**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização molecular de acessos de bananeira do banco de
germoplasma da Embrapa**

Onildo Nunes de Jesus

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Onildo Nunes de Jesus
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização molecular de acessos de bananeira do banco de germoplasma da
Embrapa**

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento
de Plantas

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Jesus, Onildo Nunes de

Caracterização molecular de acessos de bananeira do banco de germoplasma da
Embrapa / Onildo Nunes de Jesus. - - Piracicaba, 2010.
137 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Banana 2. Biodiversidade 3. Genoma 4. Germoplasma vegetal 5. Marcador molecul
6. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDD 634.772
J58c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Antonio de Jesus e Almerinda Nunes pelo amor e exemplo de luta que norteiam a minha formação moral. Ao cunhado João Carlos e minha irmã Girlande pelo apoio, carinho em todas as etapas da minha formação.

Dedico

“Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço”

Dave Weinbaum

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo;

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira pela amizade, sugestões e paciência em todas as etapas da realização deste trabalho;

Ao Programa de Melhoramento Genético da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo pela oportunidade concedida para a realização do curso de Doutorado;

A todos os professores da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos;

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical em especial ao Dr. Sebastião de Oliveira Silva por financiar parte desse projeto através do CNPq;

Aos pesquisadores Dra. Cláudia Fortes e em especial Dr. Edson Perito Amorim por todo apoio dado na realização deste trabalho;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por ceder o espaço físico para execução desse projeto;

Aos técnicos do laboratório Wlamir Godoy, Eduardo e Myrian Raquel cujos trabalhos isolados contribuíram para a realização dessa tese como um todo;

À Inês Rodrigues do Laboratório de Cultura de Tecidos/CENA pelo carinho e a amizade;

A CAPES e o CNPq pela bolsa de estudo concedida;

Aos meus irmãos Joseval, Erivaldo, Gilvando, João Carlos, Ivoneide, Lucidalva e Antônio Nunes por acreditarem que eu seria capaz;

Aos tios e tias, primos e primas em especial Cláudia Gomes pelo apoio, carinho e amizade;

Aos cunhados e cunhadas em especial Antônio Mario Félix Santos pelo incentivo;

Aos meus sobrinhos e sobrinhas;

Aos amigos do curso de doutorado Carlos Eduardo, Wellington, Paula Fabiane, Gika, Endsson Nunes, Helen Penha, Maria Aparecida, Maria Marta e *et al.*;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas/CENA Déborah Nishimura, Danielle Scotton, Gildemberg Leal, João Bortoleto, Laura Possignolo, Layanne Souza, Maria Lorena, Mariana, Matheus, Paula Yamamoto, Tais Tomazini e Thaísa Pinheiro pelos momentos de aprendizado em conjunto. Nesse universo de pessoas não poderia esquecer os amigos João Felipe Nebó, Celso (malacobio), Renato Ferreira, Claudio Lopes e Eduardo Bressan pelos momentos de descontração durante e pós *coffee break*;

A minha estagiária Gabriela Silva que nesses últimos seis meses teve papel importante na conclusão desse projeto;

A Eva Maria que sempre fez presente com palavras de carinho e apoio apesar da distância geográfica que nos separa;

Aos amigos baianos em especial Taliane Soares, Juliana Alves, Hilo Souza, Ricardo Lopes, Luciene Mendes e Marlon Garrido que fizeram sempre presente com palavras de incentivos e carinho;

E a todos não citados que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2. DESENVOLVIMENTO	17
2.1. Evolução da bananeira.....	17
2.2 Melhoramento genético da bananeira.....	22
2.3 Caracterização da ploidia e constituição genômica de bananeira.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Material vegetal	33
3.2 Citometria de fluxo	39
3.3 Extração de DNA.....	40
3.4 Reação de amplificação de ITS (<i>Internal Transcribed Space</i>) de genes ribossomais seguido de análise de restrição (PCR-RFLP; <i>Restriciton Fragment Length Polymorphism</i>).....	41
3.5 Ensaio para verificação da competição por sítio de amplificação e restrição entre sequências do genoma A e B.....	42
3.6 Clonagem e sequenciamento das regiões do ITS1 E ITS4	42
3.7 Construção e validação de novos locos de microssatélites.....	45
3.8 Reação de microssatélites	46
3.9 Análise dos dados da genotipagem com SSR.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Caracterização da ploidia por citometria de fluxo	49
4.2 Caracterização da constituição genômica por PCR-RFLP	54
4.3 Sequenciamento das regiões de ITS1-5,8S-ITS4 de rDNA.....	67
4.4 Desenvolvimento de novos locos de microssatélites.....	79
4.5 Caracterização dos locos ssr utilizados na genotipagem do germoplasma	85
4.6 Seleção de loco/alelo específicos para o genoma a e b no banco ativo de germoplasma de <i>Musa</i> spp.	90
4.7 Diversidade genética entre grupos genômicos.....	94
4.8 Relações genéticas entre os acessos de bananeira	98
4.8.1 Relações genéticas nos acessos triploides	101
4.8.2 Relações genéticas nos acessos diplóides.....	110
5 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS	123

RESUMO

Caracterização molecular de acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa

Os marcadores microssatélites por serem de natureza codominante e multialélica tornam-se ideais para a caracterização, mapeamento e seleção assistida. Os locos microssatélites disponíveis têm sido utilizados efetivamente na caracterização de acessos de bananeira (*Musa*), porém muitos deles têm se mostrado com baixa eficiência de amplificação. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram: desenvolver novos locos de microssatélites, caracterizar 224 acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa em relação à ploidia e constituição genômica empregando abordagens moleculares e estabelecer relações genéticas entre eles. Foram desenvolvidos 50 novos locos de microssatélites dos quais 44 foram polimórficos entre os acessos analisados. Para a caracterização da ploidia dos acessos foi utilizado a citometria de fluxo, e para a definição da composição genômica foram empregados polimorfismo nos genes ribossomiais nucleares (rDNA) e 16 locos microssatélites, que também serviram para estabelecer as relações genéticas entre os acessos. Além disso, foram sequenciados regiões do rDNA de 17 acessos de bananeira para identificação de polimorfismo de base única (SNP) associados ao genoma A e B. A constituição genômica e/ou ploidia determinada por abordagens moleculares confirmou a classificação previamente estabelecida por descritores morfológicos, com exceção dos acessos Marmelo, Pitogo e Pisang Nangka. As regiões do rDNA sequenciadas permitiram identificar 17 SNPs específicos para *M. balbisiana*, que poderão ser utilizados para classificar acessos quanto a constituição genômica. A análise de agrupamento derivada da genotipagem dos acessos com 16 locos de microssatélites subdividiu os genótipos de acordo com a ploidia, constituição genômica e subgrupos de bananeira, enquanto que a abordagem empregando o modelo bayesiano corroborou de forma geral com essa categorização. Foi detectada uma ampla heterogeneidade nos acessos diplóides, onde poucos acessos triplóides tiveram sua ancestralidade definida nos grupos dos acessos diplóides.

Palavras-chave: *Musa* spp; Caracterização; Marcador; Genoma; Ploidia; Diversidade; Melhoramento

ABSTRACT

Molecular characterization of banana accessions from the Embrapa germplasm collection

Microsatellite markers are co-dominant and multiallelic, and the method of choice for genetic characterization, mapping, and assisted selection breeding. Microsatellite loci have been effectively used to characterize banana (*Musa*) accessions, but in some cases they have shown low amplification efficiency. Thus, the objectives of this work were to develop new microsatellite loci; to characterize 224 accessions from the Embrapa germplasm collection of banana for ploidy and genomic constitution, as well as to establish genetic relationships among the accessions. Fifty new microsatellite loci were developed, from which 44 were polymorphic. Flow cytometry was employed to characterize ploidy, while genomic constitution was determined by polymorphism at the nuclear ribosomal gene (rDNA) and 16 microsatellite loci, also used to establish the genetic relationship among the accessions. Additionally, rDNA regions were sequenced from 17 banana accessions to identify specific single nucleotide polymorphism (SNP) associated with the A or B genome. The genomic constitution and/or ploidy determined by various molecular approaches confirmed the previous classification established by morphological descriptors, except for Marmelo, Pitogo and Pisang Nangka. The sequenced rDNA regions allowed to identify 17 SNPs specific for *M. balbisiana*, which could be used to classify accessions according to genomic composition. Clustering analysis derived from accession genotyping using 16 microsatellite loci subdivided genotypes according to ploidy, genomic composition and banana subgroups, while the approach using a Bayesian model corroborated in general terms this categorization. A large heterogeneity of the diploid accessions was detected, which restrict the definition of ancestry of triploid accessions in the diploid accession groups.

