por aumento ou redução nas repetições sendo úteis em estudos de diversidade (Hinge *et al.*, 2022) e filogeográficos (Mertens *et al.*, 2022).

As principais limitações no uso de SSR como marcadores moleculares relacionam-se ao difícil isolamento dos locos contendo microsatélites nos genomas devido à necessidade de sequenciamento, resultando em elevado custo e tempo para seu desenvolvimento e otimização de reações de amplificação (Zane *et al.*, 2002).

No método PCR-ISSR, ocorre a amplificação de segmentos de DNA presentes em uma distância passível de amplificação, entre dois microsatélites idênticos orientados em sentidos opostos, por isso a origem da sigla ISSR – *Inter Simple Sequence Repeats*. Marcadores ISSR compartilham as mesmas especificidades dos marcadores SSR, com a vantagem de não demandar conhecimento prévio de uma sequência para a produção dos iniciadores (Palai; Rout, 2011). No entanto, são considerados marcadores dominantes. No método PCR-SSR, ocorre a amplificação de um segmento específico de elemento repetitivo presente no DNA da espécie em análise. Esses marcadores são usados para avaliar a diversidade genética em várias culturas (Chiu *et al.* 2015, Dehery e Das, 2022; Hinge *et al.* 2022; Premjet *et al.* 2022)

REFERÊNCIAS

ALTENDORF, S. The recent spread and potential future impact of the disease on global banana trade. *In*: FAO. **Food Outlook** - Biannual Report on Global Food Markets. Roma. Capítulo II - Commodity Focus. Banana Fusarium Wilt Tropical Race 4: A mounting threat to global banana markets? p. 12-20. 2019. Disponível em <https://www.fao.org/3/CA6911EN/CA6911EN.pdf>. Acesso em 10 julh. 2024.

AMORIM, E.P.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S. O.; PILLAY, M. Quality improvement of cultivated *Musa*. *In*: MICHAEL PILLAY; A.T. (Org.). **Banana Breeding: Progress and Challenges**. New York: CRC Press, 2011, p. 252-280. DOI 10.1201/b10514-14. Disponível em <https://doi.org/10.1201/b10514-14>.

ARORA, V.; KAPOOR, N.; FATMA, S.; JAISWAL, S.; IQUEBAL, M.A.; RAI, A.; KUMAR, D. BanSatDB, a whole-genome-based database of putative and experimentally validated microsatellite markers of three *Musa* species. **The Crop Journal**, v.6, n.6, p. 642-650. 2018. DOI: 10.1016/j.cj.2018.01.005. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.01.005>.

ARVAS, Y.E.; KOCAÇALIŞKAN, İ.; ORDU, E.; ERIŞEN, S. Comparative retrotransposon analysis of mutant and non-mutant rice varieties grown at different salt concentrations. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 36, n. 1, p. 25-33, 2022. DOI: 10.1080/13102818.2022.2043777. Disponível em <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2043777>.

ARVAS, Y.E.; MARAKLI, S.; KAYA, Y.; KALENDAR, R. The power of retrotransposons in high-throughput genotyping and sequencing. **Frontiers Plant**

Science, v.14, 1174339. 2023. DOI: 10.3389/fpls.2023.1174339. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1174339>.

BACKIYARANI, S.; SASIKALA, R.; SHARMILADEVI, S.; UMA, S.; Decoding the molecular mechanism of parthenocarpy in *Musa* spp. through protein-protein interaction network. **Scientific Reports**. v.11, n.14592. 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-93661-3. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93661-3>.

BAGSHAW, A.T.M. Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. **Genome Biology and Evolution**, v.9, n.9, p. 2428-2443. 2017. DOI: 10.1093/gbe/evx164. Disponível em <https://doi.org/10.1093/gbe/evx164>.

BAIRU, M.W.; AREMU, A.O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173. 2011. DOI 10.1007/s10725-010-9554-x. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>.

BATISTIČ, O.; KUDLA, J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v.1793, n. 6, p. 985-992. 2009. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.006. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.006>.

BAURENS, F-C.; MARTIN, G.; HERVOUET, C.; SALMON, F.; YOHOMÉ, D.; RICCI, S.; ROUARD, M.; HABAS, R.; LEMAINQUE, A.; YAHIAOUI, N.; D'HONT, A. Recombination and Large Structural Variations Shape Interspecific Edible Bananas Genomes. **Molecular Biology and Evolution**. v.36, n.1, p. 97-111, 2019. DOI: 10.1093/molbev/msy199. Disponível em <https://doi.org/10.1093/molbev/msy199>.

BELLO-BELLO, J. J.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; AVILÉS-VIÑAS, S. A.; GÓMEZ-UC, E.; CANTO-FLICK, A.; SANTANA-BUZZY, N. Somaclonal Variation in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as Assessed ISSR Molecular Markers, **HortScience horts**, v. 49, n. 4, p. 481-485. 2014. DOI: 10.21273/HORTSCI.49.4.481. Disponível em <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.4.481>.

BISWAS, M.K.; BISWAS, D.; YI, G.; DENG, G. The *Musa* Marker Database: A Comprehensive Genomic Resource for the Improvement of the Musaceae Family. **Agronomy**, v.14, 838. 2024. DOI: 10.3390/agronomy14040838. Disponível em <https://doi.org/10.3390/agronomy14040838>.

CARRACEDO, M.G.; PÉREZ, H.T.; FERRER, M.H.; ARIAS, D.J; PÉREZ, J.A. Comparative assessment of microsatellite and retrotransposon-based markers for genetic characterization of commercial banana cultivars (*Musa* spp.). **Plant Breeding**, v. 140, n. 5, p. 968-980. 2021. DOI: 10.1111/pbr.12960. Disponível em <https://doi.org/10.1111/pbr.12960>.

CASTELAN, F. P.; SARAIVA, L. A.; LANGE, F.; DE LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; CORDENUNSI, B. R.; CHILLET, M. Effects of Black Leaf Streak Disease and Sigatoka Disease on fruit quality and maturation process of bananas produced in the subtropical conditions of southern Brazil. **Crop Protection**, v. 35, p. 127-131, 2012.

DOI 10.1016/j.cropro.2011.08.002. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.08.002>.

CASTRO, N.R.; COELHO, R.S.B; LARANJEIRA, D.; COUTO, E.F.; SOUZA, M.B.R. Occurrence, inoculation methods and aggressivity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in *Heliconia* spp. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.127-130, 2008. DOI: 10.1590/S0100-54052008000200003. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000200003>.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA. Banana. **Anuário Hortifruti Brasil: Retrospectiva 2022 & Perspectiva 2023**. p. 27-28. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. 2022. Disponível em <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/anuario-hf-brasil-retrospectiva-2022-perspectiva-2023.aspx>. Acesso em 27 ago. 2023.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA. Banana. **Anuário Hortifruti Brasil: Retrospectiva 2023 & Perspectiva 2024**. p. 26-27. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. 2023. Disponível em <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/anuario-hf-brasil-retrospectiva-2023-perspectiva-2024.aspx>. Acesso em 10 jul. 2024.

CHEN, A.; SUN, J.; MATTHEWS, A.; ARMAS-EGAS, L.; CHEN, N.; HAMILL, S.; MINTOFF, S.; TRAN-NGUYEN, L.T.T.; BATLEY, J.; AITKEN, E.A.B. Assessing Variations in Host Resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* Race 4 in Musa Species, With a Focus on the Subtropical Race 4. **Frontiers in Microbiology**. v.10, p.1062. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01062. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01062>.

CHEESMAN, E. E. Classification of the Bananas: The Genus Musa L. **Kew Bulletin**, v. 2, n. 2, p. 106-117. 1947. DOI 10.2307/4109207. Disponível em <https://doi.org/10.2307/4109207>.

CHIU, C.T.; WANG, C.W.; CHEN, F.C.; QUEIXO, S.W.; LIU, C.C.; LEE, M.J.; CHUNG, W.C.; CÃO, Y.H.; CHANG, H.J.; LEE, C.Y. Sexual genetic and simple sequence repeat (SSR) analysis for molecular marker development on the all hermaphrodite papaya. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.1, p. 2502-2511. 2015. DOI:10.4238/2015.March.30.8. Disponível em <http://dx.doi.org/10.4238/2015.March.30.8>.

CHRISTELOVÁ, P.; VALÁRIK, M.; HŘIBOVÁ, E.; HOUWE, I.V.D.; CHANNELIÈRE, S.; ROUX, N.; DOLEŽEL, J. A platform for efficient genotyping in *Musa* using microsatellite markers. **AoB Plants**. Special issue plr024, p. 1-14, 2011:2011:plr024. 2011. DOI: 10.1093/aobpla/plr024. Disponível em <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr024>.

CRESTE, S.; NETO, A.T.; SILVA, S.D.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica** v.132, pp. 259-268. 2003. DOI: 10.1023/A:1025047421843. Disponível em <https://doi.org/10.1023/A:1025047421843>.

DEWIR, Y.H.; NURMANSYAH, N.Y.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. **Plant Cell Rep**, v. 37, n. 11, p. 1451-1470. 2018. DOI: 10.1007/s00299-018-2326-1. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2326-1>.

DEHERY, S.K.; DAS, A.B. Genetic diversity of twelve triploid bananas and plantains under section Eumusa as evident by chromosome morphology and SSR markers. **Nucleus**, v.65, p. 35-48. 2022. DOI: 10.1007/s13237-021-00364-1. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s13237-021-00364-1>.

DEKOMAH, S.D.; BI, Z.; DORMATEY, R.; WANG, Y.; HAIDER, F.U.; SUN, C.; YAO, P.; BAI, J. The role of CDPKs in plant development, nutrient and stress signaling. **Frontiers in Genetics**, v.13, n. 996203. 2022. DOI: 10.3389/fgene.2022.996203. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.996203>.

DITA, M.A.; BARQUERO, M.; HECK, D.; MIZUBUTI, E.S.G.; STAYER, C.P. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers in Plant Sciences**, v.9, n.1468, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01468. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>.

DITA, M.A.; RIBEIRO, L.; AMORIM, E.P.; CORDEIRO, Z.J.M.; SILVA, S.O. Metodologia para caracterização de genótipos de bananeira quanto à resistência ao mal-do-Panamá em casa de vegetação. **Comunicado Técnico**, v.1, n.150, p. 1-5, 2011. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/56538/1/comunicado-150.pdf>. Acessado em 27 ago. 2023.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**. v.11, n.8, p. 539-548. 2010. DOI: 10.1038/nrg2812. Disponível em <https://doi.org/10.1038/nrg2812>.

DONG, H.; FAN, H.; LEI, Z.; WU, C.; ZHOU, D.; LI, H. Histological and Gene Expression Analyses in Banana Reveals the Pathogenic Differences between Races 1 and 4 of Banana Fusarium Wilt Pathogen. **Phytopathology**, v. 109, n. 6, p. 1029-1042, 2019. DOI 10.1094/PHYTO-10-18-0384-R. Disponível em: <https://doi.gov/10.1094/PHYTO-10-18-0384-R>.

DU, C.; SWIGOŃOVÁ, Z.; MESSING, J. Retrotranspositions in orthologous regions of closely related grass species. **BMC Evolutionary Biology**, v.6, n.62. 2006. DOI: 10.1186/1471-2148-6-62. Disponível em <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-62>

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Roma: FAO, 2024. Disponível Em <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acessado em 10 jul. 2024.

FERREIRA, M. dos S.; MOURA, É.R. de; LINO, L.S.M.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A.dos; HADDAD, F. Selection of somaclonal variants of the cultivar 'Prata-Anã' for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. **Revista**

Brasileira de Fruticultura, v. 42, n.6, 2020. DOI: 10.1590/0100-29452020620. Disponível em <https://doi.gov/10.1590/0100-29452020620>.

FERREIRA, M.D.S.; ROCHA, A.D.J.; NASCIMENTO, F.D.S.; OLIVEIRA, W.D.D.S.; SOARES, J.M.D.S.; REBOUÇAS, T.A.; MORAIS LINO, L.S.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; SANTOS-SEREJO, J.A.D.; FERNÁNDEZ, J.S.; AMORIM, E.P. The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p.730. 2023. DOI: 10.3390/agronomy13030730. Disponível em <https://doi.gov/10.3390/agronomy13030730>.

FU, N.; JI, M.; ROUARD, M.; YAN, H-F.; GE, X-J. Comparative plastome analysis of Musaceae and new insights into phylogenetic relationships. **BMC Genomics**, v.23, p. 223. 2022. DOI: 10.1186/s12864-022-08454-3. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08454-3>.

GHAG, S.B.; SHEKHAWAT, U.K.S.; GANAPATHI, T.R. Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. **International Journal of Pest Management**, v. 61, n. 3, p. 250-263. 2015. DOI: 10.1080/09670874.2015.1043972. Disponível em <https://doi.gov/10.1080/09670874.2015.1043972>.

GEHRING, M. Epigenetic dynamics during flowering plant reproduction: evidence for reprogramming? **New Phytologist**, v.224, n.91-96. 2019. DOI 10.1111/nph.15856. Disponível em <https://doi.org/10.1111/nph.15856>.

HÄKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). **Taxon**, v. 62, n. 4, p. 809-813, 2013. DOI: 10.12705/624.3. Disponível em <https://doi.org/10.12705/624.3>.

HINGE, V.R.; SHAIKH, I.M.; CHAVHAN, R.L.; DESHMUKH, A.S.; SHELAKHE, R.M.; GHUGE, S.A.; DETHE, A.;M.; SUPRASANNA, P.; KADAM, U.S. Assessment of genetic diversity and volatile content of commercially grown banana (*Musa* spp.) cultivars. **Scientific Reports**, v.12, 7979. 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-11992-1. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11992-1>.

HODEL, R.G.J., SEGOVIA-SALCEDO, M.C., LANDIS, J.B., CROWL, A.A., SUN, M., LIU, X., GITZENDANNER, M.A., DOUGLAS, N.A., GERMAIN-AUBREY, C.C., CHEN, S., SOLTIS, D.E. AND SOLTIS, P.S. The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. **Applications in Plant Sciences**, v.4, 1600025. 2016. DOI: 10.3732/apps.1600025. Disponível em <https://doi.org/10.3732/apps.1600025>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE, 2024a. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acessado em 10 jul. 2024.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2024b. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>. Acessado em 10 julh. 2024.

IGLESIAS, F. M.; CERDÁN, P. D. Maintaining Epigenetic Inheritance During DNA Replication in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.38, 2016. DOI 10.3389/fpls.2016.00038. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00038>.

JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, n. 2, p. 153-166, 2001. DOI: 10.1023/A:1004124519479. Disponível em <https://doi.org/10.1023/A:1004124519479>.

KALENDAR, R.; GROB, T.; REGINA, M.; SUONIEMI, A.; SCHULMAN, A. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 5, p. 704-711, 1999. DOI: 10.1007/s001220051124. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s001220051124>.

KALENDAR, R.; FLAVELL, A. J.; ELLIS, T H N; SJAKSTE, T.; MOISY, C.; SCHULMAN, A. H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. **Heredity**, v. 106, n. 4, p. 520-530, 2011. DOI: 10.1038/hdy.2010.93. Disponível em <https://10.1038/hdy.2010.93>.

LECOURIEUX, D.; RANJEVA, R.; PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, v.171, p. 249-269. 2006. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01777.x. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01777.x>.

LI, Y.-C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 2453-2465. 2002. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x . Disponível em <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>

LIU, A.Z.; KRESS, W. J.; LI, D.Z. Phylogenetic analyses of the banana family (Musaceae) based on nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (trnL - F) evidence. **Taxon**, v. 59, n. 1, p. 20-28, 2010. DOI: 10.1002/tax.591003. Disponível em <https://doi.gov/10.1002/tax.591003>.

LIU, X.; ARSHAD, R.; WANG, X.; LI, W-M.; ZHOU, Y.; GE, X-J.; HUANG, H-R. The phased telomere-to-telomere reference genome of *Musa acuminata*, a main contributor to banana cultivars. **Scientif Data**, v.10, n. 631, p. 1-13. 2023. DOI: 10.1038/s41597-023-02546-9. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41597-023-02546-9>.

LU, L.; RONG, W.; ZHOU, R.; HUO, N.; ZHANG, Z. TaCML36, a wheat calmodulin-like protein, positively participates in an immune response to *Rhizoctonia cerealis*. *The Crop Journal*, v.7, n.5, p. 608-618. 2019. DOI: 10.1016/j.cj.2019.02.001. Disponível em <https://doi.org.ez278.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.cj.2019.02.001>.

MENA, R.A.S.; STOORVOGEL, J.J.; GARCÍA-BASTIDAS, F.; SALACINAS-NIEZ, M.; KEMA, G. H.J.; SANDOVAL, J. A. Evaluating the potential of soil management to reduce the effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana (*Musa* AAA). **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, n. 2. 2014. DOI: 10.1007/s10658-021-02255-2. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02255-2>.

MERTENS, A.; BAWIN, Y.; VANDEN ABEELE, S.; KALLOW, S.; SWENNEN, R.; VU, D.T.; VU, T.D.; MINH, H.T.; PANIS, B.; VANDELOOK, F.; JANSSENS, S.B. Phylogeography and conservation gaps of *Musa balbisiana* Colla genetic diversity revealed by microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.69, n.7, p. 2515-2534. 2022. DOI: 10.1007/s10722-022-01389-4. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01389-4>.

MIAH, G.; RAFII, M.; ISMAIL, M.R.; PUTEH, A.B.; RAHIM, H.A.; ISLAM, K.H.N.; LATIF, M.A. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **Int J Mol Sci**. v.14, n.11, p. 22499-22528. 2013. DOI: 10.3390/ijms141122499. Disponível em <https://doi.org/10.3390/ijms141122499>.

MORGANTE, M.; PAOLI, e.; RADOVIC, S. Transposable elements and the plant pan-genomes. **Plant Biology**, v.10, p.149-155. 2007. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.02.001. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.02.001>.

NADEEM, M.A.; NAWAZ, M.A.; SHAHID, M.Q.; DOĞAN, Y.; COMERTPAY, G.; YILDIZ, M.; HATIPOĞLU, R.; AHMAD, F.; ALSALEH, A.; LABHANE, N.; ÖZKAN, H.; CHUNG, G.; BALOCH, F.S. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.32, n.2, p. 261-285, 2018. DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401. Disponível em <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>.

NGATAT, S.; HANNA, R.; LIENOU, J.; GHOGOMU, R.T.; NGUIDANG, S.P.K.; ENOH, A.C.; NDEMBA, B.; KORIE, S.; FOTSO KUATE, A.; NANGA NANGA, S.; FIABOE, K.K.M; KUMAR, P.L.. Musa Germplasm A and B Genomic Composition Differentially Affects Their Susceptibility to Banana Bunchy Top Virus and Its Aphid Vector, *Pentalonia nigronervosa*. **Plants**, v.11, n.9. p.1206, 2022. DOI 10.3390/plants11091206. Disponível em <https://doi.org/10.3390/plants11091206>.