Key words: Breeding; Diversity; Genome; Marker; *Musa* spp; Ploidy

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) tem como centro de origem o Sudeste da Ásia e Oeste do Pacífico, sendo cultivada em uma extensa área dos trópicos e subtropicais. Dos centros de origem, a bananeira foi introduzida na África, Américas e sul do Pacífico, onde ganhou popularidade e importância econômica (DE LANGHE et al., 2009; VALMAYOR et al., 2001) constituindo-se numa das principais fontes de alimento para milhões de pessoas (BOONRUANGROD; FLUCH; BURG, 2009).

A maioria das cultivares de bananeira e plátanos originou-se de cruzamento natural entre as espécies selvagens diplóides *M. acuminata* Colla (genoma A) e *M. balbisiana* Colla (genoma B). As diversas espécies e cultivares de bananeira apresentam genoma com vários níveis de ploidia: diplóides (AA, BB e AB), triplóides (AAA, AAB e ABB) e tetraplóides (AAAA, AAAB, AABB e ABBB), com 22, 33 ou 44 cromossomos, respectivamente (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

Como toda cultura, a bananeira é afetada por diversos agentes bióticos, destacando-se principalmente, os fungos que causam a murcha de *Fusarium* ou mal-do-Panamá e as manchas foliares da Sigatoka-amarela e Sigatoka-negra. A busca de cultivares resistentes por meio da seleção dentro dos recursos genéticos existentes nas coleções de germoplasma, ou pela geração de novas cultivares por hibridação é considerada o meio mais eficiente de controle dessas enfermidades (SILVA et al., 1998; SILVA; ALVES, 1999; SILVA et al., 2003).

O programa de melhoramento de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (Cruz das Almas, Bahia, Brasil) conta com um Banco de Germoplasma com aproximadamente 273 acessos de *Musa* de diversos níveis de ploidia e diferentes genomas. Apesar dessa variabilidade disponível, poucos acessos têm sido utilizados efetivamente, pois entre outros aspectos, falta de uma caracterização do germoplasma. A identificação da ploidia e a constituição genômica dos acessos são de grande interesse para os programas de melhoramento, já que as combinações dessas duas características definirão os atributos agrônômicos importantes para a planta e sabor e qualidade dos frutos (ROBISON, 1996; WANG et al., 2007; OSELEBE; TENKOUANO, 2009).

Tradicionalmente, têm-se utilizado para a definição de ploidia a contagem cromossômica (SHEPHERD, 1999), o tamanho e a densidade dos estômatos e o tamanho de grão de pólen (TENKOUANO et al., 1998a). Para a caracterização da constituição genômicas A e B são utilizados 15 descritores morfológicos (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). Entretanto, esses métodos são trabalhosos e alguns imprecisos, quase impraticáveis em grandes populações e sofrem influência ambiental. Alternativamente, os métodos mais modernos, como citometria de fluxo e marcadores moleculares têm se mostrado úteis para este fim.

A citometria de fluxo é um método rápido, capaz de detectar pequenas variações no conteúdo de DNA e eficiente na determinação da ploidia no gênero *Musa* (DOLEZEL et al., 1997; DOLEZEL et al., 1999; PILLAY et al., 2006). Para a definição da constituição genômica, os marcadores baseados em rDNA como PCR-RFLP têm-se mostrados promissor (NWAKANMA et al., 2003a). Porém, este tipo marcador não permite a exploração da variabilidade ou relações genéticas entre os acessos. Por outro lado, os marcadores de microssatélites (*Simple Sequence Repeat*, SSR) que são co-dominantes, altamente polimórficos e de alta capacidade informativa quando locos apresentam alelos distintos e com genomas-específicos. Estes marcadores têm sido utilizados para a caracterização da diversidade em bananeira e alguns locos permitem a identificação da constituição genômica (A e/ou B) (CRESTE et al., 2003; CRESTE et al., 2004; JESUS et al., 2006). Embora alguns locos microssatélites estejam disponíveis (JARRET et al., 1994; LAGODA et al., 1998; BUHARIWALLA et al., 2005; CRESTE et al., 2006), eles têm apresentado baixa eficiência na amplificação (CRESTE et al., 2003; ORIERO et al., 2006; NING et al., 2007), uma vez que diversos deles foram desenvolvidos baseados em acessos das espécies selvagens (CROUCH et al., 1999a; CRESTE et al., 2006). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos locos com genoma específico (A e ou B) com alto polimorfismo.

Além do uso na caracterização, os novos locos SSR poderão ser utilizados no mapeamento genético visando identificar marcas associadas a caracteres de produção e a genes de resistência às sigatokas negra e amarela, o que poderia auxiliar a seleção precoce, acelerando os progressos no melhoramento genético convencional, além de reduzir custos e trabalhos requeridos na instalação de ensaios de campo. Porém, as

dificuldades genéticas inerentes a bananeira (esterilidade e incompatibilidade) (SILVA et al., 1998) e a baixa viabilidade dos híbridos desenvolvidos em virtude das inversões e translocações cromossômicas e a segregação de alelos inviáveis (FAURÉ et al., 1993; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007) têm dificultado o uso dos SSR em mapeamento de QTLs. Recentemente, com o desenvolvimento da metodologia de mapeamento por associação que se baseia na utilização de populações naturais ou de melhoramento para identificação de marcador associado a caracteres de interesse (FLINT-GARCIA; THORNSBERRY; BUCKLER IV, 2003; SCHNELL et al., 2005; KRAAKMAN et al., 2006; MACKAY, POWELL, 2007; MARCANO et al., 2007) sugere mais uma possibilidade da utilização desses novos locos.

Portanto, a caracterização molecular dos acessos do banco de germoplasma de bananeira da Embrapa permitirá ao programa de melhoramento elaborar um banco de dados moleculares, que será de grande utilidade para intercâmbio de informações entre germoplasmas e para ações de melhoramento. As informações sobre ploidia e constituição genômica devem ser validadas com técnicas alternativas (citometria de fluxo e uso de marcas moleculares genoma-específico). Para avaliar a aplicação do conceito de mapeamento por associação em populações de bananeiras diplóides ou na coleção de germoplasma é necessário obter um número considerável de marcadores altamente polimórfico e informativo como os microssatélites. Além disso, a disponibilidade de grande número de locos microssatélites resultará em contribuições importantes para o programa de melhoramento, seja por meio do seu emprego na caracterização do germoplasma e/ou na seleção assistida.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Evolução da Bananeira

A cultura da banana (*Musa* spp.) são ervas gigantes da classe das monocotiledôneas, ordem Scitamineae, família Musaceae. O gênero *Musa* está dividido em quatro subgêneros ou seções: *Eumusa* e *Rhodochlamys* (com $2n = 22$), *Callimusa* e *Australimusa* (com $2n = 20$). Os subgêneros *Callimusa* e *Rhodochlamys* isoladamente não produzem frutos comestíveis, sendo usadas como plantas ornamentais, e no subgênero *Australimusa*, encontra-se a espécie *M. textilis*, muito utilizada para extração de fibras das bainhas vasculares (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

A maioria das espécies cultivadas e de interesse comercial encontra-se no subgênero *Eumusa* e compreendem diplóides ($2n = 22$), triplóides ($2n = 3x = 33$) e tetraplóides ($2n = 4x = 44$) estéreis e que produzem frutos por partenocarpia e originaram-se de hibridações intra e interespecíficas entre duas espécies selvagens seminíferas, *M. acuminata* (genoma A) e *M. balbisiana* (genoma B), resultando em genótipos com grupo genômico AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (Figura 1; SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). Além dos grupos genômicos, foi estabelecido o termo subgrupo para denominar um complexo de cultivares com características comerciais de identidade específica, originárias por meio de mutações de uma única cultivar original (SHEPHERD et al., 1984), como no caso o subgrupo Cavendish, grupo AAA e os subgrupos Prata e Terra do grupo AAB no Brasil (Figura 1).