OCIMATI, W.; BOUWMEESTER, H.; GROOT, J.C.J.; TITTONELL, P.; BROWN, D.; BLOMME, G. The Risk Posed by Xanthomonas Wilt Disease of Banana: Mapping of Disease Hotspots, Fronts and Vulnerable Landscapes. **PloS One**, v.14, n.4, E0213691. Web, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0213691. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213691>.

PALAI, S.; ROUT, G.R. Characterization of new variety of *Chrysanthemum* by using ISSR markers. **Horticultura Brasileira**, v.29, n.4, p. 613-617. 2011. DOI: 10.1590/S0102-05362011000400029. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0102-05362011000400029>.

PAPOLU, P. K.; RAMAKRISHNAN, M.; MULLASSERI, S.; KALENDAR, R.; WEI, Q.; ZOU, L. H.; AHMAD, Z.; VINOD, K.K.; YANG, P.; ZHOU, M. Retrotransposons: how the continuous evolutionary front shapes plant genomes for response to heat stress. **Frontiers Plant Science**, v.13, 1064847. 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.1064847. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1064847>.

PEGG, K.G.; COATES, L.M.; O'NEILL, W.T.; TURNER, D.W. The Epidemiology of Fusarium Wilt of Banana. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1395, 2019. DOI: [10.3389/fpls.2019.01395](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01395). Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01395>.

PENG, Y.; WERSCH, R.V.; ZHANG, E. Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.31, n.4. 2018. DOI: [10.1094/MPMI-06-17-0145-CR](https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0145-CR). Disponível em <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0145-CR>.

PEREDO, E.L.; ARROYO-GARCÍA, R.; REVILLA, M.Á. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. **Journal of Plant Physiology**, v.166, n.10, p. 1101-1111, 2009. DOI: [10.1016/j.jplph.2008.12.015](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.12.015). Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.12.015>.

PERRIER, X.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HORRY, J.P.; LEBOT, V.; HIPPOLYTE, I. Combining biological approaches to shed light on evolution of edible bananas. **Ethnobotany Research and Applications**, v.7, p. 199-216. 2009. Disponível em <https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/362>. Acesso em 13 jul. 2024.

PLOETZ, R.C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015. DOI: [10.1016/j.cropro.2015.01.007](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.007). Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.007>.

PLOETZ, R.C. Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v.96, n.6, p. 653-256. 2006. DOI: [10.1094/PHYTO-96-0653](https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0653). Disponível em <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0653>.

PLOETZ, R.C. *Fusarium*-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops. **Phytopathology**, v.96, n.6, p. 648-652. 2005. DOI: [10.1094/phyto-96-0648](https://doi.org/10.1094/phyto-96-0648). Disponível em <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0648>.

POSTEL, S.; KEMMERLING, B. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.20, p. 1025-1031. 2009. DOI: [10.1016/j.semcdb.2009.06.002](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.06.002). Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.06.002>.

PREMJET, D.; BOONSRANGSOM, T.; SUJIPULI, K.; RATTANASUT, K.; KONGBUNGKERD, A.; PREMJET, S. Morphological and Molecular Characterizations of *Musa* (ABB) 'Mali-Ong' in Thailand. **Biology**, v.11, n.10, 1429. 2022. DOI: [10.3390/biology11101429](https://doi.org/10.3390/biology11101429). Disponível em <https://doi.org/10.3390/biology11101429>.

RASHID, K.; OTHMAN, R.Y.; ALI, B.S.B.K.S.; YUSOF, Y.M.; NEZHADAHMADI, A. The Application of Irap Markers in the Breeding of Papaya (*Carica papaya* L.). **Indian Journal of Science and Technology**, v.7, n.9, p. 1720-1728, 2014. DOI: [10.17485/ijst/2014/v7i11.1](https://dx.doi.org/10.17485/ijst/2014/v7i11.1). Disponível em <https://dx.doi.org/10.17485/ijst/2014/v7i11.1>.

REBOUÇAS, T.A.; DE JESUS ROCHA, A.; CERQUEIRA, T.S.; ADORNO, P.R.; BARRETO, R.Q.; FERREIRA, M.S.; LINO, L.S.M.; AMORIM, V.B.O.; SANTOS-SEREJO, J.A.S.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P. Pre-selection of banana somaclones resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, subtropical race 4. **Crop Protection**, v. 147, p. 105692. 2021. DOI 10.1016/j.cropro.2021.105692. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105692>.

RIJZAANI, H; BAYER, P. E.; ROUARD, M.; DOLEŽEL, J.; BATLEY, J.; EDWARDS, D. The pangenome of banana highlights differences between genera and genomes. **The Plant Genome**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1002/tpg2.20100. Disponível em <https://doi.org/10.1002/tpg2.20100>.

ROCHA, A.J.; SOARES, J.M.S.; NASCIMENTO, F.S.; SANTOS, A.S.; AMORIM, V.B.O.; FERREIRA, C.F.; HADDAD, F.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, E.P. Improvements in the Resistance of the Banana Species to Fusarium Wilt: A Systematic Review of Methods and Perspectives. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 249. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/jof7040249>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/4/249>.

ROCHA, A.D.J.; SOARES, J.M.D.S.; NASCIMENTO, F.D.S.; ROCHA, A.D.S.; AMORIM, V.B.O.D.; RAMOS, A.P.D.S.; FERREIRA, C.F.; HADDAD, F.; AMORIM, E.P. Molecular, Histological and Histochemical Responses of Banana Cultivars Challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* with Different Levels of Virulence. **Plants**. v.11, n.18, p. 2339. 2022. DOI: 10.3390/plants11182339. Disponível em <https://doi.org/10.3390/plants11182339>.

ROUX, N.; CHASE, R.; VAN DEN HOUWE, I.; CHAO, C.; PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P.; SARDOS, J.; ROUARD, Somaclonal variation in clonal crops: containing the bad, exploring the good. In: SIVASANKAR, S. (eds.) **Mutation breeding, genetic diversity and crop adaptation to climate change**. Oxfordshire (UK): CABI. p. 355-365. 2021. Disponível em <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/116597>. Acessado em 26 out. 2023.

SANTOS, C.C.C.; RODRIGUES, P.H.V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia** [online], v.63, n.2, p. 201-205. 2004. DOI 10.1590/S0006-87052004000200005. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0006-87052004000200005>.

SANTOS, C.C.C.; RODRIGUES, P.H.V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia** [online], v. 63, n. 2, pp. 201-205. 2004. DOI: 10.1590/S0006-87052004000200005. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0006-87052004000200005>.

SHEPHERD, K.; ALVES, E.J. The banana breeding programme at the Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Bahia State, Brazil. **Fruits**, v.39, n.3, p.154-157. 1981. Disponível em <https://revues.cirad.fr/index.php/fruits/article/view/34793>. Acessado em 26 out. 2023.

SHEPHERD, K. Banana Breeding - Past and Present. **Acta Horticulture**, v.196, p. 37-44. 1987. DOI: 10.17660/ActaHortic.1987.196.3v. Disponível em <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.196.3v>.

SHIMWELA, M.M.; MAHUKU, G; MBANZIBWA, D.R; MKAMILO, G.; MARK, D.; MOSHA, H.I; PALLANGYYO, B.; FIHAVANGO, M.; ORESANYA, A.; OGUNSANYA, P.; KUMAR, P.L.. First Report of Banana Bunchy Top Virus in Banana and Plantain (*Musa* spp.) in Tanzania. **Plant Disease**, v.106, n.4., p. 1312-1312. 2022. DOI: 10.1094/PDIS-07-21-1387-PDN. Disponível em <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-07-21-1387-PDN>.

SILVA, S.O.; SOUZA JUNIOR, M.T.; ALVES, É.J.; SILVEIRA, J.R.S.; LIMA, M.B. Banana Breeding Program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001. DOI: 10.13082/1984-7033.v01n04a09. Disponível em <https://doi.org/10.13082/1984-7033.v01n04a09>.

SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A.; FERREIRA, C.F.; RODRIGUEZ, M.A.D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013. DOI: 10.1590/S0100-29452013000300032. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000300032>.

SILVA, S.O.; MATOS, A.P.; ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. **Revista Pesquisa Agropecuária**, v.33, n.5, p.693-703, 1998. Disponível em <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44946/1/MELHORAMENTO-GENETICO.pdf>. Acesso em 03 ago. 2024.

SIMBARE, A.; SANE, C.A.B.; NDUWIMANA, I.; NIYONGERE, C.; OMONDI, B.A. Diminishing Farm Diversity of East African Highland Bananas in Banana Bunchy Top Disease Outbreak Areas of Burundi: The Effect of Both Disease and Control Approaches. **Sustainability**, v. 12, n. 18, p. 7467, 2020. DOI: 10.3390/su12187467. Disponível <https://doi.org/10.3390/su12187467>.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society of London**, Botany, v. 55, n. 359, p. 302-312. 1955. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x>.

SWARUPA, V.; RAVISHANKAR, K. V.; REKHA, A. Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. **Planta**, v. 239, n. 4, p. 735-751, 14 Abr. 2014. DOI: 10.1007/s00425-013-2024-8. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2024-8>.

TIMM, E.S.; PARDO, L.H.; COELLO, R.P.; NAVARRETE, T.C.; VILLEGAS, O.N.; ORDÓÑEZ, E.S. Identification of Differentially-Expressed Genes in Response to *Mycosphaerella fijiensis* in the Resistant *Musa* Accession 'Calcutta-4' Using Suppression Subtractive Hybridization. **PloS One**, v,11, n.8, p. e0160083. DOI 10.1371/journal.pone.0160083. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160083>.

TRIPATHI, L.; TRIPATHI, J.N.; SHAH, T.; MUIRURI, K.S.; KATARI, M. Molecular Basis of Disease Resistance in Banana Progenitor *Musa balbisiana* against *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. **Scientific Report**, v.9, n.1, p. 7007. 2019. DOI 10.1038/s41598-019-43421-1. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43421-1>.

VILHENA, R.O.; MARSON, B.M.; BUDEL, J.M.; AMANO, E.; MESSIAS-REASON, I.J.T.; PONTAROLO, R. Morpho-anatomy of the inflorescence of *Musa* × *paradisica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.29, p.147-151, 2019. DOI: 10.1016/j.bjp.2019.01.003. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.01.003>.

WANG, Z.; MIAO, H.; LIU, J.; XU, B.; YAO, X.; XU, C.; ZHAO, S.; FANG, X.; JIA, C.; WANG, J.; ZHANG, JINGYI.; LI, J.; XU, Y.; WANG, JIASHUI.; MA, W.; WU, Z.; YU, L.; YANG, Y.; LIU, C.; GUO, Y.; SUN, S.; BAURENS, F.-C.; MARTIN, G.; SALMON, F.; GARSMEUR, O.; YAHIAOUI, N.; HERVOUET, C.; ROUARD, M.; LABOUREAU, N.; HABAS, R.; RICCI, S.; PENG, M.; GUO, A.; XIE, J.; LI, Y.; DING, Z.; YAN, Y.; TIE, W.; D'HONT, A.; HU, W.; JIN, Z. *Musa balbisiana* genome reveals subgenome evolution and functional divergence. **Nature Plants**, v.5, p. 810-821. 2019. DOI: 10.1038/s41477-019-0452-6. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0452-6>.

WANG, L.; LIU, Z.; HAN, S.; LIU, P.; SADEGHNEZHAD, E.; LIU, M. Growth or survival: What is the role of calmodulin-like proteins in plant? **International Journal of Biological Macromolecules**, v.242, n.1, 124733, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124733. Disponível em <https://doi-org.ez278.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ijbiomac.2023.124733>.

WARMAN, N.M.; AITKEN, E.A.B. The Movement of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. **Frontiers in Plant Sciences**. v.9, n. 1748. 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01748. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01748>.

WU, W.; YANG, Y.-L.; HE, W.-M.; ROUARD, M.; LI, W.-M.; XU, M.; ROUX, N.; GE, X.-J. Whole genome sequencing of a banana wild relative *Musa itinerans* provides insights into lineage-specific diversification of the *Musa* genus. **Science Report**, v.6, 31586. 2016. DOI: 10.1038/srep31586. Disponível em <https://doi.org/10.1038/srep31586>.

WU, K.L.; CHEN, W.Z.; YANG, S.; WEN, Y.; ZHENG, Y.R.; ANJAGO, W.M.; YUN, Y.Z.; WANG, Z.H.. Isolation and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Fujian Province, China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 8, p. 1905-1913, 2019. DOI: 10.1016/S2095-3119(18)62149-5. Disponível em [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62149-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62149-5).

YUZBASIOGLU, G.; YILMAZ, S.; MARAKLI, S.; GOZUKIRMIZI, N. Analysis of Hopi / Osr27 and Houba / Tos5 / Osr13 retrotransposons in rice. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 2, p. 213-218, 2016. DOI: 10.1080/13102818.2015.1124026. Disponível em <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1124026>.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, n.1, p. 1-16. 2002. DOI:10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x. Disponível em <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x>.

ZHOU, J.-M.; ZHANG, Y. Plant Immunity: Danger Perception and Signaling. **Cell**, v.181, n.5, p. 978-989. 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.028. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.028>.

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE SOMACLONES DE 'GRANDE NAINE' (*Musa* spp.), RESISTENTES a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* RAÇA 4 SUBTROPICAL ¹

¹ Capítulo formatado para submissão ao periódico Science Horticulturae

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE SOMACLONES DE 'GRANDE NAINÉ' (*Musa* spp.), RESISTENTES a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* RAÇA 4 SUBTROPICAL

RESUMO

Os frutos frescos de 'Grande Nainé' (Cavendish AAA – *Musa* spp.) dominam o mercado mundial, principalmente em países com população em situação de vulnerabilidade social por gerar renda e garantir segurança alimentar e nutricional. No entanto, a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* raça 4 Subtropical (Foc ST4), desponta como grave ameaça à produção de bananas demandando o desenvolvimento de cultivares resistentes a partir de estratégias biotecnológicas, como a indução de mutação em cultura de tecidos. Neste estudo, objetivou-se identificar e caracterizar variação genética em quatro somaclones derivados de 'Grande Nainé' resistentes ao Foc ST4, por marcadores moleculares baseados em retrotransposons, IRAP (*Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism*) e REMAP (*Retrotransposon-Microsatelite Amplified Polymorphism*). Nove combinações de primers IRAP e seis de primers REMAP, foram utilizadas. O baixo percentual polimórfico impossibilitou o estudo aprofundado de diversidade genética. No entanto, três bandas se destacaram como polimórficas para a maioria dos somaclones em relação ao controle, e foram sequenciadas (*paired-end*), a citar: Banda 1AF, LTR6149 (T1B2P6) + Nikita – presente em todos os somaclones (1-12), banda 2AF, 3' LTR (T1B2P2) + Nikita (1-12) e banda 3AF, Sukula + LTR6150 (1-11). As sequências foram analisadas com a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e informações complementadas pela busca de função biológica. Apesar de todas as bandas pertencerem à espécie *Musa acuminata*, apenas a banda 1AF teve resposta relacionada ao estresse com proteína de função de ligação com cálcio (Calcium-binding protein). Essas proteínas são de extrema importância para resistência das plantas a doenças. Atuam precocemente na infecção das plantas como mensageiros secundários ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), iniciando a cascata de sinais de defesa da planta. O fato desta banda estar presente em todos os somaclones, reforça as avaliações anteriores de resistência à FocST4. Esse resultado mostra que os marcadores IRAP e REMAP foram capazes de identificar bandas polimórficas que podem apontar, mediante validação futura, somaclones provenientes da 'Grande Nainé' resistentes a Foc ST4 em estágios precoces de desenvolvimento, e com isso acelerar a identificação rápida de materiais de interesse para o PMGB da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Palavras-chave: Diversidade, Retrotransposons; IRAP; REMAP; BLAST

ABSTRACT

The fresh fruits of 'Grande Nainé' (Cavendish AAA – *Musa* spp.) dominate the world market, especially in countries with a population in a situation of social vulnerability where it generates income and ensures food and nutritional security. However, *Fusarium* wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* subtropical race 4 (Foc ST4), emerges as a serious threat to banana production, demanding the development of resistant cultivars based on biotechnological strategies, such as the induction of mutation in tissue culture. The objective of this study was to identify and

characterize genetic variation in four Foc ST4-resistant 'Grande Naine' derived somaclones by molecular markers based on retrotransposons, IRAP (Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism) and REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism). Nine combinations of IRAP primers and six of REMAP primers, were used. Due to the low number of polymorphic bands it was not possible to study the genetic diversity in depth. However, three bands stood out as polymorphic for most of the somaclones in relation to the control, and were sequenced (paired-end), namely: Band 1AF, LTR6149 (T1B2P6) + Nikita – in all somaclones (1-12), band 2AF, 3' LTR (T1B2P2) + Nikita (1-12) and band 3AF, Sukula + LTR6150 (1-11). The sequences were analyzed with the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and information complemented by the search for biological function. Although all bands belong to the species *Musa acuminata*, only band 1AF had a stress-related response with calcium-binding protein. These proteins are extremely important for plant resistance to diseases. They act early in plant infection as secondary messengers activated by molecular patterns associated with plant infection. The fact that this band is present in all somaclones reinforces previous evaluations of resistance to FocST4. This result shows that the IRAP and REMAP markers were able to identify polymorphic bands that can point, through future validation, to somaclones from the 'Grande Naine' resistant to Foc ST4 in early stages of development, and thus accelerate the rapid identification of materials of interest for the BGBP at Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Keywords: Diversity, Retrotransposons; IRAP; REMAP; BLAST

1. Introdução

Originadas no sudeste asiático, as bananeiras do gênero *Musa* spp. destacam-se na fruticultura de países tropicais e subtropicais (FAO, 2024; Rijzaani *et al.*, 2021; Fu *et al.*, 2022), especialmente devido aos frutos frescos do subgrupo Cavendish (AAA); uma importante commodity no mercado global e alimento básico para populações socialmente vulneráveis (FAO, 2024; Bebbber, 2022). Em 2022, a produção mundial de bananas atingiu aproximadamente 135 milhões de toneladas da fruta, em uma área de 5,9 milhões de hectares, sendo a Ásia responsável por 51,8% da produção total, seguida pelas Américas (23,8%) e África (22,8%) (FAO, 2024).

Esta ampla distribuição geográfica e consequente adaptação das bananeiras em diferentes ambientes, resultam em variadas interações entre seus genótipos e os patógenos locais. No entanto, o gênero *Musa* apresenta reduzida diversidade de genes relacionados à resistência (Rijzaani *et al.*, 2021) e as bananeiras comumente cultivadas são suscetíveis, com diferentes níveis de tolerância ou resistência a fitopatologias bacterianas, virais e fúngicas (Ocimati *et al.*, 2019; Simbare *et al.*, 2020; Castelan *et al.*, 2012). Dentre as doenças fúngicas, a murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen (Foc), raças 1, 2 e 4 (Ploetz, 2015; Mena *et al.*, 2014), ganha maior destaque.

O Foc impacta a produtividade das plantações de bananeiras podendo dizimá-las (Pegg *et al.*, 2019; Warman; Aitken, 2018) além de onerar economicamente e ambientalmente as ações de mitigação da doença, inviabilizando

a continuidade de pequenos produtores na atividade, com agravamento da pobreza (Ghag *et al.*, 2015; Ploetz, 2015; Dita *et al.*, 2018; Staver *et al.*, 2020).

O subgrupo Cavendish, é resistente à murcha de *Fusarium* causada pela raça 1. No entanto, é suscetível, assim como todos os triploides comerciais, à raça 4 tropical (Foc TR4) e subtropical (Foc ST4), que diferem na severidade dos sintomas e na existência de fator condicionante (baixas temperaturas e estresse hídrico) para o desenvolvimento da doença causada por Foc ST4 (Ploetz, 2006; Pegg *et al.*, 2019).

A variação somaclonal genética é fonte alternativa de variabilidade (Peredo *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2023) e pode ocorrer devido a condições pré-existentes ou relacionadas às especificidades da cultura de tecido *in vitro* (Bairu *et al.*, 2011). Consiste em um conjunto de alterações expressas fenotipicamente, causadas por estresse induzido (Maciejewski *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2020; Rebouças *et al.*, 2021) ou decorrente do processo de multiplicação *in vitro* (Oh *et al.*, 2007; Roux *et al.*, 2021). Resulta de alterações na sequência do DNA, genes ou cromossomos, é estável, herdável (Roux *et al.*, 2021) e diferencia geneticamente os somaclones derivados.

Neste sentido, os marcadores moleculares de DNA baseados em retrotransposons, constituem método de detecção de variação somaclonal promissor, devido a estreita relação entre estresse, biótico ou abiótico (Arvas *et al.*, 2022) e ativação de elementos transponíveis no DNA. Sua aplicabilidade relaciona-se com sua característica de deslocamento, “copia-e-cola”, ao longo do filamento de DNA, criando cópias de si mesmo, por mecanismo de transcrição, que serão inseridas em diferentes locos (Hakkinen *et al.*, 2007). Assim, suas novas inserções são rastros detectáveis por mecanismos de amplificação de alvos por reações em cadeia de polimerase, viabilizando estudos de variabilidade e diversidade genéticas em *Musa ssp.* (Teo *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2019; Saraswathi *et al.*, 2019).

Os estudos sobre variação somaclonal em bananeira, apesar de extensos, poucos relatam o sequenciamento de bandas polimórficas com o intuito de se avaliar a capacidade de agregar informações ao indivíduo polimórfico. Assim, este estudo objetivou a identificação e caracterização de variação somaclonal em plantas derivadas da cultivar Grande Naine (Cavendish - AAA), resistentes ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça 4 subtropical (Foc ST4), utilizando dois sistemas de marcadores moleculares baseados em retrotransposons (IRAP e REMAP).

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Foram avaliados doze somaclones derivados da cultivar Grande Naine (Cavendish - AAA, *Musa spp.*), resistentes ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* raça 4 subtropical (Foc ST4), pertencentes ao Banco de Germoplasma de Bananeira (BAG-Banana) da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Para identificação de variação somaclonal, a planta derivada da cultivar comercial Grande Naine, suscetível ao Foc ST4, foi adicionada à amostragem como planta controle, possibilitando a comparação entre os somaclones e entre estes e a cultivar de origem (Controle).

Os somaclones resistentes avaliados foram obtidos em estudo prévio, por indução de variação somaclonal, conforme metodologia usada por Rebouças *et al.* (2021) com subcultivo de ápices caulinares em meio MS enriquecido com os

fitorreguladores tidiazuron (TDZ) e paclobutrazol (PBZ). A seleção dos somaclones resistentes foi realizada por inoculação controlada em casa de vegetação com o isolado CNPMF218A, correspondente ao Foc ST4. Os 14 somaclones sobreviventes sem sintomas constituíram 14 tratamentos, que foram micropropagados, aclimatados e plantados em campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, para avaliações agrônomicas. Destes 14 tratamentos, quatro deles foram pré-selecionados para a avaliação neste trabalho.

Na ocasião deste estudo, os somaclones estavam estabelecidas em campo, em seu primeiro ciclo de produção, quando três clones de cada um dos quatro tratamentos avaliados (T1 - Embrapa 14, T2 - Embrapa 15, T3 - Embrapa 16 e T4 - Embrapa 17) foram selecionados aleatoriamente, compondo, juntamente com a planta controle, o conjunto amostral (Tabela 1).

Tabela 1. Lista dos somaclones avaliados, derivados da cultivar Grande Naine (*Musa* spp.; Cavendish – AAA), resistentes a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, raça 4 subtropical (Foc ST4) e grau de resistência*.

Tratamento	Centro de Origem	Grau de resistência*	
C	Controle (Grande Naine)	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	MR
1	Embrapa 14 - T1B2P2	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
2	Embrapa 14 - T1B2P3	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
3	Embrapa 14 - T1B2P6	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
4	Embrapa 15 - T2B1P1	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
5	Embrapa 15 - T2B1P5	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
6	Embrapa 15 - T2B1P7	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
7	Embrapa 16 - T3B2P4	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
8	Embrapa 16 - T3B2P6	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
9	Embrapa 16 - T3B2P8	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	AR
10	Embrapa 17 - T4B1P2	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	R
11	Embrapa 17 - T4B1P4	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	R
12	Embrapa 17 - T4B1P6	Embrapa Mandioca e Fruticultura - Brasil	R

AR: altamente resistente; R: resistente; MR: medianamente resistente (*Resultados não publicados)

2.2. Extração e quantificação do DNA genômico (gDNA)

Cortes frescos de folhas jovens foram coletados de cada planta avaliada para a extração e purificação do DNA seguindo o protocolo CTAB modificado por Ferreira *et al.* (2019). Porções de 300 mg de tecido foliar foram macerados com auxílio de furadeira de bancada adaptada, em presença de 3 mL de tampão de extração CTAB (2.4 %) contendo EDTA (20 mM), NaCl (1.7 M), Tris-HCl pH 8.0 (0.1 M), PVP (2 %) e β -mecaptoetanol (0.4%). As amostras de DNA foram padronizadas na concentração de 10 ng. μ L⁻¹.

2.3. Reação em cadeia de polimerase e caracterização molecular

Para a detecção de variação somaclonal, foram empregadas duas técnicas multilocus baseadas em reação em cadeia de polimerase (PCR). Para análise a partir da técnica PCR-IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) foram usados oito primers do tipo LTR (*long terminal repeat*) oriundos de Teo *et al.* (2005) e Baumel *et al.* (2002) (Tabela 2.) com origem em diferentes famílias.

Tabela 2. Detalhamento dos primers IRAP usados em somaclones derivados da cultivar Grande Naine, resistentes a Foc ST4, indicando orientação, origem, sequência e autores referência.

Primers	Família de Origem	Sequência (5'-3')	Referência
5'LTR2 ←	BARE 1	5'-ATC ATT GCC TCT AGG GCA TAA TTC-3'	Teo <i>et al.</i> (2005)
3'LTR →	BARE 1	5'-TGT TTC CCA TGC GAC GTT CCC CAA CA-3'	Teo <i>et al.</i> (2005)
Sukkula →	Sukkula	5'-GAT AGG GTC GCA TCT TGG GCG TGA C-3'	Teo <i>et al.</i> (2005)
Nikita →	Nikita	5'-CGC ATT TGT TCA AGC CTA AAC C-3'	Teo <i>et al.</i> (2005)
LTR6149 →	BARE 1	5'-CTC GCT CGC CCA CTA CAT CAA CCG CGT TTA TT-3'	Teo <i>et al.</i> (2005)
LTR6150 ←	BARE 1	5'-CTG GTT CGG CCC ATG TCT ATG TAT CCA CAC ATG TA-3'	Teo <i>et al.</i> (2005)
C0795	BARE 1	5'-TCC CAT GCG ACG TTC CCC-3'	Baumel <i>et al.</i> (2002)
C0945	Sabrina	5'-GCA AGC TTC CGT TTC CGC-3'	Baumel <i>et al.</i> (2002)

→: Forward; ←: Reverse.

Os primers usados na técnica PCR-REMAP (*retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*) foram obtidos a partir da combinação pareada entre um primer retrotransposon do tipo LTR e um dos seis primers microsatélites (SSR - *single simple repeat*) (Kalendar *et al.*, 1999) apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Lista detalhada de primers microsatélites (SSR) e retrotransposon LTR usados em somaclones derivados da cultivar Grande Naine, resistentes a Foc ST4, oriundos de Kalendar *et al.* (1999), informando sua orientação e sequência de nucleotídeos.

Primers	Sequência (5'-3')	Referencia
SSR		
8081→	(GA)9C	Kalendar <i>et al.</i> (1999)
8082→	(CT)9G	Kalendar <i>et al.</i> (1999)
8385→	(CAC)7G	Kalendar <i>et al.</i> (1999)
8386→	(GTG)7C	Kalendar <i>et al.</i> (1999)
8387→	(CA)10G	Kalendar <i>et al.</i> (1999)
8564→	(CAC)7T	Kalendar <i>et al.</i> (1999)
8565→	GT(CAC)7	Kalendar <i>et al.</i> (1999)
LTR		
LTR7286 (R)←	GGA ATT CAT AGG ATG GAT AAT AAA CGA TTA TC	Kalendar <i>et al.</i> (1999)

→ Forward; ← Reverse

As reações de amplificação PCR-IRAP e PCR-REMAP foram realizadas com volume final de 15 µL por amostra, contendo 4 µL de DNA molde (40 ng), 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1.5 µL de tampão PCR 10 x, 1.2 µL de dNTP (2.5 mM), 1.5 µL de cada primer (10 mM) pareado, 0.3 µL de Taq DNA polimerase comercial (5 U.µL⁻¹) e água livre de nuclease. O protocolo de amplificação consistiu na programação de uma etapa de desnaturação inicial na temperatura de 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento por 60 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos por ciclo; seguindo para extensão final com manutenção em 72 °C por 5 minutos e finalização da reação com redução da temperatura até 10 °C, para manutenção até a retirada das amostras do termociclador.

Após a amplificação, todos os produtos das reações PCR-IRAP e PCR-REMAP foram corados com 3 µL de solução tampão de corrida contendo Gel Red®.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TBE 5x, sob voltagem constante de 85 V por aproximadamente três horas e foram visualizados por fotografia obtida sobre luz U.V., com o uso do sistema de captura de imagens Loccus L-PIX EX 25x30. O comprimento das bandas amplificadas foi inferido por comparação ao ladder de referência Invitrogen Plus 1 Kb. Os perfis eletroforéticos gerados foram usados para comparação e identificação de polimorfismo em relação à planta controle e entre os somaclones.

2.4. Análise de dados moleculares e sequenciamento

Os géis de agarose com as combinações de primers utilizadas no estudo, não apresentaram número suficiente de bandas polimórficas para uso no cálculo de uma matriz de diversidade genética. No entanto, na presença de bandas polimórficas, essas foram selecionadas para sequenciamento *paired-end* (ACTGene < <https://actgene.com.br/>>).

O software Seqassem foi utilizado para alinhamento das sequências e as mesmas blastadas utilizando a ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com complementação da função biológica.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação dos somaclones com base no perfil eletroforético

Neste estudo foram avaliados quatro somaclones variantes (Embrapa 14, Embrapa 15, Embrapa 16 e Embrapa 17), resistentes ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raça 4 subtropical (Foc ST4), derivados da cultivar Grande Naine, visando investigar a ocorrência de variação somaclonal genética por ativação de elementos transponíveis, com o uso de marcadores baseados em retrotransposons IRAP e REMAP. Ambos os métodos geraram perfis eletroforéticos, com múltiplas bandas.

As combinações de primers que geraram perfis monomórficos foram LTR6149F+SukkulaF, LTR6150R+3'LTRF, LTR6150R+C0795, LTR6150R+C0945, 5'LTR2R+SukkulaF, 3'LTRF+3'LTRF, 3'LTRF+C0945, NikitaF+SukkulaF, NikitaF+C0795 e C0795+C0945 no sistema IRAP e LTR7286+8564 no sistema REMAP.

Nas demais reações (C0795+3'LTR, 5'LTR2+LTR6150, 5'LTR2+Nikita, LTR6149+Nikita, 5'LTR2+3'LTR, LTR6150+Nikita, 3'LTR+Nikita, LTR6150+Sukkula e C0945+Nikita), a maioria dos géis apresentaram bandas monomórficas, impossibilitando o cálculo de uma matriz de dissimilaridade genética (Figura 1: A, B, C e D).

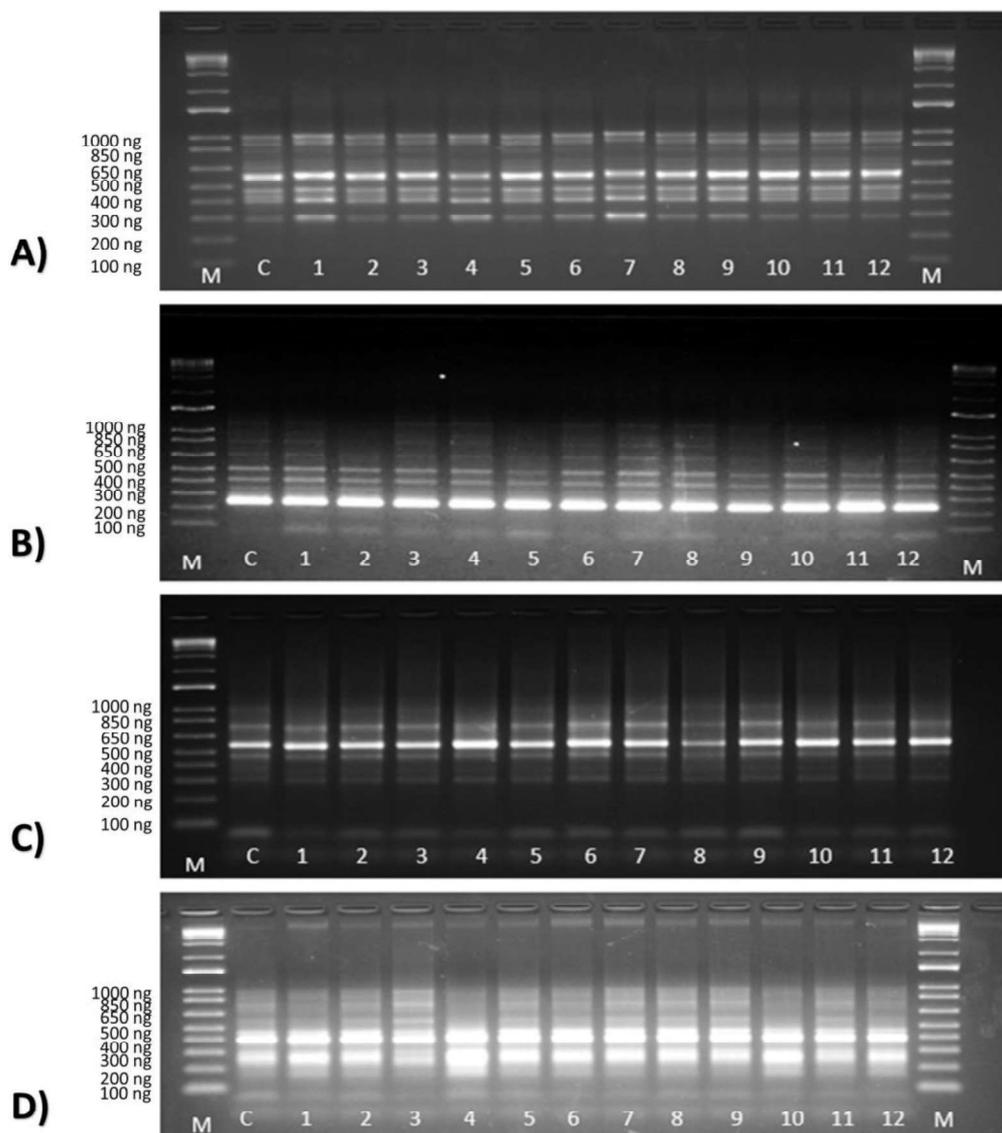


Figura 1 (A, B, C e D): Gel de agarose 2% com o perfil eletroforético monomórfico de 12 amostras de somaclones derivados da cultivar Grande Naine. C = controle (GN), 1-12: somaclones (Tabela 1). M = Marcador ladder (Invitrogen®). A-D: combinações de primers de marcadores IRAP e REMAP A) LTR7286 + 8081 (REMAP), B) 5'LTR + Sukkula (IRAP), C) LTR7286 + 8385 (REMAP) e D) LTR7286 + 8386 (REMAP).

No entanto, bandas polimórficas foram detectadas nas combinações de primers: LTR6149 (T1B2P6) + Nikita, 3' LTR (T1B2P2) + Nikita e Sukula + LTR6150 (Figura 2: A, B e C).