Além da participação das espécies *M. acuminata* e *M. balbisiana*, também houve a contribuição de outras espécies, como *M. angustigemma* (genoma T) do subgênero *Australimusa* e da *M. schizocarpa* (genoma S) do subgênero *Rhodochlamys*. O envolvimento dessas seções em algumas cultivares da Nova Guiné foi comprovada por GISH (*genomic in situ hybridization*), onde se identificaram as combinações AS, AAS, ABBS, AAT e ABBT em bananeira (D'HONT et al., 2000).

A existência do subgênero *Rhodochlamys* é questionada por alguns autores. Por exemplo, Simmonds (1954) observou que *M. laterita* cruza mais facilmente com *M. acuminata* do que com espécie do próprio subgênero. Essa mesma espécie também apresentou alelos em comum com *M. acuminata* ssp. *burmannica* e *M. acuminata* ssp.

siamea (DE LANGHE et al., 2009; PERRIER et al., 2009). Para Nwakanma et al. (2003b) que trabalharam com marcadores baseados em DNA de mitocôndria e cloroplastos concluíram que esses dois subgêneros deveria ser fundido em um único.

Em termos da variabilidade genética a espécie *M. acuminata* apresenta ampla diversidade e várias subespécies e tipos partenocárpicos tem sido relatado (LYSÁK et al., 1999), enquanto em *M. balbisiana* poucos estudos têm sido realizados, sabe no entanto que, quando comparada com *M. acuminata* a espécie apresenta baixa variabilidade. Eventos como inserções, deleções, duplicações e translocações parecem ser mais frequentes em *M. acuminata* (FAURÉ et al., 1993; PERRIER et al., 2009). Aliado a isso, Cheung e Town (2007) observaram abundância de sequência repetitivas e de retrotransposons na biblioteca de BAC (*bacterial artificial chromosome*) desenvolvida da 'Calcutta 4' (AA) o que pode justificar as diferenças genéticas entre essas duas espécies.

As subespécies de *M. acuminata* incluem *burmannica*, *burmannicoides*, *malaccensis*, *truncata*, *microcarpa*, *siamea*, *zebrina*, *banksii* e *errans* (Figura 2), confinadas a regiões geográficas específicas (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). O reconhecimento de algumas dessas subespécies ainda não estão bem elucidadas, e não há um consenso comum entre os autores sobre o verdadeiro número delas que existem naturalmente (UDE et al., 2002).

Por exemplo, Carreel et al. (2002) utilizando marcadores mitocondrial e de cloroplastos identificaram padrões específicos para a maioria das subespécies citadas, à exceção da *burmannica* e da *burmannicoides* que não puderam ser diferenciadas. Wong et al. (2002), utilizando marcadores AFLP identificaram diferenças entre as subespécies *malaccensis*, *truncata*, *microcarpa*. Para Perrier et al. (2009), as subespécies selvagens de *M. acuminata* podem ser classificadas em quatro subespécies baseadas em marcadores RFLP e SSR, sendo perfeitamente discriminadas as subespécies *banksii*, *zebrina*, *burmannica/burmannicoides/siamea* e *malaccensis*. Essa última, apesar de apresentar um padrão citoplasmático típico, se agrupa com muitos acessos das subespécies *burmannica/burmannicoides/siamea*. Morfologicamente a ssp. *errans* foi classificada como sendo da subespécie *banksii*, posteriormente foi classificada com uma outra subespécie de *M. acuminata* (VALMAYOR, 2001) enquanto a subespécie *truncata* morfologicamente foi inserida na subespécie *microcarpa* ou *malaccensis* porém estudos com marcadores RFLP mostrou que trata-se realmente de uma subespécie (CARREEL et al., 1994). Perrier et al. (2009) não encontraram uma perfeita separação quando se utiliza marcadores SSR entre subespécies *truncata*, *errans* e *microcarpa*.

Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie *M. balbisiana* e das subespécies de *M. acuminata* (linhas cheias) e os subgêneros, *Auralimusa* (elipse vermelho), *Callimusa* (elipse amarelo) e *Rhodochlamys* (elipse azul)

Acredita-se que a evolução da bananeira selvagem seminífera para espécies cultivadas se deu provavelmente pela acumulação de esterilidade e aquisição de partenocarpia. Essas duas características foram selecionadas pelo homem dando origem as cultivares estéreis (CARREEL et al., 1994; RABOIN et al., 2005). A partenocarpia está associada à *M. acuminata*, enquanto a participação da espécie *M. balbisiana* é questionável devido à existência ou não de cultivares partenocárpicas como o genoma BB ou BBB (CARREL et al., 1994).

Um dos fatores apontado por Perrier et al. (2009) para surgimento de esterilidade, provavelmente se deve à origem dos diplóides cultivados que em sua maioria são híbridos entre subespécies distintas de *M. acuminata* com diferenças estruturais de seu genoma (LANAUD et al., 1992; PERRIER et al., 2009). Shepherd (1999) analisando células em meiose observou que acessos dentro de uma mesma subespécie não mostravam heterozigossidade estrutural, ou seja, os cromossomos homólogos apresentavam pareamento correto, entretanto, híbridos entre subespécies apresentavam. Essa heterozigossidade estrutural pode causar ou impedir uma meiose regular, levando a quebras e perdas de fragmentos cromossômicos sendo, portanto um fator importante para causar a esterilidade total ou parcial, tanto masculina como

feminina (RABOIN et al., 2005; PERRIET et al., 2009). A seleção praticada pelos humanos deve ter ocorrido em cultivares que apresentava certa esterilidade e com desenvolvimento suficiente de polpa, que passaram a ser selecionadas e dispersas vegetativamente e ao longo do tempo cruzavam com outras formas. A origem das cultivares triplóides provavelmente envolve vários diplóides cultivados, parcialmente estéreis e que produziam gametas não reduzidos (LANAUD et al., 1992) e que foram cruzando com diplóides fértil ou semi-fértil produzindo gametas haplóides (RABOIN et al., 2005).

Recentemente, Boonruangrod, Fluch e Burg (2009) estudando o polimorfismo de sequências de ETS (*external transcribed spacer*) de rDNA de 10 acessos selvagens, representando oito subespécies, identificaram a participação das subespécies *microcarpa*, *banksii* e *errans* em 23 cultivares entre as 35 analisadas. Nesse trabalho, foi também observado que alguns acessos do subgrupo Cavendish e Gros Michel apresentam múltiplas ancestralidades indicando alto grau de hibridação nesses genótipos. Enquanto Carreel et al. (2002) identificaram a participação das subespécies *banksii* e *errans* em muitos diplóides e triplóides cultivados utilizando dados de marcadores RFLP de mitocôndrias e cloroplastos.

2.2 Melhoramento genético da bananeira

Os programas de melhoramento visam obter híbridos triplóides ou tetraplóides, que apresentem resistência as principais pragas e doenças e com frutos com características desejáveis para atender o mercado. No Brasil, as bananeiras comerciais disponíveis para o consumo são, na sua maioria, cultivares triplóides e do grupo AAB 'Prata', 'Maçã', 'Mysore' e 'Terra', as quais produzem frutos por partenocarpia sem sementes. A maioria das cultivares apresenta porte elevado e são afetadas por diversas doenças como o mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola*), Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*), Moko (*Ralstonia solanacearum*) e pragas como os nematóides (*Radopholus similis*) e a broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*).

A busca de cultivares por meio da seleção dentro dos recursos genéticos

existentes nas coleções de germoplasma representa a primeira abordagem, para a identificação de variedades resistentes. Mas nem sempre é possível encontrar os indivíduos desejados e nesse caso há necessidade de geração de novas cultivares por hibridação. Ambos os métodos são considerados eficientes para controle de pragas e doenças (SILVA et al., 1998; SILVA et al., 2003; DAMODARAN; KUMAR; KAVINO, 2009).

O melhoramento genético da bananeira baseia-se principalmente no desenvolvimento de híbridos tetraplóides derivados de cruzamentos entre alguns poucos cultivares triplóides férteis (genitor feminino) e diplóides melhorados (doador de pólen). A variabilidade genética se concentra entre as diversas formas selvagens das espécies e subespécies diplóides de *M. acuminata* que são usadas como genitores masculinos no melhoramento, e devem contribuir com resistência a doenças e características agronômicas favoráveis (OSELEBE; TENKOUANO; PILLAY, 2006). Híbridos tetraplóides agronomicamente superiores e resistentes às sigatokas e mal-do-Panamá tem sido obtidos (SILVA et al., 2001; OSELEBE; TENKOUANO; PILLAY, 2006; DAMODARAN; KUMAR; KAVINO, 2009).