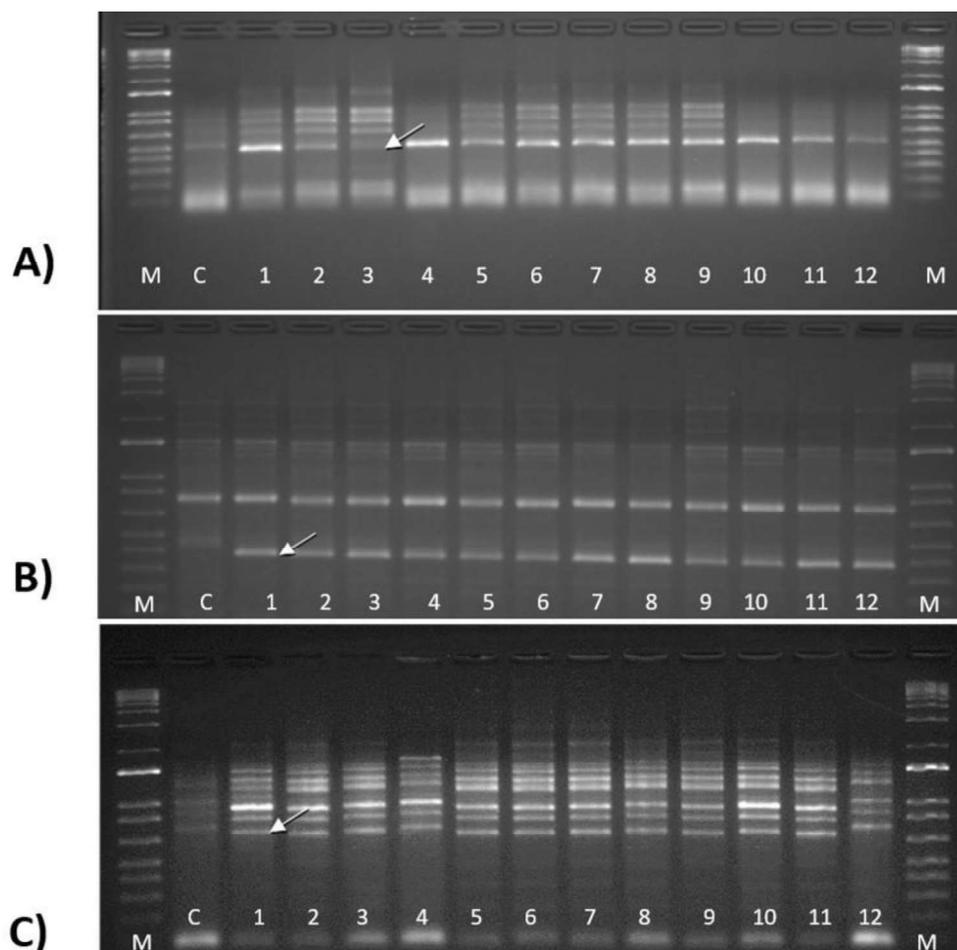


Figura 2 (A, B e C). Perfil eletroforético do controle GN e somaclones (1-12) em gel de agarose 2%. C = controle (GN), 1-12: somaclones (Tabela 1). M = Marcador ladder (Invitrogen®). A) Banda 1AF (seta), LTR6149 (T1B2P6) + Nikita (T1B2P6: 1-12), B) Banda 2AF (seta), 3' LTR (T1B2P2) + Nikita (T1B2P2: 1-11) e C) Banda 3AF (seta), Sukula + LTR6150 (T1B2P2: 1-11).

3.2. Análise das bandas polimórficas e sequenciamento

A partir da combinação pareada entre oito primers LTR (Tabela 2) foram realizadas 20 reações de amplificação pelo método PCR-IRAP, das quais, 9 geraram perfis eletroforéticos que foram analisados neste estudo. O primer Nikita integrou 5 das 9 reações que apresentaram polimorfismo e os primers 3'LTR, 5'LTR e LTR6150 integraram 3 reações. A temperatura ótima de anelamento dos primers IRAP variou de 45 °C (C0795+3'LTR) a 48.4 °C (5'LTR2+3'LTR), com média de 46.7 °C.

As bandas polimórficas apresentadas na Figura 2, foram sequenciadas (*paired-end*) e alinhadas. O resultado do alinhamento, BLAST, tradução e função, encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Informação das bandas polimórficas sequenciadas em função dos primers, alinhamento das sequências no software Seqassem, tamanho aproximado das bandas e tradução e função a partir do algoritmo BLAST.

Nome	Seqassem	pb	BLAST: ID	Função
1AF Primer forward: LTR6149 (T1B2P6) 1AR Primer reverse: Nikita	>CTGCAAAACAGCACCTCCCTCTCGATCGCCTTCTCCAGCCACGCCTCGCGTCCGGCCCA TCATCTCCGGGCTAGCCTACCATCAGCACGCAAGAACTCCTTCTCGTCGAGCGCCCC GTCCCGTCCATGTCCCTTCCCTCACCATCGCCGCCATCTCCGCCGTCATATCCCC GCCATCCCGAGCGCCGCTTCCCTCAGGCTCTCCGGGTTATGACCCCTCC CCGGCTCCGCGACAAACCGGAAGCCCGCCGACAGCTCCGACACGAACTGCTCCGCTT CCAGCCTCTCGGCCATACCGCACCAAGTCTCTCGACTCCCTCCGACTCCGTCGCAGC TGGGTGCTTCTCTCCCTCCATCGCCAGACCTTCCAAGTCTCTGTTGATGCTGCARARAT GGTTAGGGCTTG	Aproximadamente 400 pb	Musa acuminata subsp. malaccensis isolate AA chromosome 15 Sequence ID: XM_065104944	calcium-binding protein K1C-like
2AF Primer forward: 3' LTR (T1B2P2) 2AR Primer reverse: Nikita	>GGTGTAACTATTACTATATAGTAAATAGGGCTCTCGAACACACTTGAGGAATCACTC ACTCCTACTTAGCTACTATCTGAACCTACTCTACAGTTGCTACAAGAACCCGGAGCAG TCAAACTAGGGACAAGAAACAAGAAAGGACTACTATCTTTGCCAACCCCTTAATACAG GACTTGTAACTCTGGAACCTCTCTCCACTACTTGGGAAAGCCAAATATTAGATGAG ATGAGCCTCATTCGGCAAGTAAAGATGAAGTTAGGGTATCTAGAAATTAGCAGTGCCTCC GGGCATCTAGAATTAGCAGTGTAGTTAAAGTAAGG	Aproximadamente 300 pb	Musa acuminata subsp. malaccensis strain Doubled- haploi.:Score:544 Evalue:8.3e- 150Accession:HG99 6478.1	-
3AF Primer forward: Sukkula (T1B2P2) 3AR Primer reverse: LTR6150	>ACCAGTAGCAGCCCATTCAGACCCAGATTTCTTGGCCGGGGTGGCATTGCCCCAGGA GCTCAGAAAAGCTAGGCAGTGCATAGCCCGGTACGGGGTGTACCACCTGGGCT TAGTCTCCGAGCAAGACTGGGCACTGGTACCACCTTGGGCTAAATCTCTGAGCGAGACT GGGCAGTGGTACCCCTATCAGGCAGTGGTACTGCCTGAGCTCGGTCTCCGAGAG GTAGTACTGCCAGTTATTTGGTAGTACCCGAGCCCTCGGAAATCTAGGAGATGAC ACATTTGAGCTCCAAATTCAAATCAGTTGGGGCTATATGTAATAATCCCTCACTTTTAA AATTTAATAAGGATTTATATGTAATAATGGAGACCTATATGTAATAATAGAAAATTTAA GGATTAACCTGTTAAGTTGCAAAAAGAAAAAATAAAGAAAACCCGAAAGGGGAAAA GAAGAAAAGAAAGAGGGGAGAGAAAAGAAAAGAAAGAAAGAAAGAGAGGGGAAGAG GGAGCGGATGAGAAAAGATAGCTGCAGTAGATAGGGTGCAGCGCCTCTGTTTCGTGT AGGAGAAAACARAGGAGTACATGTGTGGATACATASACATGGGCSGAACASACAAA	Aproximadamente 600 pb	Musa acuminata subsp. malaccensis isolate AA chromosome 14 GenBank: CP126383.1	-

4. DISCUSSÃO

O melhoramento genético clássico em *Musa* spp. tem por fundamento o desenvolvimento de cultivares híbridos que agregam genes que conferem palatabilidade aos frutos, redução no porte, incremento na produtividade e resistência a doenças (Shepherd *et al.*, 1987; Amorim *et al.*, 2011). No entanto, a transferência das características desejadas a partir da reprodução sexuada entre diploides e triploides é um desafio imposto pela ausência de sementes viáveis em triploides comerciais. Neste contexto, a indução de variação somaclonal na cultura de tecidos constitui importante fonte de variabilidade para programas de melhoramento genético em bananeiras (Rebouças *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2023) visando obtenção de resistência a estresses abióticos e bióticos de forma permanente e herdável.

4.1. Avaliação dos somaclones com base no perfil eletroforetico

Neste estudo foram avaliados somaclones variantes previamente considerados resistentes ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raça 4 subtropical (Foc ST4), derivados da cultivar Grande Naine. Assim, a partir de 15 combinações de primers que detectam retrotransposons em *Musa* spp., dos quais 9 IRAP (Teo *et al.*, 2005; Saraswathi *et al.*, 2011; Shelke; Das, 2015;) e 6 REMAP (Kalendar *et al.*, 1999), foram gerados e analisados perfis eletroforéticos.

A partir de LTR do tipo Copya das famílias BARE-1, Sabrina, Nikita e Sukkula, 11 combinações de primers nos sistemas IRAP e uma combinação no sistema REMAP geraram perfis monomórficos. Dentre as demais reações, a maioria das combinações de primers utilizadas geraram bandas monomórficas, em princípio, não possibilitando um aprofundamento do estudo de dissimilaridade genética entre os somaclones analisados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Saraswathi *et al.* (2011) no grupo Cavendish (AAA) – grupo composto por plantas mutantes, reportando 122 bandas amplificadas, com percentual médio de polimorfismo de 81.3% e média de 12.2 bandas amplificadas por primers. No entanto, o coeficiente de similaridade foi de 98% revelando quase nenhuma variação genética entre clones variantes da cultura de tecidos (Grande Naine).

A variação somaclonal genética, por vezes pode envolver alterações de bases decorrentes de variação em um único nucleotídeo, por exemplo. Ao avaliarem somaclones derivados de sete cultivares do subgrupo Cavendish (Hsien Jen Chiao, Grande Naine, Umalag, Williams, Giant Cavendish, Valery e Tai-Chiao N°2 - TC2), todos resistentes a Foc raça 4 tropical, Hou *et al.* (2022) identificaram polimorfismo por sequenciamento de RNA confirmando a ocorrência de variação de nucleotídeo único, bem como deleções em cromossomos e quimerismo. A variação de único nucleotídeo não pode ser detectada por uso de marcadores baseados em retrotransposons.

No entanto, nos nossos resultados ainda foi possível identificar uma banda polimórfica relacionada à resistência a estresse biótico; resultado que impacta o uso da metodologia de seleção assistida por marcadores. Nosso trabalho demonstra que os marcadores IRAP e REMAP são ferramentas interessantes na identificação de polimorfismo de interesse quando se trata de variantes somaclonais.

4.2. Análise das bandas polimórficas e sequenciamento

Uma relevante consequência da ampla distribuição e adaptação das bananeiras a variados ambientes é a diversidade de interações entre os genótipos de bananeiras de frutos comestíveis e patógenos locais, com o agravante da reduzida diversidade de genes relacionados à resistência a doenças, característica genômica do gênero *Musa* e *Ensete* (Rijzaani *et al.*, 2021). Embora um sistema imunológico vegetal não exista de fato, as plantas apresentam a capacidade inata de reconhecimento de agentes estressantes externos e de inicialização estratégica de respostas de defesa, em intensidades que conferem resistência ou suscetibilidade às plantas hospedeiras, como ocorre na interação das bananeiras com o *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça 4 subtropical (Mena *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, apesar da elevada taxa de similaridade entre os somaclones e entre esses e a planta controle, foi possível identificar, segmentos polimórficos potencialmente relacionados à rota de defesa. As bandas selecionadas (Figura 2: A, B e C) blastadas nos bancos de dados são todas do gênero *Musa*, no entanto, apenas uma delas, a banda 1AF, apresentou resultado interessante quanto a resistência a doenças, pois sinaliza a presença de proteínas ligadas ao cálcio - *calcium binding proteins*, mais precisamente calcium binding proteins semelhante a KIC.

A calmodulina (CaM) é uma proteína de ligação ao cálcio relacionada à motilidade e agrupamento de microtúbulos (Kao *et al.*, 2000) e as cinesinas são motores moleculares envolvidos em diversos processos celulares. As KCBPs são proteínas de ligação à calmodulina, do tipo cinesina. Neste contexto, as proteínas KIC apresentam sequência semelhante à CaM e competem com estas pela ligação à KCBP (Reddy *et al.*, 2004).

O estudo conduzido por Reddy *et al.* (2004) descreve a proteína KIC detalhando sua constituição e função. As proteínas KIC apresentam um único motivo EF-hand de ligação e competem com as proteínas calmodulina (CaM) pelo sítio de ligação em proteínas ligadas à calmodulina, do tipo cinesina (KCBPs). Assim como as CaM, a KIC inibe a interação das KCBPs com microtúbulos em função da concentração de Ca^{+2} , interferindo na morfogênese de tricomas. KIC difere das proteínas CaM, também por demandar baixa concentração de Ca^{+2} para a inativação de KCBPs. Os autores ressaltam ainda que a inibição desencadeada em baixa concentração de Ca^{+2} livre na célula pode ser interpretada como inativação precoce de KCBP à sinalização de incremento inicial na concentração de Ca^{+2} liberado na formação dos tricomas. Finalizando, os resultados também demonstraram que a inativação não impede a morfogênese dos tricomas mas resulta em tricomas reduzidos.

Na busca por uma correlação entre microtúbulos e desenvolvimento de fungos, Konzack *et al.* (2005) caracterizaram uma proteína da superfamília da cinesina (*kipA*) quanto a sua composição e função em *Aspergillus nidulans*. A partir de seus resultados, observaram que a proteína motora de cinesina por eles isolada (*kipA*) é responsável pelo crescimento e orientação direcional de microtúbulos em *A. nidulans*, concluindo que a correta orientação desse crescimento depende da integridade motora da proteína. Assim, extrapolando o resultado em *A. nidulans* concluíram que o crescimento polarizado em fungos filamentosos depende da integridade do citoesqueleto de microtúbulos.

Os íons Ca^{+2} são importantes mensageiros secundários relacionados a inúmeras vias metabólicas nas plantas e são altamente suscetíveis à estresses

bióticos e abióticos, os quais alteram rapidamente sua concentração nas células (Lecourieux *et al.*, 2006). São as proteínas de ligação ao cálcio - *calcium-binding protein*, as responsáveis pela interceptação, decodificação e amplificação do significado dessas variações na concentração de cálcio, viabilizando as respostas de defesa necessárias e por véses, específicas (Lecourieux *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2019). O incremento na concentração de Ca^{+2} é a primeira consequência da interação entre os receptores e os padrões moleculares (Ribeiro *et al.*, 2022), ativando as proteínas ligadas ao cálcio.

A habilidade das plantas em reconhecer agentes estressantes decorre da interação entre seus receptores de reconhecimento de padrões (RRP) e os padrões moleculares associados a micróbios ou patógenos (M/PAMP). Quando esta relação é estabelecida, são iniciadas as estratégias de defesa, ou seja, a imunidade desencadeada por PAMPs (Postel; Kemmerling, 2009).

Visando identificar genes resistentes e suscetíveis à *Phytophthora nicotianae* em cultivares de tabaco, Beihart1000-1 (BH) e Xiaohuangjin 1025 (XHJ), Meng *et al.*, (2021) realizaram sequenciamento de RNA, detectando 23.753 e 25.187 genes diferencialmente expressos. Em seus resultados além de proteínas de resistência e relacionadas à doenças, foram identificadas 4 proteínas ligantes de cálcio.

Estudos conduzidos por Lu *et al.*, (2019), visaram avaliar o papel do gene TaCML36 na resposta imune do trigo a *Rhizoctonia cerealis*, fungo causador da mancha ocular aguda. Após inoculação das plantas, os autores detectaram elevada expressão do gene com consequente transcrição de uma proteína de ligação de cálcio semelhante à calmodulina, cujo papel principal é a regulação gênica. O conjunto dos resultados orientam para a forte e positiva atuação da proteína na resposta de imunidade inata por modulação da expressão de genes de defesa com possível impacto na rota do etileno.

Li *et al.*, (2019), detectaram que a infecção de trigo por *Fusarium graminearum* induz nas plantas resistentes à queima da espiga, a expressão de His^R, uma proteína de ligação ao cálcio rica em histidina, porém com mutação representada por deleção de 752 pb na extremidade 5'. Os resultados da pesquisa demonstram que esta proteína, detectada em cada cromossomo dos tres genomas (A, B, C) do trigo, codifica 260 aminoácidos e a intensidade da sua expressão está positivamente correlacionada à resistência das plantas. His^R marcados foram direcionados exclusivamente ao núcleo e por sua similaridade de sequência com sinalizadores de Ca^{+2} , sugere-se sua atuação como regulador da imunidade.

O primeiro estudo de genes diferencialmente expressos relacionados à fusariose do tomateiro em condições de campo foi realizado por Ribeiro *et al.*, (2022). Neste estudo, os autores observaram correlação positiva entre a intensidade da infecção e a expressão de fator de transcrição - WRKY41, e de genes ligantes ao cálcio – CBEF, ambos envolvidos na resistência inata ao *Fusarium oxysporum* e *F. incarnatum-equiseti*.

As proteínas ligadas ao cálcio também têm estreita relação com as respostas de defesa ao estresse abiótico, como estresse hídrico (Gong *et al.*, 2022), estresse químico por aplicação de pesticidas (An *et al.*, 2019) e estresse salino (Bao *et al.*, 2021). A relação entre estas proteínas e estresses abióticos foram bem elencadas em Zeng *et al.*, (2015).

Em nosso trabalho, os marcadores IRAP e REMAP foram importantes na detecção de polimorfismo possibilitando a identificação de gene com atuação em resposta de defesa das plantas. A banda identificada poderá ser usada na seleção

assistida no melhoramento de bananeiras em fase de muda mediante novos desenhos de primers e validação a campo.

5. CONCLUSÃO

O avanço biotecnológico é crucial no melhoramento genético de plantas tendo em vista a necessidade de rápida adaptação de cultivares e variedades comerciais frente aos estresses bióticos e abióticos. A possibilidade do uso de marcadores IRAP e REMAP em um programa de melhoramento cujas atividades são contínuas na busca do desenvolvimento de variedades mais resistentes/tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos é de suma importância por permitir o uso de seleção assistida para acelerar os resultados. No caso de *Musa* spp., dada a partenocarpia inerente à espécie juntamente com a estreita base genética, o uso dessas ferramentas se torna ainda mais importante.

Os resultados apresentados mostram que a biotecnologia aliada às ferramentas de bioinformática possibilitam melhor delineamento das estratégias de melhoramento da cultura dentro de um cenário que visa agregar informações para contribuir para uma cadeia produtiva e um agronegócio mais sustentável e promissor.

6. REFERÊNCIAS

AMORIM, E.P.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S. O.; PILLAY, M. Quality improvement of cultivated *Musa*. In: MICHAEL PILLAY; A.T. (Org.). **Banana Breeding: Progress and Challenges**. New York: CRC Press, 2011, p. 252-280.