Por essa razão, o desenvolvimento de diplóides melhorados é considerado um importante componente no melhoramento genético. Sendo assim, o melhoramento convencional se inicia com a hibridação e seleção de recombinantes em nível diplóide, cujo objetivo é concentrar, em um mesmo genótipo (genitor masculino), um maior número de caracteres desejáveis, removendo eventuais defeitos inerentes dessas bananas não comerciais. Diplóides melhorados são então cruzados com cultivares triplóides, que apresentam fertilidade parcial, para produção de híbridos tetraplóides (SILVA et al., 1998). Nesse processo supõe-se que nos diplóides formam-se gametas reduzidos (n) enquanto nos acessos triplóides formam gametas não reduzidos ($3n$) dando origem aos híbridos tetraplóides primários. Os híbridos tetraplóides podem apresentar fertilidade masculina e feminina, reduzindo assim a qualidade da fruta devido à presença de sementes na polpa. Assim, uma outra possibilidade seria o desenvolvimento de híbridos triplóides secundários derivados do cruzamento entre acessos diplóides que produzem gametas reduzidos (n) com cultivares ou híbridos tetraplóides com gametas ($2n$) (TENKOUANO; ORTIZ; VUYLSTEKE, 1998).

O processo de melhoramento é lento devido aos problemas relacionados à meiose em bananeira bem como ao limitado conhecimento desse processo e da genética da espécie, que dificulta prever o produto resultante de um cruzamento (OSELEBE; TENKOUN, PILLAY, 2006). Apesar dos híbridos tetraplóides e triplóides secundários serem desejados, no melhoramento da bananeira, na hibridação são também geradas progênes diplóides, triplóides, tetraplóides e aneuploides e isso tem implicações na performance do material em campo, pois a ploidia influencia nos caracteres morfológicos, tais como altura de planta, peso do cacho (OSELEBE; TENKOUANO; PILLAY, 2006).

A estratégia de obtenção de diplóides superiores, que são posteriormente utilizados na produção de cultivares resistentes às doenças e com características agronômicas desejáveis é usada no melhoramento genético de bananeira de algumas empresas. O programa FHIA (*Fundación Hondureña de Investigación Agrícola*) iniciado em 1959, já obteve uma série de híbridos poliplóides tolerantes ou resistentes a Sigatoka negra e ao mal-do-Panamá, a exemplo, as cultivares FHIA-01', 'FHIA-02', 'FHIA-18' para consumo *in natura* e 'FHIA-21' e 'FHIA-22' para serem consumidas cozidas ou fritas, que são cultivados em vários locais no mundo (JANICK; PAULL, 2008). O IITA (*International Institute of Tropical Agriculture*) da África desde sua criação em 1980 tem desenvolvido híbridos de plátanos e banana como os da série TMPx (plátanos), TMBx (banana) e triploides secundários (TM3x). Além desses, existem os programas também da Índia (*Tamil Nadu Agricultural University*) e o do Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica para o Desenvolvimento (CIRAD) em Guadalupe e Camarões.

No Brasil, o programa de melhoramento genético da bananeira iniciou-se em 1982 pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Os híbridos tetraplóides desenvolvidos se concentram em genitores triploides do subgrupo 'Prata' e cultivares com qualidades similares a 'Maçã', empregando o triploide 'Yangambi'. Cultivares do subgrupo 'Cavendish' e Maçã são via de regra estéreis. Mais recentemente, a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical também têm direcionado o programa para a produção de híbridos triploides secundário. Apesar do número reduzido de sementes que é produzida nos cruzamentos entre diplóides e triploides, a Embrapa têm desenvolvido híbridos

superiores com maior produtividade e resistentes às doenças, tais como os híbridos 'Pacovan Ken', 'Prata Graúda', 'Preciosa', 'Garantida', 'Caprichosa' e a 'Tropical'. Mais recentemente, foram recomendadas as cultivares Vitória, Japira e Preciosa (SILVA et al., 2003).

As dificuldades resultantes da baixa, e em alguns casos, ausência da produção de sementes em cruzamentos de bananeira, é potencialmente possível de se contornar, mediante o uso de tecnologias não convencionais de melhoramento, entre elas estão às técnicas de hibridação somática, duplicação de cromossomos, mutação e transformação genética.

A hibridação somática é uma estratégia promissora, que permite a introdução de resistência/tolerância a pragas e outras características de interesse encontradas em bananas diplóides (AA), nas cultivares triplóides, principalmente as estéreis. Matsumoto et al. (2002) relataram a obtenção de híbridos somáticos entre a cultivar 'Maçã' e o diplóide 'Lidi', ressaltando o potencial desta técnica como ferramenta complementar para os programas de melhoramento.

Triplóides secundários podem ser produzidos numa pequena eficiência através do cruzamento de triplóides primários com diplóides melhorados. Uma alternativa do procedimento para a obtenção de triplóides secundários será a indução da duplicação de cromossomos de diplóides promissores, utilizando os agentes antimitóticos colchicina e orizalina (GANGA; CHEZHIYAN, 2002). Os autotetraplóides induzidos artificialmente podem ser utilizados para o cruzamento com outros diplóides melhorados, gerando triplóides secundários que apresentem características de resistência às doenças e outras características agrônômicas superiores (HAMILL; SMITH; DODD, 1992).

A mutagênese *in vitro* é uma técnica biotecnológica usada para alterar características agrônômicas governadas por um ou poucos genes, em genótipos de grande interesse, sendo considerada como um ajuste fino de uma variedade (PEREZ PONCE, 1998). Trabalhos já realizados utilizando a indução de mutação *in vitro* com o uso de raios gama em ápices caulinares de bananeira, indicaram um maior aumento na variabilidade genética, quando comparada com a taxa de variação somaclonal (TULMANN NETO; DOMINGUES, 1990; DOMINGUES et al., 1994). A mutação usando raios gama, constitui-se em uma nova linha de trabalho, recentemente incrementada no

melhoramento de bananeira da Embrapa, visando à obtenção de plantas com porte baixo nas cultivares 'Pacovan' (AAB) e 'Pacovan Ken' (AAAB) (SANTOS-SEREJO et al., 2004).

A transformação genética de bananeira via bombardeamento de partículas e por *Agrobacterium tumefaciens* foram conduzidos e resultados promissores têm sido obtidos, a exemplo Pei et al. (2005) obtiveram bananeira transgênicas resistente ao *Fusarium oxysporum* (FocR4) usando o gene da lisozima de humanos, que inibe o desenvolvimento desse fungo enquanto Kumar et al. (2005) obtiveram plantas transgênicas expressando o gene *HBsAg* (*Hepatitis B Surface Antigen*), revelando o potencial desta cultura para a produção de vacina contra a hepatite B. Embora essas técnicas até então não tenha gerado nenhuma variedade comercial mostra-se promissora para os casos onde o melhoramento convencional é difícil de se realizar.

2.3 Caracterização da ploidia e constituição genômica de bananeira

A avaliação da variabilidade genética presente em um germoplasma, bem como algumas características dos acessos é importante para a definição das estratégias mais adequada de melhoramento (UMALI; NAKAMURA, 2003). Aliado a isto, o conhecimento das relações entre e dentro de acessos selvagens, acessos diplóides e triplóides é requerido para otimizar a identificação de parentais diplóides que possam ser melhor utilizados nos programas de melhoramento (CARREEL et al., 2002).

O BAG Embrapa é formado na sua maioria por acessos diplóides selvagens e cultivados (AA) e triplóides AAB cujos representantes mais comuns são cultivares 'Prata', 'Pacovan', 'Prata Anã', 'Maçã', 'Mysore' e 'Terra' seguidos dos AAA representados pelos 'Caru Verde', 'Caru Roxa', 'São Tomé', 'Nanica', 'Nanicão' e 'Grande Naine' (SILVA et al., 1999a). E em baixa frequência estão os acessos dos subgrupos AAAB, ABB, BB e AAAA. As informações disponíveis destes acessos provem de informações de passaporte derivadas de descritores morfológicos e pouco se sabe sobre a real ploidia dos acessos ou constituição genômica.

A definição do nível de ploidia e da constituição genômica destes acessos possui um importante papel na classificação das bananas e ações de melhoramento, já que

muitas características estão associadas a elas. A ploidia influencia a fenologia e parâmetro de produção sendo que diplóides apresentam porte menor, frutos pequenos e com baixo rendimento de polpa e, frequentemente com sementes, enquanto cultivares triplóides e tetraplóides correspondem à maioria dos cultivares comerciais disponíveis, apresentam porte mais elevado, frutos maiores e sem sementes (OSELEBE; TENKOUANO, 2009). Aliado a isso, caracteres de resistência, menor peso do cacho, dias da floração a colheita parece ser mais previsivelmente herdados dos diplóides (TENKOUANO et al., 1998b; OSELEBE; TENKOUANO; PILLAY, 2006).

A característica adocicada e de fácil palatabilidade está associado ao genoma A de *M. acuminata* (SIMMONDS, 1962). Acredita-se que genes conferindo robustez, tolerância a seca, resistência a doenças, valor nutricional (WANG et al., 2007; ROBISON, 1996). Nos plátanos a consistência da polpa dura, maior teor de amido, menos doce e pouco palatável quando consumida *in natura* também é atribuída à presença do genoma B de *M. balbisiana* (SIMMONDS, 1962). A suscetibilidade de bananeira ao BSV (*leaf streak virus*) parece estar ligada também à presença do genoma B (GEERING et al., 2005).

Aliado a caracterização deficiente dos acessos existentes, os programas de melhoramento de bananeira utilizam diplóides melhorados para a obtenção de tetraplóides (triplóides x diplóides) e triplóides secundários (tetraplóides x diplóides) (SILVA et al., 2003), considerando uma meiose normal (produção de gametas n) nos diplóides. Porém, pode haver também a formação de gametas $2n$ nos diplóides (PILLAY et al., 2006) e triplóides (CROUCH et al., 1998). Dessa forma, progênies diplóides, triplóides, tetraplóides e pentaplóides podem ser geradas e certos genótipos desenvolvidos pelos programas de melhoramento podem ter sua ploidia definida de forma errônea. Torna-se essencial uma correta caracterização dos produtos desses cruzamentos para um perfeito reconhecimento dos híbridos promissores como triplóides e tetraplóides ainda na fase inicial de desenvolvimento, garantindo que apenas indivíduos com características desejáveis sejam avaliados em etapas posteriores (OSELEBE; TENKOUANO; PILLAY, 2006).

A determinação da ploidia em bananeira tem sido feita mediante a contagem dos cromossomos (SHEPHERD, 1999), porém esse método é trabalhoso e dificultado pelo

pequeno tamanho dos cromossomos (DOLEZEL et al., 1998; PILLAY et al., 2001), e sujeito a erros devido a possibilidade de contagem de satélites quebrados na preparação das lâminas como mini-cromossomos (DOLEZEL, 2001). Alternativamente, tem sido adotado o tamanho e densidade dos estômatos, o tamanho do grão de pólen (TENKOUANO et al., 1998a) e densidade de cloroplastos por células guardas (OSELEBE; TENKOUANO; PILLAY, 2006). Todas essas metodologias baseiam no princípio de que o tamanho da estrutura celular tende aumentar com o aumento do nível de ploidia. No entanto, esses métodos não são satisfatórios por sofrerem influência do ambiente e são impraticáveis para o *screening* de grandes populações (PILLAY et al., 2001).

Para a definição da constituição genômica, Simmonds e Shepherd (1955) propuseram 15 características morfológicas em um sistema de notas que serve para quantificar a contribuição dos genomas A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*) na espécie. Esse sistema é complicado, pois requer a prévia determinação da ploidia antes da determinação da constituição genômica e é restrito apenas aos genomas A e B, é avaliado apenas na fase adulta, sob influência ambiental (PILLAY et al., 2000, PILLAY et al., 2001) e de difícil aplicação em indivíduos com parentesco em comum, como ocorre em híbridos de bananeira (JESUS et al., 2009). Dentre as técnicas para análise do genoma de *Musa* destacam-se a citometria de fluxo, citogenética molecular (FISH e GISH) e os marcadores moleculares.

A citometria de fluxo é um método rápido, que não requer células exclusivamente em divisão e é capaz de detectar pequenas variações no conteúdo de DNA (DOLEZEL et al., 1997). A metodologia se baseia na medida de conteúdo de DNA (2C) dos núcleos no ciclo celular da mitose como meio de inferência da ploidia. No ciclo celular a célula apresenta quatro fases distintas: G1, S, G2 e M (mitose). No fase G1, a célula diplóide apresenta o conteúdo de DNA igual a 2C, onde o C denota o conteúdo de DNA em uma célula haplóide, assim nesta fase o conteúdo de DNA possui duas cópia de cada gene. Na fase seguinte (S), há síntese de DNA (duplicação dos cromossomos) e a célula passa para a fase G2, onde o conteúdo de DNA passa a 4C. Na fase final da mitose são formadas as células-filhas, cujo conteúdo de DNA passa novamente a 2C (LOUREIRO, 2007; LOUREIRO; SANTOS, 2009).

A citometria de fluxo é um método preciso para a determinação do nível de ploidia, especialmente em populações de plantas de tamanho variado do genoma (DOLEZEL et al., 1997; DOLEZEL; BARTOS, 2005). No gênero *Musa*, há diferenças significativas para o tamanho entre os genomas A (*M. acuminata*; 1,11 pg/2C), B (*M. balbisiana*; 1,03 pg/2C), S (*M. schizocarpa*; 1,18 pg/2C) e T (*M. textilis*; 1,27 pg/2C) (D'HONT et al., 1999). Avaliando os acessos do banco do INIBAP, Dolezel et al. (2001) conseguiram detectar ploidias distintas daquelas relatadas previamente para o banco, enquanto Roux et al. (2003) conseguiram detectar instabilidade meiótica em plantas derivadas de células embriogênicas em suspensão. Assim, essa técnica é de grande utilidade para programas de melhoramento visando identificar precocemente a ploidia dos híbridos desenvolvidos.

As técnicas de citogenética molecular FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) e GISH (*Genomic In Situ Hybridization*) têm sido utilizadas para maior compreensão da organização do genoma. FISH envolvendo hibridação *in situ* de sequências de DNA, sendo muito útil para mapeamento físico de genes e para estudar a organização dos genomas de plantas (DOLEZEL, 2001). Sondas FISH tem sido obtida e utilizada com sucesso em *Musa* (DOLEZELOVÁ et al., 1998; OSUJI, 1998), porém número e a dispersão nos cromossomos ainda não foi suficiente para serem utilizadas como marcadores citogenéticos (DOLEZEL, 2001). A técnica de GISH permite diferenciar a composição genômica de uma espécie alopoliplóide. D'Hont et al. (2000) avaliaram dez cultivares de bananeira de constituição genômica e níveis de ploidia distintos (estabelecidas por descritores morfológicos) e, dentro dos quais alguns com constituição genômica duvidosa, constataram que a exata estrutura de vários híbridos interespecíficos envolvendo os genomas A, B, S e T podem ser revelada por GISH. Porém, também foram encontradas similaridades entre os genomas A e B (D'HONT et al., 2000; D'HONT, 2005). Aliado a isso, esta técnica é complexa e requerem cromossomos bem individualizados nas lâminas, preparação de sondas marcadas, desnaturação dos cromossomos e da sonda, hibridização, lavagem e detecção do sinal (TRASK, 1991). Isto sugere a necessidade de outras ferramentas, como os marcadores moleculares, para auxiliar na identificação dos genomas A e B de *Musa*.

Embora vários tipos de marcadores tenham sido utilizados para a caracterização do gênero *Musa*, poucos foram úteis para diferenciar os genomas A e B de bananeira. Destacam-se para esse fim os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites ou SSR, PCR-RFLP (*PCR Product Restriction Fragment Length Polymorphisms*) de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e marcadores baseados em sequências de retrotransposons como IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*).

Os marcadores RAPD baseiam-se na utilização de um *primer* que irá se anelar arbitrariamente à sequência complementar no DNA, sendo um marcador dominante e de custo reduzido. Utilizando essa técnica, Pillay, Nwakanma e Tenkouano (2000) conseguiram a produção de perfil molecular característico que diferenciou os genomas A e B de *Musa*. Porém, apesar da ampla utilização, esses marcadores apresentam limitações devido à baixa repetibilidade e transferibilidade, que torna seus resultados poucos confiáveis.