AN, M.; ZHOU, T.; GUO, Y.; ZHAO, X.; WU, Y. Molecular Regulation of Host Defense Responses Mediated by Biological Anti-TMV Agent Ningnanmycin. *Viruses* 2019, 11, 815, 2019. DOI: 10.3390/v11090815. Disponível em <https://doi.org/10.3390/v11090815>

ARVAS, Y.E.; KOCAÇALIŞKAN, İ.; ORDU, E.; ERIŞEN, S. Comparative retrotransposon analysis of mutant and non-mutant rice varieties grown at different salt concentrations. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 36, n. 1, p. 25-33. 2022. DOI 10.1080/13102818.2022.2043777. Disponível em <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2043777>.

BAIRU, M.W.; AREMU, A.O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173. 2011. DOI 10.1007/s10725-010-9554-x. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>.

BAO, Y.; CHEN, C.; FU, L.; CHEN, Y. Comparative transcriptome analysis of *Rosa chinensis* 'Old Blush' provides insights into the crucial factors and signaling pathways in salt stress response. **Agronomy Journal**. v.113, p. 3031-3050. DOI: 10.1002/agj2.20715. Disponível em <https://doi.org/10.1002/agj2.20715>.

BAUMEL, A.; AINOUCHE, M.; KALENDAR, R.; SCHULMAN, A.H. Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae). **Molecular Biology Evolution**, v.19, n.8, p. 1218-

1227, 2002. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004182. Disponível em <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004182>.

CASTELAN, F. P.; SARAIVA, L. A.; LANGE, F.; DE LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; CORDENUNSI, B. R.; CHILLET, M. Effects of Black Leaf Streak Disease and Sigatoka Disease on fruit quality and maturation process of bananas produced in the subtropical conditions of southern Brazil. **Crop Protection**, v. 35, p. 127-131, 2012. DOI 10.1016/j.cropro.2011.08.002. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.08.002>.

DITA, M.A.; BARQUERO, M.; HECK, D.; MIZUBUTI, E.S.G.; STAVER, C.P. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers in Plant Sciences**, v.9, n.1468, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01468. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Roma: FAO, 2024. Disponível Em <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em 30 abr 2022.

FERREIRA, C.F.; GUTIERREZ, D.L.; KREUZE, J.F.; ISKRA-CARUANA, M.L.; CHABANNES, M.; BARBOSA, A.C.O.; SANTOS, T.A.; SILVA, A.G.S.; SANTOS, R.M.F.; AMORIM, E.P.; OLIVEIRA, S.A.S. DE; JESUS, O.N. Rapid plant DNA and RNA extraction protocol using a bench drill. **Genetics and Molecular Research**. v.18, n.3, p.1-8, 2019. DOI: 10.4238/gmr18394. Disponível em <https://doi.org/10.4238/gmr18394>.

FERREIRA, M.D.S.; ROCHA, A.D.J.; NASCIMENTO, F.D.S.; OLIVEIRA, W.D.D.S.; SOARES, J.M.D.S.; REBOUÇAS, T.A.; MORAIS LINO, L.S.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; SANTOS-SEREJO, J.A.D.; FERNÁNDEZ, J.S.; AMORIM, E.P. The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p.730. 2023. DOI: 10.3390/agronomy13030730. Disponível em <https://doi.org/10.3390/agronomy13030730>.

FU, N.; JI, M.; ROUARD, M.; YAN, H-F.; GE, X-J. Comparative plastome analysis of Musaceae and new insights into phylogenetic relationships. **BMC Genomics**, v.23, p. 223. 2022. DOI: 10.1186/s12864-022-08454-3. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08454-3>.

GHAG, S.B.; SHEKHAWAT, U.K.S.; GANAPATHI, T.R. Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. **International Journal of Pest Management**, v. 61, n. 3, p. 250-263. 2015. DOI: 10.1080/09670874.2015.1043972. Disponível em <https://doi.org/10.1080/09670874.2015.1043972>.

GONG, X.; XU, Y.; LI, H.; CHEN, X.; SONG, Z. Antioxidant activation, cell wall reinforcement, and reactive oxygen species regulation promote resistance to waterlogging stress in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). **BMC Plant Biology**, v.22, n.425. 2022. DOI: 10.1186/s12870-022-03807-2. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03807-2>.

HOU, B. H.; TSAI, Y. H.; CHIANG, M. H.; TSAO, S. M.; HUANG, S. H.; CHAO, C. P.; CHEN, H. M. Cultivar-specific markers, mutations, and chimerism of Cavendish banana somaclonal variants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. **BMC Genomics**, v.23, n.1, p. 470. 2022. DOI: 10.1186/s12864-022-08692-5. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08692-5>

KALENDAR, R.; GROB, T.; REGINA, M.; SUONIEMI, A.; SCHULMAN, A. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 5, p. 704-711, 1999. DOI 10.1007/s001220051124. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s001220051124>.

KAO, Y.-L., DEAVOURS, B.E., PHELPS, K.K., WALKER, R., AND REDDY, A.S.N. Bundling of microtubules by motor and tail domains of a kinesin-like calmodulin-binding protein from *Arabidopsis*: Regulation by Ca²⁺/calmodulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.267, p. 201-207. 2000. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1896. Disponível em <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1896>.

KONZACK, S., RISCHITOR, P. E., ENKE, C., & FISCHER, R. The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. **Molecular biology of the cell**, v.16, n.2, p. 497-506. 2005. DOI:10.1091/mbc.e04-02-0083. Disponível em <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0083>

LECOURIEUX, D.; RANJEVA, R.; PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling pathways. **New Phytologist**, v.171, p. 249-269. 2006. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01777.x. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01777.x>.

LI, S.; RAMAKRISHNAN, M.; VINOD, K.K.; KALENDAR, R.; YRJÄLÄ, K.; ZHOU, M. Development and Deployment of High-Throughput Retrotransposon-Based Markers Reveal Genetic Diversity and Population Structure of Asian Bamboo. **Forests**, p.11, v.1, p. 31. 2019. DOI 10.3390/f11010031. Disponível em <https://www.mdpi.com/1999-4907/11/1/31>.

LU, L.; RONG, W.; ZHOU, R.; HUO, N.; ZHANG, Z. TaCML36, a wheat calmodulin-like protein, positively participates in an immune response to *Rhizoctonia cerealis*. **The Crop Journal**, v.7, n.5, p. 608-618. 2019. DOI: 10.1016/j.cj.2019.02.001. Disponível em <https://doi.org.ez278.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.cj.2019.02.001>.

MACIEJEWSKI, P.; RAMM, A.; MOREIRA, R.M.; OLIVEIRA, B.A.S.; MATTOS, M.G.; ASSIS, A.M.; SCHUCH, M.W. Subcultivos *in vitro* de cultivares de mirtilheiro *In vitro* subcultures of blueberry cultivars. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.7, p. 46380-46389. 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n7-315. Disponível em <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-315>.

MENA, R.A.S.; STOOORVOGEL, J.J.; GARCÍA-BASTIDAS, F.; SALACINAS-NIEZ, M.; KEMA, G. H.J.; SANDOVAL, J. A. Evaluating the potential of soil management to reduce the effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana (*Musa AAA*).

European Journal of Plant Pathology, v. 160, n. 2. 2014. DOI: 10.1007/s10658-021-02255-2. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02255-2>.

OCIMATI, W.; BOUWMEESTER, H.; GROOT, J.C.J.; TITTONELL, P.; BROWN, D.; BLOMME, G. The risk posed by *Xanthomonas* wilt disease of banana: Mapping of disease hotspots, fronts and vulnerable landscapes. **PloS one**, v.14, n.4, e0213691. 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0213691. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213691>

OH, T. J.; CULLISA, M.A.; KUNERT, K.; ENGELBORGH, I.; SWENNEN, R.; CULLISA, C.A. Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). **Physiologia Plantarum**, v.129, p. 766-774. 2007. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00858.x. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00858.x>.

PEGG, K.G.; COATES, L.M.; O'NEILL, W.T.; TURNER, D.W. The Epidemiology of Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. 1395, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.01395. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01395>.

PEREDO, E.L.; ARROYO-GARCÍA, R.; REVILLA, M.Á. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. **Journal of Plant Physiology**, v.166, n.10, p. 1101-1111. 2009. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.12.015. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.12.015>.

PLOETZ, R.C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015. DOI: 10.1016/j.cropro.2015.01.007. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.007>.

PLOETZ, R.C. Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v.96, n.6, p. 653-256. 2006. DOI: 10.1094/PHYTO-96-0653. Disponível em <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0653>.

REDDY, V.S.; DAY, I.S.; THOMAS, T.; REDDY, A.S.N. KIC, a Novel Ca²⁺ Binding Protein with One EF-Hand Motif, Interacts with a Microtubule Motor Protein and Regulates Trichome Morphogenesis, **The Plant Cell**, v.16, n.1, p. 185-200. 2004. DOI: 10.1105/tpc.016600. Disponível em <https://doi.org/10.1105/tpc.016600>

REBOUÇAS, T.A.; ROCHA, A.J.; CERQUEIRA, T.S.; ADORNO, P.R.; BARRETO, R.Q.; FERREIRA, M.S.; MORAIS LINO, L.S.; AMORIM, V.B.O.; SANTOS-SEREJO, J.A.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P. Pre-selection of banana somaclones resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, subtropical race 4. **Crop Protection**, v. 147, n. 5, p. 105692. 2021. DOI 10.1016/j.cropro.2021.105692. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105692>.

RIBEIRO, J.A.; ALBUQUERQUE, A.; MATERATSKI, P.; PATANITA, M.; VARANDA, C.M.R.; FÉLIX, M.D.R.; CAMPOS, M.D. Tomato Response to *Fusarium* spp. Infection under Field Conditions: Study of Potential Genes Involved. **Horticulturae**, v.8, n.5, 433. 2022. DOI: 10.3390/horticulturae8050433. Disponível em <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050433>.

RIJZAANI, H; BAYER, P. E.; ROUARD, M.; DOLEŽEL, J.; BATLEY, J.; EDWARDS, D. The pangenome of banana highlights differences between genera and genomes. **The Plant Genome**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1002/tpg2.20100. Disponível em <https://doi.org/10.1002/tpg2.20100>.

ROUX, N.; CHASE, R.; VAN DEN HOUWE, I.; CHAO, C.; PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P.; SARDOS, J.; ROUARD, Somaclonal variation in clonal crops: containing the bad, exploring the good. In: SIVASANKAR, S. (eds.) **Mutation breeding, genetic diversity and crop adaptation to climate change**. Oxfordshire (UK): CABI. p. 355-365. 2021. Disponível em <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/116597>. Acessado em 26 out. 2023.

SANTOS, T.T.C; AMORIM, V.B.O; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA LEDO, C.A.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P. Genetic variability among autotetraploid populations of banana plants derived from wild diploids through chromosome doubling using SSR and molecular markers based on retrotransposons. **Molecular Breeding**, v.39, p. 95, 2019. DOI 10.1007/s11032-019-0996-1. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0996-1>.

SARASWATHI, M. S.; UMA, S.; PRASANYA SELVAM, K.; RAMARAJ, S.; DURAI, P.; MUSTAFFA, M. M. Assessing the robustness of IRAP and RAPD marker systems to study intra-group diversity among Cavendish (AAA) clones of banana. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.86, n.1, p. 7-12. 2011. <https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512717>.

SHELKE, R.G.; DAS, A.B. Analysis of Genetic Diversity in 21 Genotypes of Indian Banana Using RAPDs and IRAPs Markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v.85, n.4, p. 1 027-1038. 2015. DOI: 10.1007/s40011-015-0505-1. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0505-1>.

SHEPHERD, K. Banana Breeding - Past and Present. **Acta Horticulture**, v.196, p. 37-44. 1987. DOI: 10.17660/ActaHortic.1987.196.3v. Disponível em <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.196.3v>.

SIMBARE, A.; SANE, C.A.B.; NDUWIMANA, I.; NIYONGERE, C.; OMONDI, B.A. Diminishing Farm Diversity of East African Highland Bananas in Banana Bunchy Top Disease Outbreak Areas of Burundi: The Effect of Both Disease and Control Approaches. **Sustainability**, v. 12, n. 18, p. 7467, 2020. DOI: 10.3390/su12187467. Disponível <https://doi.org/10.3390/su12187467>.

TEO, C.H.; TAN, S.H.; HO, C.L.; FARIDAH, Q.Z.; OTHMAN, Y.R.; HESLOP-HARRISON, J.S.; KALENDAR, R.N.; SCHULMAN, A.H. Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana. **Journal of Plant Biology**, v. 48, n. 1, p. 96-105, 2005. DOI 10.1007/BF03030568. Disponível em <https://doi.org/10.1007/BF03030568>.

WARMAN, N.M.; AITKEN, E.A.B. The Movement of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. **Frontiers in**

Plant Sciences. v.9, n. 1748. 2019. DOI: 10.3389/fpls.2018.01748. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01748>.

ZENG, H.; XU, L.; SINGH, A.; WANG, H.; DU, L.; POOVAIAH, B.W.
Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p. 600. 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00600. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00600>.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE DE DIPLOIDES MELHORADOS E TRIPLOIDES COMERCIAIS DE *Musa* spp., VIA MARCADORES MOLECULARES²

² Capítulo formatado para submissão ao periódico Plants

DIVERSIDADE DE DIPLOIDES MELHORADOS E TRIPLOIDES COMERCIAIS DE *Musa spp.*, VIA MARCADORES MOLECULARES

Juliana Rodrigues Sampaio, Claudia Fortes Ferreira

RESUMO: O melhoramento da bananeira consiste na obtenção de tipos híbridos intra e interespecíficos diploides, triploides e tetraploides por método convencional, com o objetivo de agregar genes de interesse agrônômico e comercial. O melhoramento genético da Embrapa visa o cruzamento entre diploides para aumentar a base genética e variabilidade quanto às características de interesse, e o cruzamento entre diploides melhorados e triploides e tetraploides comerciais para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes aos principais fatores bióticos e abióticos. O objetivo deste trabalho consistiu em estimar a diversidade genética entre 22 diploides melhorados e sete triploides comerciais de bananeira via marcadores moleculares de DNA. Para análise da diversidade genética foram realizadas 5 reações IRAP, 7 reações ISSR e 12 reações SSR. Os dados genéticos gerados foram analisados de forma conjunta gerando matriz de dissimilaridade genética com base no índice de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA. O estudo da diversidade entre diploides melhorados e triploides comerciais, com base na matriz de dissimilaridade genética, revelou que os diploides mais dissimilares são DM23 e DM15 (74%), DM16 e DM15 (74%). As menores distâncias genéticas entre diploides melhorados e triploides comerciais ocorrem entre TCGN25 e DM17 (50%), TCN26 e DM17 (50%). A matriz também revelou cruzamentos importantes para se manter as características boas nos triploides comerciais. Os marcadores de DNA utilizados possibilitaram identificar possíveis parentais a serem usados nos cruzamentos dentro do PMGB e melhor direcionar as estratégias de desenvolvimento de variedades de bananeira mais resistentes e tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos.

Palavras-chave: genotipagem; germoplasma; variabilidade; banana; plátanos.

ABSTRACT: Banana breeding consists of obtaining diploid, triploid and tetraploid intra- and interspecific hybrid types by conventional method, with the objective of aggregating genes of agronomic and commercial interest. Embrapa's banana genetic breeding aims at the crossing between diploids to increase the genetic base and variability regarding the traits of interest, and the crossing between improved diploids and commercial triploids and tetraploids for the development of cultivars more resistant to the main biotic and abiotic factors. The objective of this work was to estimate the genetic diversity between 22 improved diploids and seven commercial triploids of banana using DNA molecular markers. For the analysis of genetic diversity, 5 IRAP and 7 ISSR and 12 SSR markers, were used. The genetic dissimilarity matrix was based on the Jaccard index and clustered via Jaccard index. The study of the diversity between enhanced diploids and commercial triploids, based on the genetic dissimilarity matrix, revealed that the most dissimilar diploids are DM23 and DM15 (74%), DM16 and DM15 (74%). The smallest genetic distances between enhanced diploids and commercial triploids occur between TCGN25 and DM17 (50%), TCN26 and DM17 (50%). The matrix also revealed important crosses to maintain the good characteristics in the commercial triploids. The DNA markers used made it possible to identify possible parents to be used in crosses within the

PMGB and to better direct the development strategies of more resistant and tolerant banana varieties to the main biotic and abiotic factors.

Key-words: genotyping; germoplasm; variability; bananas, Plantains.

1. Introdução

O melhoramento da bananeira consiste na obtenção de tipos híbridos intra e inter-específicos diploides ($2n = 22$), triploides ($2n = 33$) e tetraploides ($2n = 44$) por método convencional, com o objetivo de agregar genes que conferem palatabilidade ao consumidor, menor estatura, resistência às doenças e maior produtividade nas plantas [1-4]. As possíveis vias de melhoramento por cruzamentos em *Musa* spp., visam a obtenção de triploides e tetraploides, principalmente com envolvimento de diploides melhorados [2, 5]. Neste sentido, os cruzamentos direcionados demandam a disponibilidade de banco de germoplasma geneticamente diverso e estruturado. Acessos bem caracterizados quanto aos critérios morfoagronômicos e moleculares, possibilitam a seleção racional de progenitores e a gestão estratégica de coleções com monitoramento do fluxo gênico, gestão da variabilidade entre clones e manutenção da diversidade e de alelos raros, passíveis de uso em engenharia genética [6-8].

As bananeiras (*Musa* spp.) resultantes de hibridações naturais intra ou interespecíficas, mutações ou de programas de melhoramento, têm sua origem nas espécies silvestres diploides *Musa acuminata* Colla (AA) e *M. balbisiana* Colla (BB) e podem ser classificadas de acordo com seu grupo genômico e nível de ploidia em diploides (AA, AB), triploides (AAA, AAB, ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB) [9, 10]. Por propagação sexuada os triploides podem ser obtidos por cruzamentos entre diploides e tetraploides, enquanto os tetraploides são obtidos por cruzamentos entre triploides e diploides. Também são classificadas em subgrupos, de acordo com quinze descritores para suas características morfoagronômicas [11]. No entanto, as bananeiras do subgrupo 'Cavendish' (AAA) e 'Terra' (AAB), dominam os cultivos e acabam estreitando a base genética dessa importante atividade econômica mundial, aumentando o risco de ataques por pragas e a ocorrência de doenças [12].

No Brasil, os principais tipos e variedades cultivadas são o diploide 'Ouro' (cultivar Ouro – AA) e os triploides 'Nanica', 'Nanicão', 'Grande Naine' (subgrupo Cavendish – AAA), 'Prata', 'Pacovan', 'Prata Anã' (subgrupo Prata – AAB), 'Maçã' (tipo Maçã – AAB), 'Terra' e 'Dangola' (subgrupo Terra – AAB) [3, 13]. Embora estas cultivares estejam presentes no Brasil, as bananeiras do grupo AAB, caracteristicamente suscetíveis às doenças, destinam-se ao mercado interno, principalmente as cultivares Maçã, Prata, Prata Anã e Pacovan; priorizando-se o grupo genômico AAA, principalmente a cultivar 'Grande Naine', para a incipiente exportação brasileira, seguindo a tendência mundial [4, 14].