Alternativamente, os marcadores microssatélites ou SSR têm sido extensivamente utilizados para a caracterização de espécies devido ao fato de ser de natureza co-dominante, de fácil reprodução e interpretação dos dados (CRESTE et al., 2003). Aliado a isso, os microssatélites podem ser semi-automatizados, o que aumenta a capacidade de processamento de dados, uma vez que possibilita analisar até três produtos de amplificação numa mesma faixa de tamanho ou amplitude de tamanhos diferentes, aumentando assim o número de marcas a serem analisadas (GUIMARÃES et al., 2004). Para o gênero *Musa* alguns locos microssatélites foram utilizados para a caracterização da bananeira (JARRET et al., 1994; KAEMMER et al., 1997; LAGODA et al., 1998; BUHARIWALLA et al., 2005; CRESTE et al., 2006), sendo que alguns têm se mostrado eficientes para a identificação dos genoma A e B dessa espécie. Creste et al. (2003) conseguiram com uso de locos microssatélites da série AGMI (LAGODA et al., 1998) e Ma (CROUCH et al., 1998) identificar bandas específicas para o genoma A e B, resultados confirmados por outros grupos (JESUS et al., 2006). Uma biblioteca genômica construída a partir da cultivar diplóide 'Ouro' (*M. acuminata*) permitiu isolar novos 23 locos de microssatélites dentre os quais seis específicos para o genoma A e/ou B, e outros dois promissores para a quantificação de ploidia (CRESTE et al., 2006).

A avaliação de um número maior de locos SSR poderá identificar novos locos/alelos genoma específicos com grande potencial de uso na caracterização e/ou estudo comportamento genético dos genomas A e B de *Musa* spp.

Genes ribossomais (rDNA) são arranjados em unidades com múltiplas cópias repetidas em linha dos genes rRNA dos transcritos 18S - 5.8S - 26S. Cada unidade de transcrição consiste de regiões conservadas separadas por regiões menos conservadas denominadas de ITS (*internal transcribed spacer*) e flanqueadas por IGS (*non - transcribed gene spacer*) que contém o sinal para a iniciação e terminação da transcrição (LANAUD et al., 1992; BOONRUANGROD; FLUCH; BURG, 2009; BARTOS et al., 2005). Digerindo o produto da amplificação destas regiões com a enzima de restrição *RsaI*, Nwakanma et al. (2003a) descreveram fragmentos de 530 pb específicos para o genoma A, e dois fragmentos de 350 pb e 180 pb específicos para o genoma B. Ao contrários das outras, essa metodologia mostrou-se promissora para identificação de acessos como dupla dosagem do genoma B. Também essa região tem sido sequenciada para estabelecer relações evolucionárias intra e interespecíficas em bananeira (BOONRUANGROD; FLUCH; BURG, 2009).

O uso de sequências de retrotransposons como marcador molecular tem se mostrado promissor para a caracterização de germoplasma (KUMAR; HIROCHIKA, 2001). Os retrotransposons são elementos genéticos móveis que constituem na maior parte do genoma nuclear de plantas (KUMAR; BENNETZEN, 1999; KUMAR; HIROCHIKA, 2001). Estes elementos apresentam-se em alto número de cópias e são dispersos nos cromossomos, fazendo deles, em especial os que possuem sequências longas repetidas nas suas extremidades, ideais para a obtenção de marcadores moleculares (KALENDAR et al., 1999; TEO et al., 2005; KALENDAR; SCHULMAN, 2006; NATALI et al., 2007). Aliado a isso, esses marcadores, ao contrário dos microssatélites, podem ser transferidos de uma espécie para outra conforme descrito por Teo et al. (2005), que utilizou retrotransposons de cevada para a caracterização de bananeira. O sequenciamento de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) de *Musa* revelou uma abundância de sequências de retrotransposons e de microssatélites (CHEUNG; TOWN, 2007). Essas sequências disponíveis, bem como o isolamento de novas famílias de retrotransposons (PEARCE et al., 1999; NATALI et al., 2007)

poderiam ser usadas para desenvolver IRAPs (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*), que detectam polimorfismos entre retrotransposons (KALENDAR et al., 1999). Marcadores IRAP foram empregados com sucesso na caracterização da bananeira, identificação da constituição genômica dessa espécie (NAIR et al., 2005; TEO et al., 2005) e na identificação de novos retrotransposons em plantas advindas de cultura de tecido (TEO et al., 2005).

O DArT (*Diversity Arrays Technology*) que se baseia em hibridização (DNA - DNA) de microarranjos para detectar a presença ou ausência de determinado fragmentos em representações do genoma (WENZL et al., 2004) tem se mostrado uma outra metodologia bastante promissora pelo grande número de marcadores gerados e já foram elaborados *chips* para *Musa* (AMORIM et al., 2009; RISTERUCCI et al., 2009), que representa uma diminuição significativa nos custos da técnica e com grande potencial para estudos de caracterização de uso em seleção assistida por marcadores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Para a caracterização do germoplasma, foram analisados 224 acessos de bananeira (Tabela1). O BAG é composto de vários acessos com distintas constituições genômica vindos de diferentes estados e países (Tabela 1). As únicas informações disponíveis nesse banco são as origens dos acessos e as constituições genômicas com base em informação de passaporte. A maioria dos acessos ainda não foi caracterizada molecularmente. Informações dos subgrupos existem apenas para os acessos que são rotineiramente usadas nos programas de melhoramento.

Tabela 1 - Acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical utilizados na caracterização da composição genômica e ploidia por microssatélites, estabelecida previamente por caracterização morfológica e/ou informação de origem (passaporte)

(continua)

Nº	Acesso	Genoma ²	Subgrupo/ Subespécie ¹	Procedência ²
1	<i>Musa basjoo</i>	Musa	-	França
2	Piraí	BB(S)		Brasil
3	Butuhan	BB(S)	balbisiana	Filipinas
4	BB Panamá	BB(S)	balbisiana	Panamá
5	Balbisiana França	BB(S)	balbisiana	França
6	Musa Balbisiana	BB(S)	balbisiana	Brasil
7	TIP	ABB		Tailândia
8	Saba Honduras	ABB	saba	Honduras
9	Saba	ABB	saba	Costa Rica
10	Prata Zulu	ABB		Brasil
11	Poteau Nain	ABB	bluggoe	França
12	Pelipita	ABB	pelipita	Honduras
13	Namwa Khom	ABB	pisan awak	Tailândia
14	Namwa Daeng	ABB		Tailândia
15	Muisa Tia	ABB	pisan awak	França
16	Monthan	ABB		França
17	Ice Cream	ABB		Havaí
18	Ice Cream	ABB		França
19	Gia Hui	ABB	pisan awak	França

Tabela 1 - Acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical utilizados na caracterização da composição genômica e ploidia por microssatélites, estabelecida previamente por caracterização morfológica e/ou informação de origem (passaporte)

(continuação)

Nº	Acesso	Genoma ²	Subgrupo/ Subespécie ¹	Procedência ²
20	Figo Cinza	ABB		Brasil
21	Espermo	ABB	bluggoe	Colômbia
22	Champa Madras	ABB	bluggoe	França
23	Cachaco	ABB	bluggoe	Colômbia
24	Cacambou Naine	ABB	bluggoe	Equador
25	Benedetta	ABB	saba	França
26	Abuperak	ABB		França
27	IAC	AB(H)		Brasil
28	Yangambi N. 2	AAB	silk (maçã)	França
29	Warik	AAB		Nova Guiné
30	Walha	AAB	pome (prata)	Havaí
31	Ustrali	AAB		Indonésia
32	Umpako	AAB		Nova Guiné
33	Thap Maeo	AAB		Brasil
34	Trois Vert	AAB		França
35	Tomnam	AAB		Nova Guiné
36	Tipo Velhaca	AAB		Brasil
37	Tip Kham	AAB		Tailândia
38	Thong Ruong	AAB		Tailândia
39	Terrinha	AAB	plátano	Brasil
40	Terra S/ Nome	AAB	plátano	Brasil
41	Tai	AAB		Tailândia
42	Sempre Verde	AAB		Brasil
43	Saney	AAB		Nova Guiné
44	Samurá B	AAB		Brasil
45	Red Yade	AAB	plátano	França
46	Pulut	AAB		Indonésia
47	Pratão	AAB	pome (prata)	Brasil
48	Prata Sta. Maria	AAB	pome (prata)	Brasil
49	Prata Ponta Aparada	AAB	pome (prata)	Brasil
50	Prata Maceió	AAB	pome (prata)	Brasil
51	Prata Comum	AAB	pome (prata)	Brasil
52	Prata IAC	AAB	pome (prata)	
53	Prata Anã	AAB	pome (prata)	Brasil
54	Prata Branca	AAB	pome (prata)	
55	Poovan	AAB	Silk (maçã)/mysore	Havaí
56	Plantain N. 2	AAB	plátano	França
57	Pinha	AAB		Brasil