Variadas características das bananeiras de frutos comestíveis são decorrentes da contribuição dos genomas de *Musa acuminata* e *M. balbisiana*. As características derivadas do genoma A tem origem no complexo de subsespécies como *banksii*, *burmannica*, *malaccensis* e *zebrina*, as quais constituem a espécie *M. acuminata* [15]. A resistência a doenças, como Sigatoka amarela, Sigatoka negra e murcha de *Fusarium*, e resistência a pragas, como nematoides, compõem as principais contribuições do germoplasma AA aos programas de melhoramento [16]. A importância da contribuição do genoma B de *Musa balbisiana* advém da sua maior

tolerância ao estresse biótico e abiótico, maior vigor e ao enriquecimento do seu genoma com genes de expressão dominante relacionados à rota de biossíntese de etileno e de produção e degradação de amido, com forte influência no amadurecimento e qualidade pós-colheita dos frutos [17]. No entanto, *M. balbisiana* apresenta também sequências do vírus da estria da banana (BSV – *Banana Streak Virus*) integradas ao seu genoma [18]. Assim, com todo o conhecimento específico já acumulado sobre a constituição genômica das espécies silvestres, ainda é um desafio compreender a herdabilidade e a interação entre os genes envolvidos nas respostas de defesa em *Musa* spp, principalmente devido à complexidade genética e poliploidia do gênero.

Os marcadores genéticos desempenham importante função nos estudos de diversidade e variabilidade por possibilitarem uma infinidade de dados e não serem afetados pelo ambiente [19, 20]. Os genomas das plantas apresentam abundantes regiões do DNA com sequências repetitivas, como elementos transponíveis e microssatélites, que são conservados, frequentes, e por vezes, comuns a várias espécies, possibilitando seu uso como marcadores moleculares em métodos de detecção de polimorfismo. No gênero *Musa*, 41,85% e 55,75% dos genomas A e B, respectivamente, são constituídos por elementos repetitivos [21].

Neste estudo, foram usados marcadores IRAP, ISSR e SSR para analisar a diversidade genética em uma coleção de 29 genótipos de *Musa* spp. incluindo diploides melhorados (AA) e triploides comerciais (AAA, AAB). Objetivou-se estimar a distância genética entre os acessos para melhor direcionar as estratégias de desenvolvimento de variedades de bananeira mais resistentes e tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos dando continuidade ao Programa de Melhoramento Genético de Bananeiras da Embrapa Mandioca e Fruticultura (PMGB). Os marcadores de DNA utilizados possibilitaram identificar potenciais parentais para cruzamento entre os diploides melhorados com maior dissimilaridade genética visando obtenção de triploides, ampliando a variabilidade no Banco Ativo de Germoplasma de Banana. Também foram identificados os diploides melhorados e os triploides comerciais geneticamente próximos para indicação de uso como parentais nos cruzamentos visando obtenção de tetraploides dentro do PMGB

2. Resultados

2.1. Análise molecular do Polimorfismo genético por marcadores moleculares de DNA – SSR, ISSR e IRAP

Foram realizadas 5 reações com combinações de primers IRAP (3'LTR+C0795, 3'LTR+LTR6150, LTR6149+Nikita, 5'LTR 2+LTR6150, 5'LTR2+Nikita), 7 reações com marcadores ISSR (ISSR 92, 72, 95, 47, 29, 07, 57) e 12 reações com marcadores SSR (mMaCIR 01, 07, 28, 24, 40, 150, 45, 196, 231, 13, 39, 152). O perfil eletroforético representativo de cada tipo de marcador encontra-se na Figura 1.

Com os marcadores ISSR foram reproduzidas 95 bandas totais com 76 bandas polimórficas (80%). O tamanho das bandas amplificadas variou de 350 a 2,500 pb. As temperaturas de anelamento variaram de 45 °C a 50 °C, com temperatura média de 48.71 °C. O marcador ISSR 07 amplificou o maior número de bandas polimórficas (17 bandas) e ISSR 92, o menor número (2 bandas). O tamanho das bandas amplificadas variou de 350 a 2,500 pb.

Os marcadores IRAP geraram um total de 60 bandas, nas quais 57 foram polimórficas. A média de bandas por combinação de primers ficou em torno de 12 bandas, onde o maior e o menor número de bandas polimórficas foram amplificadas pela combinação de primers 5'LTR2 + Nikita e 5'LTR2 + LTR6150, 14 e 9 bandas, respectivamente. A temperatura de anelamento variou de 45 °C a 48 °C, com temperatura média de 45.8 °C. O tamanho das bandas variou de 2,500 pb, amplificadas por 3'LTR + LTR6150 e LTR6149 + Nikita, a 250 pb, amplificada pelos marcadores 3'LTR + LTR6150, LTR6149 + Nikita e 5'LTR + Nikita.

Os marcadores SSR amplificaram 105 bandas totais. O tamanho das bandas variou de 100 a 400 pb. A temperatura de anelamento variou de 52 °C a 59 °C, com temperatura média de 55 °C. O maior número de bandas foi amplificado pelo marcador mMaCIR 07 (14 bandas) enquanto os marcadores mMaCIR 45 e mMaCIR 152 amplificaram o menor número delas (5 bandas cada). Os marcadores mMaCIR 13, mMaCIR 24 e mMaCIR 07 amplificaram o maior número de bandas polimórficas (11 bandas polimórficas) enquanto os marcadores mMaCIR 45 e mMaCIR 152, amplificaram o menor número delas (5 bandas polimórficas).

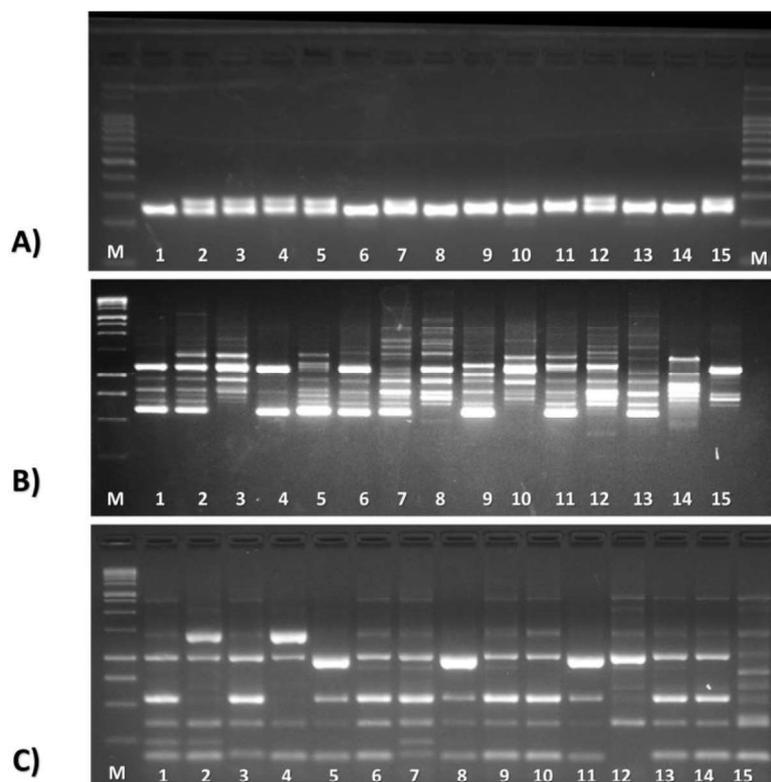


Figura 1 (A, B, C): A) perfil eletroforético de 15 amostras (AA-*Musa* spp.) em gel de agarose 3% usando marcador SSR (mMaCIR 8); B) perfil eletroforético de 15 amostras diploides (AA - *Musa* spp.) em gel de agarose 2% usando marcador ISSR (ISSR 95) e C) IRAP LTR619 + Nikita. M = Marcador ladder (Invitrogen®).

2.2. Diversidade genética

Visando aumentar o poder de agrupamento, optou-se pela combinação dos conjuntos de dados ISSR+IRAP+SSR para a construção da matriz de dissimilaridade, baseada no complemento do Coeficiente de Similaridade de Jaccard (Figura 2). O Coeficiente de Correlação Cofenética foi de 0.8755.

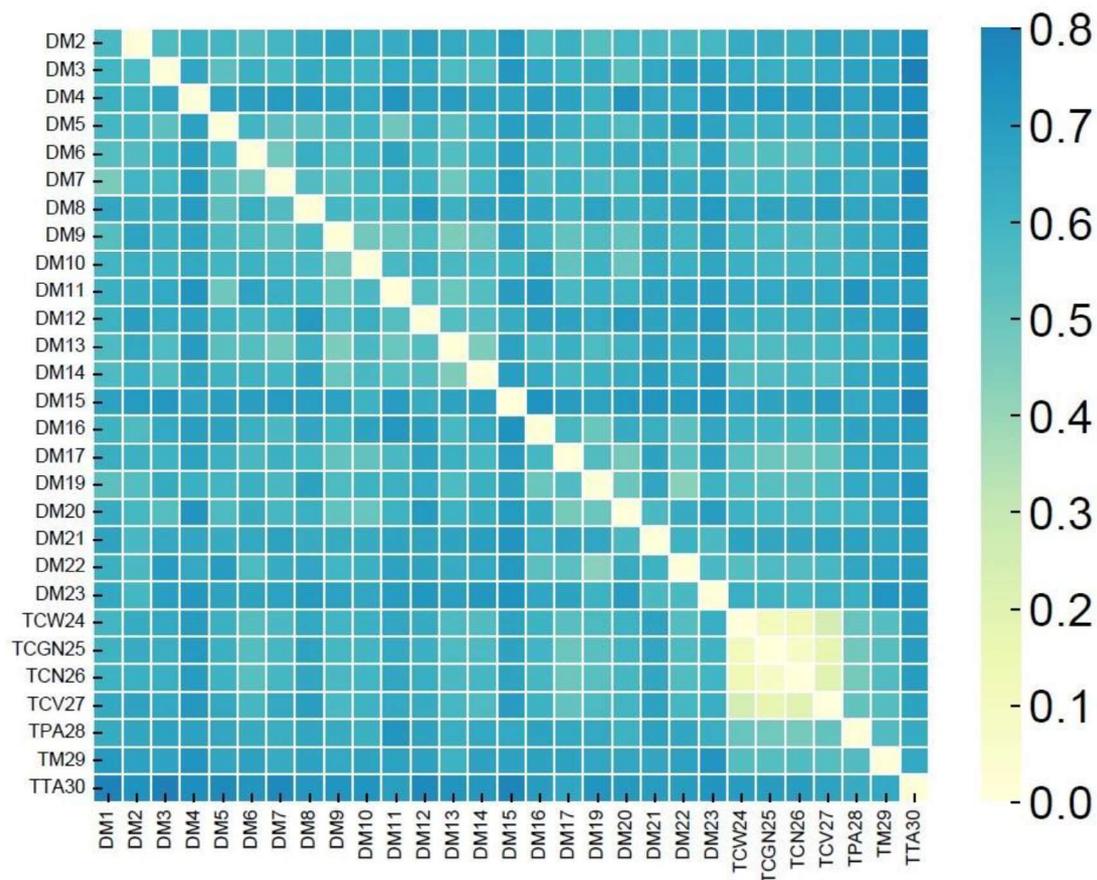


Figura 2. Distâncias genéticas, baseadas em dados ISSR+IRAP+SSR, entre diploides melhorados (AA) e triploides comerciais (AAA, AAB) de *Musa* spp. pertencentes ao BAG-Banana integrado ao PMGB da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, calculadas pelo complemento do Coeficiente de Similaridade de Jaccard. A identificação e detalhamento dos acessos encontram-se na Tabela .

A partir da análise da matriz de diversidade genética (Figura 2), pode-se observar que a maior dissimilaridade entre os diploides melhorados ocorre entre DM23 e DM15 (74%), DM16 e DM15 (74%), DM21 e DM15 (73%), DM20 e DM4 (73%), DM11 e DM04 (73%). As menores distâncias genéticas entre diploides melhorados e triploides comerciais ocorrem entre TCGN25 e DM17 (50%), TCN26 e DM17 (50%), TCV27 e DM17 (52%). A distância genética média entre os genótipos avaliados foi de 58%.

A análise de agrupamento agrupou os genótipos em tres grupos (Figura 3). No grupo 1 estão o triploide comercial TPA30, (AAB – Plátano, Terra Anã), compondo subgrupo isolado, e seis diploides melhorados DM2, DM16, DM19, DM22, DM23. No grupo 2 estão todos os triploides comerciais, com exceção do triploide TPA30. E no grupo 3, todos os demais 16 diploides comerciais DM8, DM6, DM1, DM7, DM12, DM14, DM9, DM13, DM5, DM11, DM3, DM10, DM17, DM20, DM4 e DM15.

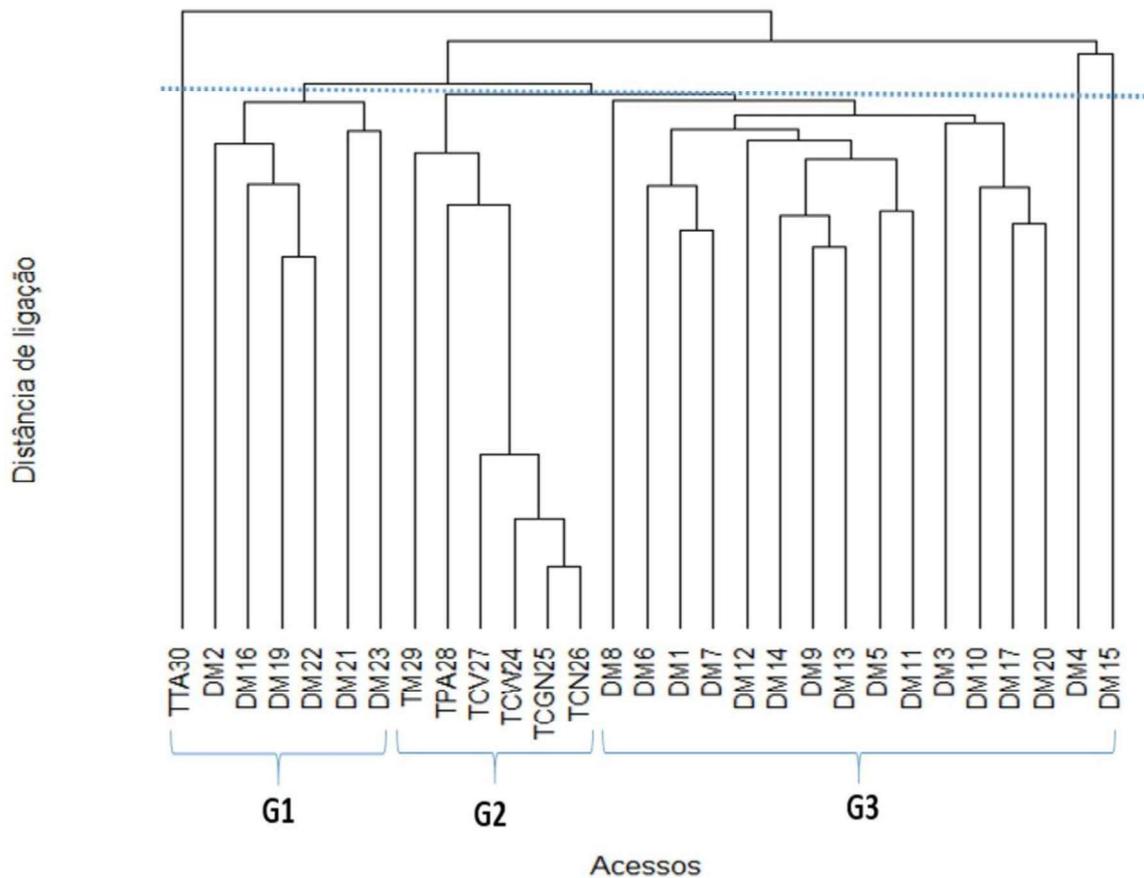


Figura 3. Análise de agrupamento. O dendrograma apresenta a diversidade genética entre 22 diploides melhorados e 7 triploides comerciais de *Musa* spp. Os códigos das plantas avaliadas encontram-se na Tabela 2.

O gráfico PCoA (Figura 4) gerado reflete a dispersão das amostras entre três grupos, como detectado no dendrograma e apresenta 24,02% de variabilidade distribuídas nas duas primeiras coordenadas principais (13,20% na coordenada 1 e 10,76% na coordenada 2).

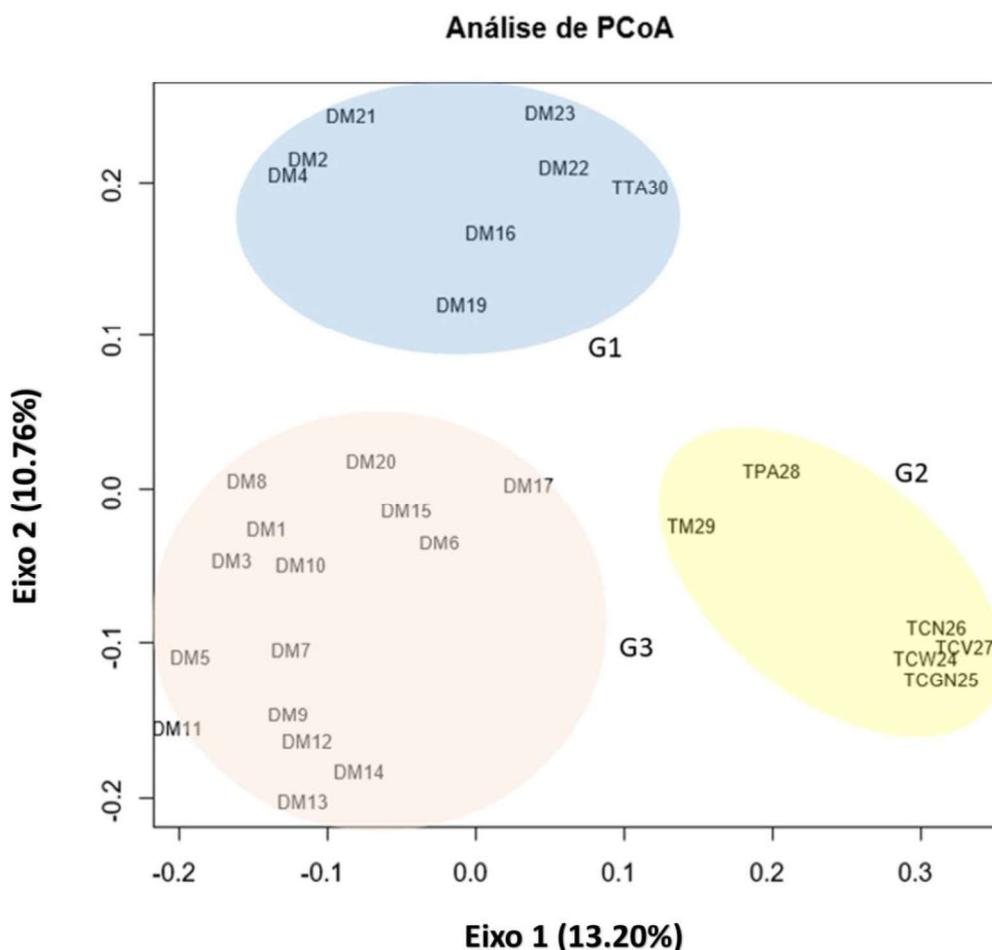


Figura 4. Análise de coordenada principal (PCoA). O gráfico apresenta os primeiros dois componentes (coordenada 1 e coordenada 2). Os códigos das plantas avaliadas encontram-se na Tabela 1.