Tabela 1 - Acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical utilizados na caracterização da composição genômica e ploidia por microssatélites, estabelecida previamente por caracterização morfológica e/ou informação de origem (passaporte)

(continuação)

Nº	Acesso	Genoma ²	Subgrupo/ Subespécie ¹	Procedência ²
58	Padath	AAB		Brasil
59	Pacovan	AAB	pome (prata)	Brasil
60	N. 113	AAB		Tailândia
61	Mysore	AAB	mysore	Brasil
62	Muracho	AAB		Bélgica
63	Mongolo	AAB		Brasil
64	Moenang	AAB		Tailândia
65	Maça Caule Roxo	AAB		Brasil
66	Kune	AAB		Nova Guiné
67	Kingala N.1	AAB	silk (maça)	França
68	Kepok Bung	AAB		Indonésia
69	Kelat	AAB		França
70	Java IAC	AAB		Brasil
71	Garoto	AAB		Nova Guiné
72	Figue Rose Naine	AAB	red	França
73	Eslesno	AAB		Havaí
74	Curare Enano	AAB	plátano	Costa Rica
75	Comprida	AAB		Brasil
76	Chifre De Vaca	AAB		Brasil
77	Adimoo	AAB		Nova Guiné
78	AAB S/Nome	AAB		Honduras
79	Tropical	AAAB	(Yangambi n.2 x M53) ³	Brasil
80	Preciosa	AAAB	(Pacovan x M53) ³	Brasil
81	Porp	AAAB		Nova Guiné
82	Platina	AAAB		Brasil
83	Pacova Ken	AAAB	(Pacovan x M53) ³	Brasil
84	PA42-44	AAAB	(Prata Anã x M53) ³	Brasil
85	Ouro Da Mata	AAAB	pome (prata)	Brasil
86	Ngern	AAAB		Tailândia
87	Langka	AAAB		Tailândia
88	Garantida	AAAB	(Prata São Tomé x M53) ³	Brasil
89	FHIA-21	AAAB	Híbrido de plátano ⁴	Honduras
90	FHIA-18	AAAB	(Prata Anã x SH3142) ⁴	Honduras
91	FHIA-02	AAAB/AAAA	(Williams x SH3393) ⁴	Honduras
92	FHIA-01	AAAB	(Prata Anã x SH3142) ⁴	Honduras
93	IC - 2	AAAA	(High Gate x 2n)	Brasil
94	Calypso	AAAA	(High Gate x 2n)	Santa Lucia
95	Buccaneer/Bucaneiro	AAAA	(High Gate x 2n)	Santa Lucia

Tabela 1 - Acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical utilizados na caracterização da composição genômica e ploidia por microssatélites, estabelecida previamente por caracterização morfológica e/ou informação de origem (passaporte)

(continuação)

Nº	Acesso	Genoma ²	Subgrupo/ Subespécie ¹	Procedência ²
96	Ambrosia	AAAA	(High Gate x 2n)	Santa Lucia
97	Yangambi Km 5	AAA	ibota	França
98	Wasolay	AAA		Nova Guiné
99	Walebo	AAA		Nova Guiné
100	Valery	AAA	cavendish	Brasil
101	Umbuk	AAA		Indonésia
102	Tugoomomboo	AAA		Nova Guiné
103	Caipira	AAA	ibota	Brasil
104	Towoolee	AAA		Nova Guiné
105	Torp	AAA		Nova Guiné
106	Sri	AAA		Indonésia
107	Sapon	AAA		Indonésia
108	São Tomé	AAA		Brasil
109	Roombum	AAA		Nova Guiné
110	Poyo	AAA	cavendish	Brasil
111	Pirua	AAA		Brasil
112	Pagatow	AAA		Nova Guiné
113	Ouro Mel	AAA		Brasil
114	Orotawa	AAA		França
115	Nanicão	AAA	cavendish	Brasil
116	Nam	AAA		Tailândia
117	Muga	AAA		Nova Guiné
118	Morong	AAA		Nova Guiné
119	Markatooa	AAA		Nova Guiné
120	Maida	AAA		Costa Rica
121	Leite	AAA		Brasil
122	Lacatan	AAA	cavendish	Brasil
123	Azedinha	AAB		Brasil
124	Imperial	AAA		Brasil
125	Highgate	AAA		Honduras
126	Gros Michel	AAA	gros michel	Brasil
127	Grande Naine	AAA	cavendish	Brasil
128	Dois Cachos	AAA		Brasil
129	Dodoga	AAA		Nova Guiné
130	Cocos	AAA	gros michel	França
131	Caru Verde	AAA	red	Brasil
132	Caru Roxa	AAA	red	Brasil
133	Canela	AAA		Brasil

Tabela 1 - Acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical utilizados na caracterização da composição genômica e ploidia por microssatélites, estabelecida previamente por caracterização morfológica e/ou informação de origem (passaporte)

(continuação)

Nº	Acesso	Genoma ²	Subgrupo/ Subespécie ¹	Procedência ²
134	Bakar	AAA		Indonésia (FHIA)
135	Bagul	AAA		Nova Guiné
136	Amritsagar	AAA		Havaí
137	Ambei	AAA		Nova Guiné
138	AAA Desconhecida	AAA		Nova Guiné
139	Zebrina	AA(S)	<i>ssp. zebrina</i>	Havaí
140	Selangor	AA(S)	<i>ssp. malaccensis</i>	França
141	Perak	AA(S)		Malásia
142	Pa Songkla	AA(S)	<i>ssp. siamea</i>	França
143	Pa Rayong	AA(S)	<i>ssp. siamea</i>	Tailândia
144	Pa Phatthalung	AA(S)		Tailândia
145	Pa Musore 3	AA(S)	<i>ssp. malaccensis derivada</i>	Tailândia
146	Pa Musore 2	AA(S)	<i>ssp. malaccensis derivada</i>	Tailândia
147	Pa Abissinea	AA(S)	<i>ssp. siamea</i>	Tailândia
148	N.118	AA(S)		Tailândia
149	Monyet	AA(S)	<i>ssp. zebrina</i>	Indonésia
150	Modok Gier	AA(S)		Nova Guiné
151	Microcarpa	AA(S)	<i>ssp. microcarpa</i>	França
152	Malaccensis	AA(S)	<i>ssp. malaccensis</i>	Honduras
153	Krasan Saichon	AA(S)		Tailândia
154	Khae	AA(S)		Tailândia
155	Jambi	AA(S)	<i>ssp. malaccensis</i>	Indonésia
156	Cici	AA(S)	<i>ssp. malaccensis</i>	Indonésia
157	Calcutta 4	AA(S)	<i>ssp. burmannicoide</i>	Jamaica
158	Burmannica	AA(S)	<i>ssp. burmanica</i>	Honduras
159	Buintenzorg	AA(S)	<i>ssp. zebrina</i>	Jamaica
160	Birmanie	AA(S)		França
161	M 61	AA(H)	Híbrido	Equador
162	M 53	AA(H)	Híbrido	Equador
163	M 48	AA(H)	Híbrido	Equador
164	F3P4	AA(H)	Híbrido	Equador
165	F2P2	AA(H)	Híbrido	Equador
166	Tuugia	AA(C)		Havaí
167	Tongat	AA(C)	<i>ssp. erans</i>	Honduras
168	Giral	AAB		Brasil
169	Tjau Lagada	AA(C)	<i>ssp. microcarpa derivada</i>	Honduras
170	Thong Dok Mak	AA(C)		Tailândia
171	TA	AA(C)		Nova Guiné

Tabela 1 - Acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical utilizados na caracterização da composição genômica e ploidia por microssatélites, estabelecida previamente por caracterização morfológica e/ou informação de origem (passaporte)

(continuação)