3. Discussão

3.1. Diversidade genética

Dos princípios que norteiam os programas de melhoramento de bananeiras, um deles é a obtenção de híbridos por cruzamento convencional [1]. O PMGB da Embrapa visa, continuamente, o cruzamento envolvendo diploides para ampliação da base genética com criação de variabilidade, e cruzamentos destes diploides melhorados com triploides e tetraploides para o desenvolvimento de cultivares produtivos, resistentes e com as características organolépticas demandadas pelo consumidor.

A determinação dos parentais tem por base a caracterização dos materiais genéticos por descrição morfoagronômica – que pode ser dificultada pela semelhança fenotípica; ou por caracterização molecular de DNA, que não sofre ações do meio ambiente [22]. O conhecimento aprofundado da diversidade genética disponível nos BAGs possibilita cruzamentos que resultam na expressão de

caracteres em populações segregantes e consequente seleção racional dos melhores genótipos.

Com este intuito, realizou-se a caracterização molecular por ISSR, SSR e IRAP, de 22 diploides melhorados e 7 triploides comerciais, visando a identificação de diploides dissimilares que serão cruzados entre si, para ampliação da estreita base genética de *Musa* spp., bem como visou-se também a identificação de diploides e triploides menos dissimilares para cruzamentos visando desenvolvimento de híbridos triploides e tetraploides com manutenção dos bons caracteres agronômicos.

Os marcadores IRAP amplificam regiões centroméricas entre segmentos constituídos por elementos móveis retrotransposons com longo terminal de repetição LTR. Os retrotransposons apresentam a elevada capacidade de gerar incremento no tamanho do DNA, reestruturações cromossômicas e mutações com silenciamento ou superexpressão de genes devido ao seu mecanismo de auto-duplicação e inserção em novo loco [20,7]. Os marcadores microssatélites ocupam regiões intergênicas no gênero *Musa* spp. e por serem marcadores altamente específicos, possibilitam a discriminação de genótipos em estudos de diversidade [23]. Assim, por amplificarem diferentes regiões do genoma e visando maior poder de agrupamento, realizou-se a análise conjunta dos dados ISSR+IRAP+SSR.

A partir da análise geral da matriz de dissimilaridade (Figura 2) é possível identificar os diploides melhorados mais dissimilares entre si, visando cruzamentos entre esses materiais genéticos com vistas a exploração de heterose e obtenção de triploides. DM23 (028003-01) e DM16 (042085-02), ambos, apresentam 74% de dissimilaridade em relação ao diploide DM15 (CNPMF 0519). DM23 (028003-01) é um híbrido originado do cruzamento entre a cultivar Tuu Gia e a subespécie silvestre *M.acuminata* spp. *banksii* ('Madang'). Seu parental 'Tuu Gia' é resistente à Sigatoka amarela e negra e *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* [24]. DM16 (042085-02) tem origem no cruzamento [M53 x (Madu x Calcuta)]. O acesso DM15 (CNPMF 0519) é um diploide silvestre originado em autopolinização (Tambi x Tambi).

Considerando-se os resultados obtidos por [25], que ao avaliarem 24 diploides melhorados, obtidos pelo PMGB da Embrapa Mandioca e Fruticultura, identificaram o DM7 (086094-20) como medianamente suscetível ao Foc ST4; o diploide DM16 (042085-02) como medianamente suscetível ao Foc R1 e ST4 e DM15 (CNPMF 0519) como suscetível ao Foc R1 e ST4, é possível priorizar outros diploides promissores. Assim, identificou-se DM20 (CNPMF 0557) e DM 11 (013004-04), que apresentaram distância genética de 73% em relação a DM4 (CNPMF 1323), como parentais mais indicados. DM20 e DM4 são resistentes a Foc R1 e ST4, enquanto DM11 é altamente resistente a Foc R1 e medianamente resistente a foc ST4 [25].

Visando-se o cruzamento entre triploides comerciais e diploides melhorados, a menor distância entre os genótipos variou de 50% a 61% de dissimilaridade. O diploide melhorado DM17 (CNPMF 0536) é o mais próximo dos triploides 'Grande Naine' (TCGN25) e 'Nanica' (TCN26) com 50% de similaridade, sendo 48% similar à cultivar Valery (TCV27) e 46% similar ao triploide 'Williams' (TCW4); todos do grupo Cavendish. Assim como também é o mais próximo do triploide 'Terra-Anã' (TTA30). O diploide DM17 (CNPMF 0536) é um híbrido entre [(*Musa acuminata* spp. *burmannica* 'Calcutta') x (*Musa acuminata* spp. *banksii* 'Madang')] x [(Malaccensis – FHIA x Tjau Lagada)]. No entanto, é importante ressaltar que a recomendação de melhoramento no subgrupo Cavendish ainda preconiza o uso de biotecnologia visando a obtenção de variedades e cultivares resistentes ou tolerantes por

transgenia ou indução de mutação e variação somaclonal devido a esterilidade dos triploides comerciais. Embora sejam encontrados sacos embrionários em diferentes estágios de desenvolvimento em triploides do subgrupo Cavendish, grupo Mysore, Plátano e Prata, ainda não existe um consenso sobre a funcionalidade destas estruturas nessas plantas e a hipótese de esterilidade ainda é baseada na incompetência no crescimento do tubo polínico ou degeneração das sementes [26]. Estudos recentes [27, 28] sugerem que componentes fenólicos e atividade enzimática oxidativa, em Cavendish, impactam negativamente o crescimento do tubo polínico. Ainda assim, continua relevante a compreensão da infertilidade em função da pressão de seleção por frutos sem sementes na domesticação das bananeiras [26] até que novas pesquisas superem as barreiras que causam esterilidade nos triploides comerciais.

O diploide mais próximo do triploide 'Prata-Anã'(TPA28) é o DM20 (CNPMF 0557) com 39% de similaridade. O DM20 tem origem em [(M61 x Lidi) x (Malaccensis – FHIA x Tjau Lagada)]. No agrupamento pelo método UPGMA, o triploide 'Prata-Anã' (TPA28) e o diploide DM20 (CNPMF 0557), estão alocados nos grupos 2 e 3, respectivamente.

O diploide mais similar ao triploide 'Maçã' (TM29) é DM13 (CNPMF 0542) com origem em [(Malaccensis – FHIA x Sinwobogi) x SH3263 – Híbrido da FHIA]. No dendrograma, o triploide 'Maçã' e o diploide melhorado DM13 estão alocados nos grupos 2 e 3, respectivamente.

Interessante notar que os três diploides melhorados mais similares aos triploides comerciais, apresentaram o genótipo FHIA, uma cultivar tipo Prata, dentre seus parentais [29]. Nos diploides DM17 (CNPMF 0536) e DM20 (CNPMF 0557), o genótipo FHIA se integra como parental feminino e no diploide DM13 (CNPMF 0542) como parental feminino direto e compoendo o parental masculino.

Observando a análise de agrupamento, percebe-se que o conjunto dos dados moleculares ISSR+IRAP+SSR foram competentes na distinção dos diploides melhorados e triploides comerciais, os quais apresentam-se alocados no grupo 2, com exceção do triploide Terra-Anã. O gráfico de clusters também representa essa tendência na menor dispersão entre os triploides do subgrupo Cavendish (AAA) e proximidade dos triploides 'Maçã' e 'Prata-Anã', com exceção do triploide 'Terra-Anã', que compõe o grupo 1, porém em subgrupo isolado.

Os grupos 1 e 3 na análise UPGMA, são constituídos basicamente por diploides melhorados, com exceção do triploide 'Terra-Anã', um representante do grupo dos plátanos AAB, formando um sugrupo isolado. Pode-se observar maior concentração no grupo 3 de diploides melhorados que apresentam o genótipo de FHIA na constituição dos parentais. Neste grupo, 10 diploides apresentam essa característica dentre os 16 agrupados. DM5 (001016-01), DM6 (M53), DM8 (058054-03), DM12 (050012-02), DM14 (CNPMF 0496), DM15 (CNPMF 0519) e DM20 (CNPMF 0557) são as exceções.

O valor do coeficiente de correlação cofenética foi elevado e adequado (CCC=0.8755), pois têm-se que CCC>0.56 é considerado ideal [30], representando uma boa aderência entre a representação dos agrupamentos e os dados da matriz de distâncias genéticas.

A dissimilaridade encontrada entre os diploides é elevada, com valor médio de 57%, variando de 46% a 74%, demonstrando existência de variabilidade genética. Esses valores são próximos aos valores encontrados por [31], porém maiores que os valores encontrados por [32], utilizando apenas marcadores SSR na caracterização molecular de diploides melhorados.

Os marcadores moleculares de DNA mostraram-se eficientes na detecção de variabilidade genética entre os diploides melhorados e na detecção de similaridade entre diploides melhorados e triploides comerciais visando identificação de cruzamentos promissores à obtenção de triploides e tetraploides resistentes à fatores bióticos e abióticos em bananeira.

4. Material e Métodos

4.1. Material vegetal

A lista com 22 diploides (AA) melhorados e sete triploides (AAA, AAB) comerciais de *Musa* L., encontra-se detalhada na Tabela 1. Os genótipos avaliados pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Banana) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no município de Cruz das Almas, Bahia, localizada nas coordenadas 12° 40' 47.2296" S, 39° 5' 17.0952" W, 220 m acima do nível do mar. O clima do município é quente e úmido, classificado como tropical (Af), com temperatura média de 23.7°C, índice pluviométrico médio anual de 1,161 mm e 2,327.88 horas de luz solar anual [33].

Tabela 1. Vinte e dois diploides (AA) melhorados e sete triploides (AAA, AAB) comerciais de *Musa* L., pertencentes ao BAG-Banana - PMGB - Embrapa Mandioca e Fruticultura

PLOIDIA	CÓDIGO	GENÓTIPO	GENEALOGIA
AA	DM1	CNPMF 0612	[(M53 × Madu)] × SH3263
AA	DM2	CNPMF 0998	[(Borneo × Guyod)] × [(Borneo × Guyod) × SH3263]
AA	DM3	CNPMF 0534	[(Calcutta4 × Madang)] × [(Maccensis-FHIA) × (Tjau Lagada)]
AA	DM4	CNPMF 1323	[(Malaccensis-FHIA × Sinwobogi)] × [(Calcutta 4 × Madang) × (Borneo × Madang)]
AA	DM5	001016-01	Borneo × Guyod
AA	DM6	M53	[(Malaccensis – Kedah × Banksii – Samoa)] × [(Paka × Banksii – Samoa)]
AA	DM7	086094-20	[(Calcutta 4 × Heva)] × SH3263
AA	DM8	058054-03	[(Calcutta 4 × Pahang)] × [(Borneo × Madang)]
AA	DM9	013018-01	Malaccensis-FHIA × Sinwobogi
AA	DM10	013019-01	Malaccensis-FHIA × Tjau Lagada
AA	DM11	013004-04	Malaccensis-FHIA × Madang
AA	DM12	050012-02	Pahang × [(Lidi × SH3263)]
AA	DM13	CNPMF 0542	[(Malaccensis-FHIA × Sinwobogi)] × SH3263
AA	DM14	CNPMF 0496	[(M61 × Lidi)] × [(Terrinha × Calcutta 4)]
AA	DM15	CNPMF 0519	Auto-polinização (diploide silvestre Tambi)
AA	DM16	042085-02	[(Madu × Calcutta 4)] × M53
AA	DM17	CNPMF 0536	[(Calcutta 4 × Madang)] × [(Malaccensis-FHIA × Tjau Lagada)]
AA	DM18*	CNPMF 0357	[(Prata-Anã)] × [(M53 (BGB 06)) × M48]
AA	DM19	CNPMF 0731	[(Malaccensis-FHIA × Madang)] × [(Tuu Gia × Madang)]
AA	DM20	CNPMF 0557	[(M61 × Lidi)] × [(Malaccensis-FHIA × Tjau Lagada)]
AA	DM21	CNPMF 0513	[(M61 × Lidi)] × [(M53 (BGB 06)) × (Kumburgh)]
AA	DM22	CNPMF 0993	[(Borneo × Guyod) × (Tuu Gia × Madang)] × [Khai × [(Calcutta 4 × Madang)]]
AA	DM23	028003-01	Tuu Gia × Madang
AAA	TCW24	Williams	
AAA	TCGN25	Grande Naine	
AAA	TCN26	Nanica	
AAA	TCV27	Valery	
AAB	TPA28	Prata-Anã	
AAB	TM29	Maçã	
AAB	TTA30	Terra-Anã	

*DM18 (CNPMF0357) não foi avaliado neste estudo.

4.2. Extração de DNA

DNA genômico de cada acesso foi extraído a partir de recortes de folhas jovens e frescas de bananeira com aproximadamente 300 mg, seguindo o protocolo CTAB modificado [34] com maceração do material vegetal em presença de 3 mL de tampão de extração, usando furadeira de bancada adaptada. A quantidade e qualidade do DNA extraído foram avaliadas por fotodocumentação sobre luz U.V, após eletroforese em gel de agarose (1%) a 70 V, por 40 minutos. A quantificação foi inferida a partir da comparação visual com DNA Lâmbda de referência com 100, 200 e 300 ng (ladder Invitro Gen 1 Kb) e 100 pb, Promega 1 Kb). Porções do DNA foram diluídas em TE para uso nas análises IRAP, ISSR e SSR.

4.3. Análise IRAP

Os procedimentos PCR-IRAP foram realizados com base em [7, 35] com adaptações na programação da amplificação. Marcadores baseados em retrotransposons LTR, das famílias Nikikita e Bare 1, especificamente os primers originados no sorgo (*Hordeum vulgare* L.), Nikita, 5'LTR2, 3'LTR, LTR6150, LTR6149, e C0795 (Tabela 2), foram usados de forma combinada para a análise IRAP. As reações PCR-IRAP foram realizadas com volume final de 15 µL por amostra, contendo 4 µL de DNA molde (40 ng), 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1.5 µL de tampão PCR 10 x, 1.2 µL de dNTP (2.5 mM), 1.5 µL de cada primer (10 mM) pareado, 0.3 µL de Taq DNA polimerase comercial (5 U µL⁻¹) e água livre de nuclease.

O protocolo de amplificação consistiu na programação de uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento (45 °C a 48 °C) por 60 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos por ciclo; seguindo para extensão final com manutenção em 72 °C por 5 minutos e finalização da reação com redução da temperatura até 10 °C, para manutenção até a retirada das amostras do termociclador.

Tabela 2. Detalhamento dos primers IRAP usados em 22 diploides (AA) melhorados e sete triploides (AAA, AAB) comerciais de *Musa* L., indicando orientação, origem, sequência e autores referência.

Primers	Família de Origem	Sequência (5'-3')	Referência
5'LTR2 ←	BARE 1	5'-ATC ATT GCC TCT AGG GCA TAA TTC-3'	[7]
3'LTR →	BARE 1	5'-TGT TTC CCA TGC GAC GTT CCC CAA CA-3'	[7]
Sukkula →	Sukkula	5'-GAT AGG GTC GCA TCT TGG GCG TGA C-3'	[7]
Nikita →	Nikita	5'-CGC ATT TGT TCA AGC CTA AAC C-3'	[7]
LTR6149 →	BARE 1	5'-CTC GCT CGC CCA CTA CAT CAA CCG CGT TTA TT-3'	[7]
LTR6150 ←	BARE 1	5'-CTG GTT CGG CCC ATG TCT ATG TAT CCA CAC ATG TA-3'	[7]
C0795	BARE 1	5'-TCC CAT GCG ACG TTC CCC-3'	[35]
C0945	Sabrina	5'-GCA AGC TTC CGT TTC CGC-3'	[35]

→: Forward; ←: Reverse.

4.4. Análise SSR

Foram usados 12 primers SSR (Tabela 4), selecionados a partir de [36] para a análise dos acessos. As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL para cada amostra, contendo 1.5 µL de MgCl (25 mM), 2.0 µL de tampão PCR 10x, 1.0 µL de dNTP (2.5 mM), 0.8 µL de cada primer (5 mM), 0.3 µL de Taq DNA polimerase comercial (5U. µL⁻¹), 3.0 µL de DNA (30 ng) e água livre de nuclease. A programação da amplificação consistiu em 2 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, seguida de 39 ciclos consistindo em 60 segundos de desnaturação a 94 °C, 60 segundos na temperatura de anelamento (Tabela 3), seguida por 60 segundos de extensão em 72 °C e 10 minutos de extensão final em 72 °C .

Tabela 3. Detalhamento dos primers SSR usados na análise de 22 diploides (AA) melhorados e sete triploides (AAA, AAB) comerciais de *Musa* L., indicando motivo e referência.

Primer	TA (°C)	Motivo	Referência
mMaCIR 01	55.0	(GA)20	[36]
mMaCIR 07	53.0	(GA)13	[36]
mMaCIR 08	55.0	(TC)6N24(TC)7	[36]
mMaCIR 24	52.0	(TC)7	[36]
mMaCIR 40	54.0	(GA)13	[36]
mMaCIR 150	54.0	(CA)10	[36]
mMaCIR 45	58.0	(TA)4CA(CTCGA)4	[36]
mMaCIR 196	55.0	(TA)4, (TC)17, (TC)3	[36]
mMaCIR 231	55.0	(TC)10	[36]
mMaCIR 13	57.0	(GA)16N76(GA)8	[36]
mMaCIR 39	52.0	(CA)5GATA(GA)5	[36]
mMaCIR 152	54.0	(CTT)18,(CT)17,(CA)6	[36]

TA°: temperatura de anelamento dos primers

4.5. Análise ISSR

Sete primers ISSR (Tabela 4), foram selecionados para a análise dos acessos. O mix de reação PCR consistiu em um volume final de 25 µL contendo 2.5 µL de MgCl (25 mM), 2.5 µL de tampão PCR 10x, 2.0 µL de dNTP (2.5 mM), 3.5 µL de primer (2 mM), 0.2 µL de Taq DNA polimerase comercial (5U. µL⁻¹), 4.0 µL de DNA (40 ng) e água livre de nuclease. A programação da amplificação consistiu em 3 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, seguida de 39 ciclos consistindo em 40 segundos de desnaturação a 94 °C, 40 segundos na temperatura de anelamento, seguida por 60 segundos de extensão em 72° C e 5 minutos de extensão final em 72° C.

Tabela 4. Detalhamento dos primers SSR usados na análise de 22 diploides (AA) melhorados e sete triploides (AAA, AAB) comerciais de *Musa* L., indicando motivo e referência.

Primer	Nome	TA (°C)	Sequência	Referência
ISSR 92	TriGAC 3'RC	45.0	GACGACGACGACGACRC	Embrapa
ISSR 72	TriTCC 3'RC	50.0	TCCTCCTCCTCCTCCRC	Embrapa

ISSR 95	TriGTT 3'RC	50.0	GTTGTTGTTGTTGTTTC	Embrapa
ISSR 47	TriTGT5'CY	50.0	CYTGTTGTTGTTGTTGT	Embrapa
ISSR 29	TriCAC3'RC	50.0	CACCACCACCACCACRC	Embrapa
ISSR 07	DiCA5'CY	48.0	CYCACACACACACACA	Embrapa
ISSR 57	TriACC 3'RC	50.0	ACCACCACCACCACCRC	Embrapa

TA (°C): Temperatura de anelamento dos primers

4.6. Eletroforese e análise de dados

Todos os produtos foram corados com 3 µL de solução tampão de corrida contendo Gel Red®. Os segmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2 % (IRAP e ISSR) e 3 % (SSR) em tampão TBE 5x, sob voltagem constante de 85 V por aproximadamente três horas e foram visualizados por fotografia obtida sobre luz U.V., com o uso do sistema de captura de imagens Locus L-PIX EX 25x30. O comprimento das bandas amplificadas foi inferido por comparação ao ladder de referência Invitrogen Plus e PROMEGA 1 Kb (IRAP e ISSR) e Invitrogen Plus 100 pb (SSR).

Os perfis de amplificação PCR foram todos escorados como marcadores dominantes, adotando (1) para presença e (0) para ausência, para cada posição polimórfica de banda, para cada primer [19]

A matriz de distância genética, dendrograma e a correlação fenotípica com base em 1000 reamostragens, foram obtidos por meio do software R, utilizando os pacotes: *prabclus* e *Nbclust* [37]. A análise de coordenadas principais foi obtida pelo programa R e o pacote *vegan*. O agrupamento foi feito pelo método do UPGMA e o ponto de corte definido com base nos critérios de [38].

5. Referências

- [1] SHEPHERD, K.; ALVES, E.J. The banana breeding programme at the Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Bahia State, Brazil. **Fruits**, v.39, n.3, p.154-157. 1981. Disponível em <https://revues.cirad.fr/index.php/fruits/article/view/34793>. Acesso em 26 out. 2023.
- [2] SHEPHERD, K. Banana Breeding - Past and Present. **Acta Horticulture**, v.196, p. 37-44. 1987. DOI: 10.17660/ActaHortic.1987.196.3v. Disponível em <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.196.3v>.
- [3] SILVA, S.O.; SOUZA JUNIOR, M.T.; ALVES, É.J.; SILVEIRA, J.R.S.; LIMA, M.B. Banana Breeding Program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001. DOI: 10.13082/1984-7033.v01n04a09. Disponível em <https://doi.org/10.13082/1984-7033.v01n04a09>.
- [4] AMORIM, E.P.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S. O.; PILLAY, M. Quality improvement of cultivated Musa. In: MICHAEL PILLAY; A.T. (Org.). **Banana Breeding: Progress and Challenges**. New York: CRC Press, 2011, p. 252-280.
- [5] CRESTE, S.; NETO, A.T.; SILVA, S.D.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica** v.132, pp. 259-268. 2003. DOI: 10.1023/A:1025047421843. Disponível em <https://doi.org/10.1023/A:1025047421843>.

[6] SANTOS, T.T.C.; AMORIM, V.B.O.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA LEDO, C.A.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P. Genetic variability among autotetraploid populations of banana plants derived from wild diploids through chromosome doubling using SSR and molecular markers based on retrotransposons. **Molecular Breeding**, v.39, p. 95, 2019. DOI 10.1007/s11032-019-0996-1. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0996-1>.

[7] TEO, C.H.; TAN, S.H.; HO, C.L.; FARIDAH, Q.Z.; OTHMAN, Y.R.; HESLOP-HARRISON, J.S.; KALENDAR, R.; SCHULMAN, A.H. Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana. *Journal of Plant Biology*, v. 48, n. 1, p. 96-105, 2005. DOI: 10.1007/BF03030568. Disponível em <https://doi.org/10.1007/BF03030568>.

[8] SARASWATHI, M. S.; UMA, S.; PRASANYA SELVAM, K.; RAMARAJ, S.; DURAI, P.; MUSTAFFA, M. M. Assessing the robustness of IRAP and RAPD marker systems to study intra-group diversity among Cavendish (AAA) clones of banana. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.86, n.1, p. 7-12. 2011. <https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512717>.

[9] SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society of London**, Botany, v. 55, n. 359, p. 302-312. 1955. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x>.

[10] HÄKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). **Taxon**, v. 62, n. 4, p. 809-813, 2013. DOI: 10.12705/624.3. Disponível em <https://doi.org/10.12705/624.3>.

[11] BAURENS, F-C.; MARTIN, G.; HERVOUET, C.; SALMON, F.; YOHOMÉ, D.; RICCI, S.; ROUARD, M.; HABAS, R.; LEMAINQUE, A.; YAHIAOUI, N.; D'HONT, A. Recombination and Large Structural Variations Shape Interspecific Edible Bananas Genomes. **Molecular Biology and Evolution**. v.36, n.1, p. 97-111, 2019. DOI: 10.1093/molbev/msy199. Disponível em <https://doi.org/10.1093/molbev/msy199>.

[12] GHAG, S.B.; SHEKHAWAT, U.K.S.; GANAPATHI, T.R. Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. **International Journal of Pest Management**, v. 61, n. 3, p. 250-263. 2015. DOI: 10.1080/09670874.2015.1043972. Disponível em <https://doi.gov/10.1080/09670874.2015.1043972>.

[13] SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A.; FERREIRA, C.F.; RODRIGUEZ, M.A.D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013. DOI: 10.1590/S0100-29452013000300032. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000300032>.

[14] CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA. Banana. **Anuário Hortifruti Brasil: Retrospectiva 2023 & Perspectiva 2024**. p. 26-27. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. 2023. Disponível em

<https://www.hfbrasil.org.br/revista/anuario-hf-brasil-retrospectiva-2023-perspectiva-2024.aspx>. Acesso em 10 jul. 2024.

[15] LIU, X.; ARSHAD, R.; WANG, X.; LI, W.-M.; ZHOU, Y.; GE, X.-J.; HUANG, H.-R. The phased telomere-to-telomere reference genome of *Musa acuminata*, a main contributor to banana cultivars. **Scientif Data**, v.10, n. 631, p. 1-13. 2023. DOI: 10.1038/s41597-023-02546-9. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41597-023-02546-9>.

[16] SILVA, S.O.; MATOS, A.P.; ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. **Revista Pesquisa Agropecuária**, v.33, n.5, p.693-703, 1998. Disponível em <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44946/1/MELHORAMENTO-GENETICO.pdf>. Acesso em 03 ago. 2024.

[17] WANG, Z.; MIAO, H.; LIU, J.; XU, B.; YAO, X.; XU, C.; ZHAO, S.; FANG, X.; JIA, C.; WANG, J.; ZHANG, JINGYI.; LI, J.; XU, Y.; WANG, JIASHUI.; MA, W.; WU, Z.; YU, L.; YANG, Y.; LIU, C.; GUO, Y.; SUN, S.; BAURENS, F.-C.; MARTIN, G.; SALMON, F.; GARSMEUR, O.; YAHIAOUI, N.; HERVOUET, C.; ROUARD, M.; LABOUREAU, N.; HABAS, R.; RICCI, S.; PENG, M.; GUO, A.; XIE, J.; LI, Y.; DING, Z.; YAN, Y.; TIE, W.; D'HONT, A.; HU, W.; JIN, Z. *Musa balbisiana* genome reveals subgenome evolution and functional divergence. **Nature Plants**, v.5, p. 810-821. 2019. DOI: 101038/s41477-019-0452-6. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0452-6>.

[18] CHABANNES, M.; GABRIEL, M.; AKSA, A.; GALZI, S.; DUFAYARD, J.F.; ISKRA-CARUANA, M.L.; MULLER, E. Badnaviruses and banana genomes: a long association sheds light on *Musa* phylogeny and origin. **Molecular Plant Pathology**, v.22, n.2, p. 216-230. 2021. DOI: 10.1111/mpp.13019. Disponível em <https://doi.org/10.1111/mpp.13019>.

[19] ARVAS, Y.E.; MARAKLI, S.; KAYA, Y.; KALENDAR, R. The power of retrotransposons in high-throughput genotyping and sequencing. **Frontiers Plant Science**, v.14, 1174339. 2023. DOI: 10.3389/fpls.2023.1174339. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1174339>.

[20] KALENDAR, R.; FLAVELL, A. J.; ELLIS, T H N; SJAKSTE, T.; MOISY, C.; SCHULMAN, A. H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. **Heredity**, v. 106, n. 4, p. 520-530, 2011. DOI 10.1038/hdy.2010.93. Disponível em <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.93>.

[21] WANG, Z.; MIAO, H.; LIU, J.; XU, B.; YAO, X.; XU, C.; ZHAO, S.; FANG, X.; JIA, C.; WANG, J.; ZHANG, JINGYI.; LI, J.; XU, Y.; WANG, JIASHUI.; MA, W.; WU, Z.; YU, L.; YANG, Y.; LIU, C.; GUO, Y.; SUN, S.; BAURENS, F.-C.; MARTIN, G.; SALMON, F.; GARSMEUR, O.; YAHIAOUI, N.; HERVOUET, C.; ROUARD, M.; LABOUREAU, N.; HABAS, R.; RICCI, S.; PENG, M.; GUO, A.; XIE, J.; LI, Y.; DING, Z.; YAN, Y.; TIE, W.; D'HONT, A.; HU, W.; JIN, Z. *Musa balbisiana* genome reveals subgenome evolution and functional divergence. **Nature Plants**, v.5, p. 810-821. 2019. DOI: 101038/s41477-019-0452-6. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0452-6>.

[22] BERED, F.; BARBOSA NETO, J.F.; ROCHA, B.M.; PEGORARO, D.G.; VACARO, E.; CARVALHO, F.I.F. Caracterização de germoplasma de trigo por meio dos caracteres adaptativos ciclo e estatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.2, p. 145-150. 2002. DOI: 10.1590/S0100-204X2002000200005. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002000200005>.

[23] BISWAS, M.K.; BISWAS, D.; YI, G.; DENG, G. The Musa Marker Database: A Comprehensive Genomic Resource for the Improvement of the Musaceae Family. **Agronomy**, v. 14, 838. 2024. DOI: 10.3390/agronomy14040838. Disponível em <https://doi.org/10.3390/agronomy14040838>.

[24] DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W. dos S.; CORDEIRO, Z.J.M.; SILVA, S. de O. e; ALVES, E.J.; SOUZA, A. da S.; OLIVEIRA, M. de A. Programa de melhoramento genético da bananeira em execução no CNPMP/Embrapa. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP, 1993a, 43p. (EmbrapaCNPMP. Documentos, 47).

[25] SANTANA, W.S.; ROCHA, A.D.J.; DA SILVA, W.B.; AMORIM, V.B.O.D.; RAMOS, A.P.D.S.; HADDAD, F.; AMORIM, E.P. Selection of Improved Banana Diploid Resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Races 1 and Subtropical 4. **Agronomy**, v.14, n. 1277. 2024. DOI: 10.3390/agronomy14061277. Disponível em <https://doi.org/10.3390/agronomy14061277>.

[26] SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; GOUTANT-BAKRY, M-E.; DZOYEM, C.U.D.; BAKRY, F. Development and functioning of the embryo sac in four triploid banana cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [Internet], v.58, n.e03204. 2023. DOI: 10.1590/S1678-3921.pab2023.v58.03204. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2023.v58.03204>

[27] SILVA, M. dos S.; GOES, N. da H.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P. Phenolic compounds and oxidative enzymes involved in female fertility in banana plants of the Cavendish subgroup. **Plants**, v.10, n.2790. 2021. DOI: 103390/plants10122790. Disponível em <https://doi.org/103390/plants10122790>.

[28] SILVA, M. dos S.; SANTANA, A.N.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P. Morphoanatomy and histochemistry of septal nectaries related to female fertility in banana plants of the 'Cavendish' subgroup. **Plants**, v.11, n.1177, 2022. DOI: 10.3390/plants11091177. Disponível em <https://doi.org/10.3390/plants11091177>.

[29] DONATO, S.L.R.; ARANTES, A.M.; SILVA, S.O.E.; CORDEIRO, Z.J.M. Comportamento fitotécnico da bananeira 'Prata-Anã' e de seus híbridos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, p. 1608-1615. 2009. DOI: 10.1590/S0100-204X2009001200007. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009001200007>.

[30] VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v.137, n.1, p.6372. 2004. DOI: 10.1023/B:EUPH.0000040503.48448.97. Disponível em <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000040503.48448.97>.

[31] AMORIM, E.P.; LESSA, L.S.; LEDO, C.A.S.; AMORIM, V.B.O.; REIS, R.V.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA, S.O.E. Caracterização agronômica e molecular de genótipos diploides melhorados de bananeira. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v.31, n.1, p. 154-161. 2009. DOI: 10.1590/S0100-29452009000100022. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-29452009000100022>.

[32] AMORIM, E.P.; REIS, R.V.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S.O.E. Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p. 1045-1052. 2008. DOI: 10.1590/S0100-204X2008000800014. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800014>.

[33] AGRITEMPO. Agritempo: sistema de monitoramento agrometeorológico. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/agroclima/sumario>. Acesso Em 22 jul.2024.

[34] FERREIRA, C.F; GUTIERREZ, D.L; KREUZE, J.F; ISKRA-CARUANA, M.L; CHABANNES, M; BARBOSA, A.C.O; SANTOS, T.A.; SILVA, A.G.S.; SANTOS, R.M.F.; AMORIM, E.P.; OLIVEIRA, S.A.S. DE; JESUS, O.N. Rapid plant DNA and RNA extraction protocol using a bench drill. **Genetics and Molecular Research**. v.18, n.3, p.1-8, 2019. DOI: 10.4238/gmr18394. Disponível em <https://doi.org/10.4238/gmr18394>.

[35] BAUMEL, A.; AINOUCHE, M.; KALENDAR, R.; SCHULMAN, A.H. Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploide species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae). **Molecular Biology Evolution**, v.19, n.8, p. 1218-1227, 2002. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004182. Disponível em <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004182>.

[36] CHRISTELOVÁ, P.; VALÁRIK, M.; HŘIBOVÁ, E.; HOUWE, I.V.D.; CHANNELIÈRE, S.; ROUX, N.; DOLEŽEL, J. A platform for efficient genotyping in *Musa* using microsatellite markers. **AoB Plants**. Special issue plr024, p. 1-14, 2011:2011:plr024. 2011. DOI: 10.1093/aobpla/plr024. Disponível em <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr024>.

[37] R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <https://www.R-project.org/>.

[38] MINGOTI, S.A. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. Editora UFMG, 2005.

CONCLUSÃO GERAL

A bananeira é uma importante cultura agrônômica, com relevância sócio-cultural principalmente em países que apresentam elevado percentual de sua população em situação de vulnerabilidade. Seus frutos contribuem diretamente para a segurança alimentar e nutricional, ao serem consumidos in natura, desidratados ou cozidos, e de forma indireta ao serem trocados ou comercializados, gerando renda.

Devido à preferência dos consumidores por um limitado número de cultivares, somada à forma vegetativa de propagação, essa importante cultura apresenta uma base genética reduzida, com elevada suscetibilidade a estresses bióticos e abióticos. Neste sentido, programas de melhoramento genético vegetal podem acelerar a obtenção de cultivares mais produtivos e tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos.

O Programa de Melhoramento Genético em Bananeira (PMGB) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, desde o início da década de 1980, tem se dedicado à obtenção de diploides melhorados a partir de cruzamentos com genótipos silvestres, detentores de genes de resistência perdidos ao longo de séculos de domesticação, bem como à obtenção de triploides e tetraploides que concentrem características favoráveis à aceitação de cultivares mais produtivas e resistentes por parte de produtores e consumidores. A indução de variação somaclonal na cultura de tecido é também uma frente de atuação do PMGB visando à geração de variabilidade genética a ser incorporada ao melhoramento dos triploides comerciais.

O uso de marcadores moleculares no PMGB, complementa a caracterização morfoagronômica dos híbridos e cultivares, possibilitando identificar diversidade genética entre os genótipos disponíveis nos Bancos Ativos de Germoplasma de Banana, bem como a identificação de genes com potencial relação às rotas de defesa das plantas.

Neste trabalho, foi possível avaliar variantes somaclonais da cultivar Grande Naine, previamente selecionados como resistentes ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raça 4, subtropical, por meio de marcadores moleculares de DNA baseados em retrotransposon (IRAP e REMAP). Uma banda polimórfica identificada e sequenciada confirmou a identificação de gene relacionado à proteína 'calcium binding protein', uma importante proteína de ligação ao cálcio com participação ativa e precoce nas vias de defesa das plantas em resposta à infecção por patógenos. Esse resultado amplia a possibilidade de implementação de seleção assistida por marcador molecular no PMGB, viabilizando, por exemplo, a possível detecção precoce de genótipos resistentes ainda em fase inicial de desenvolvimento das plantas.

Também foi possível, por meio de marcadores moleculares de DNA tipo SSR, ISSR e IRAP, identificar a diversidade genética entre diploides melhorados, desenvolvidos pelo PMGB, e suas relações genéticas com triploides comerciais, visando a identificação de parentais em cruzamentos promissores.

De forma conjunta, estes estudos reforçam a eficácia no uso de marcadores moleculares na identificação de diversidade genética, bem como na identificação de genes de resistência. As estratégias empregadas aqui, podem acelerar o desenvolvimento de cultivares de bananeiras mais tolerantes e resistentes a fatores bióticos e abióticos, contribuindo para a sustentabilidade nos sistemas produtivos e agregando informações que impactam o agronegócio da banana.