Nº	Acesso	Genoma ²	Subgrupo/ Subespécie ¹	Procedência ²
172	Sowmuk	AA(C)	<i>ssp. banksii</i>	Nova Guiné
173	SA	AA(C)		Tailândia
174	S/N. 2	AA(C)	<i>ssp. banksii</i>	Nova Guiné
175	Raja Uter	AA(C)		Indonésia
176	Pipit	AA(C)		Indonésia
177	Ouro	AA(C)		Brasil
178	Niyarma Yik	AA(C)	<i>ssp. banksii</i>	Tailândia
179	NBF 9	AA(C)		Nova Guiné
180	NBA 14	AA(C)	<i>ssp. banksii</i>	Nova Guiné
181	Mangana	AA(C)		Nova Guiné
182	Mambee Thu	AA(C)	<i>ssp. banksii</i>	Nova Guiné
183	Malbut	AA(C)		Nova Guiné
184	Lidi	AA(C)		Honduras
185	Khi Maeo	AA(C)		Tailândia
186	Khai Nai On	AA(C)		Tailândia
187	Khai	AA(C)		Tailândia
188	Jari Buaya	AA(C)		Honduras
189	Jaran	AA(C)	<i>ssp. burmannica</i>	Indonésia
190	Fako Fako	AA(C)		Nova Guiné
191	Berlin	AA(C)		Indonésia
192	Babi Yadefana	AA(C)		Nova Guiné
193	Prata Manteiga	AAB	pome (prata)	Brasil
194	Borneo	AA (S)	<i>ssp. microcarpa</i>	Jamaica
195	Madu	AA		Honduras
196	Prata Maçã	AAAB	pome (prata)	Brasil
197	Verde	AAB		Brasil
198	Prata Anã 2	AAB	pome (prata)	Brasil
199	Prata Anã 3	AAB	pome (prata)	Brasil
200	Pacovan Ken	AAAB	(Pacovan x M53) ³	Brasil
201	Pitogo	ABB		Brasil
202	Pacha Nadan	AB		Brasil
203	Njok Kon	AAB		França
204	Marmelo	NI		Brasil
205	Lareina BT100	NI		-
206	Pisang Ceylan	AAB		Bélgica
207	Pisang Nangka	AA		Brasil
208	Willians	AAA	Cavendish	Bélgica
209	PV42-114	AAAB	(Pacovan x M53) ³	Brasil

Tabela 1 - Acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical utilizados na caracterização da composição genômica e ploidia por microssatélites, estabelecida previamente por caracterização morfológica e/ou informação de origem (passaporte)

(conclusão)

Nº	Acesso	Genoma ²	Subgrupo/ Subespécie ¹	Procedência ²
210	PV03-76	AAAB	(Pacovan x Calcutta 4) ³	Brasil
211	Khae Prae	AA		
212	Pitu	AA		
213	Paka Iv	AA		
214	Ido 110	AA		
215	P. Kermain	?		
216	P. Serum	AA	<i>ssp.malaccensis</i>	
217	Pisang Mas	AA		
218	Uwati	AA		
219	Diplóide Bélgica	AA	<i>balbisiana</i>	Bélgica
220	BB França	BB	<i>balbisiana</i>	França
221	BB IAC	BB	<i>balbisiana</i>	Brasil
222	<i>Musa laterita</i>	Musa	<i>Rhodochlamys</i>	França
223	Tambi	AAA		Honduras
224	Royal (<i>M. ornata</i> x <i>M. velutina</i>)	Musa	<i>Rhodochlamys</i>	França

¹Informação com base no banco de dados do MGIS de Musa (MGIS, 2009) ² Informação de passaporte da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. ³Híbrido desenvolvido pela Embrapa CNPMF. ⁴ Híbridos da FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola). ? genoma não definido. Musa = Espécie distinta de *M. acuminata* ou *M. balbisiana*; C=cultivar; S = selvagem; H = Híbrido; NI = Não informado.

3.2 Citometria de fluxo

Para determinação da quantidade de DNA e ploidia, aproximadamente 20 a 30 mg de tecido foliar jovem dos acesso de bananeira e o mesmo peso de tecido foliar da *Pisum sativum* (padrão externo de referência) foram macerados com auxílio de uma lâmina cortante em uma placa de Petri contendo 1 mL do tampão LB01 pH 7,5 gelado (80 mM KCl; 20 mM NaCl; 15 mM β -mercaptoethanol; 15 mM Tris; 2 mM Na₂EDTA; 0.5 mM espermina.4HCl; 0.1 % (v/v) Triton X-100) para lise celular e liberação dos núcleos em suspensão (DOLEZEL, 1997). O tecido macerado foi aspirado através de duas camadas de gaze com auxílio de uma pipeta plástica e posteriormente filtrado em uma malha de 50 μ m, sendo coletado em um tubo de poliestireno. Os núcleos foram corados com a adição de 25 μ L de uma solução de 1 mg/mL de iodeto de propídeo à suspensão

nuclear. Posteriormente, 5 µL de RNase foram adicionados a cada amostra. As amostras foram armazenadas no escuro e analisadas até 1 hora após o preparo. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados usando uma escala logarítmica para os histogramas obtidos. A análise foi realizada com o citômetro *FacsCalibur* (Becton Dickinson, San Jose, USA) e os histogramas obtidos pelo *software Cell Quest*. A análise estatística foi realizada por meio do *software WinMDI 2.8* (<http://facs.scripps.edu/software.html>). Foram avaliadas três plantas por acesso e uma folha por planta.

O conteúdo de DNA em (pg) para as espécies e acessos foi estimado como:

$\text{Amostra} = \frac{\text{Canal do Pico G1 da amostra}}{\text{Canal do Pico G1 de Calcutta 4}} \times 9,09\text{pg (2C de } \textit{Pisum sativum})$
--

3.3 Extração de DNA

O DNA de bananeira foi extraído pelo laboratório de biologia molecular da EMBRAPA Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, utilizando o protocolo de Doyle e Doyle com pequenas modificações. Cerca de 300 mg de folhas foram moídos na presença de nitrogênio líquido, transferidos para microtubos, onde foi adicionado tampão de extração (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1% polivinilpirrolidona MW 10,000; 2% CTAB e 0,4% β-mercaptoetanol) pré-aquecido a 65°C e homogeneizados por inversão por 5 min. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho-maria à 55°C por 45 min e homogeneizada a cada 15 min. Após essa etapa foi adicionado clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 min. Após duas extrações, foi adicionado ao sobrenadante álcool isopropílico gelado e centrifugado a 12.000 g por 10 min. O DNA em seguida foi ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) e adicionado 7,5 M acetato de amônio e mantida em gelo por 15 min. Em seguida foi centrifugada a 12.000 g por 10 min. Ao sobrenadante foi adicionado etanol absoluto e centrifugada a 12.000 g por 10 min e em seguida o DNA foi lavado duas vezes como etanol 70%. O *pellet* foi ressuspenso TE mais ribonuclease (10 mg/mL RNase). A concentração de DNA foi

determinada por fluorometria (DyNA Quant 2000, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido).

3.4 Reação de amplificação de ITS (*Internal Transcribed Space*) de genes ribossomais seguido de análise de restrição (PCR-RFLP; *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Foram utilizados os *primers ITS1* 5' TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG 3' (HSIAO et al. 1994) e *ITS4* 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' (WHITE et al., 1990) para amplificar as regiões ITS1 - 5.8S - ITS2 do gene ribossomal (Figura 3). A reação de amplificação foi conduzida no volume final de 25 μ L contendo 25 ng de DNA; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,1 mM de cada dNTPs; 0,2 μ M de cada *primer* e 1 U de *Taq polymerase* em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 50 mM KCl; 0,08% NP-40 (Fermentas). A condição de amplificação incluiu um ciclo de desnaturação de 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 30 s a 94°C, 30 s de anelamento a 50°C, 1 min de extensão a 72°C, finalizando com um ciclo 7 min a 72°C. Após a amplificação, 5 μ L do produto de amplificação foi utilizado para confirmar a amplificação. Os 20 μ L restante foram então digeridos com 2 U de *RsaI* durante 3 h a 37°C. A eletroforese foi conduzida em gel de 2% agarose em tampão 0,5X TBE (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) a por 2 h a 4 V cm^{-1} .

Figura 3 - Estrutura do gene ribossomal (rDNA) indicando as regiões amplificadas pelos *primers* de ITS1 e ITS4, incluindo ITS1 - 5.8S - ITS2

3.5 Ensaio para verificação da competição por sítio de amplificação e restrição entre sequências do genoma A e B

Para verificar a competição por sítio de amplificação e restrição em presença de diferente dosagem do genoma A e B foram realizados dois ensaios. O primeiro ensaio foi realizado para verificar o efeito da dosagem do genoma A, empregando 'Calcutta 4' (AA) e 'Butuhan' (BB) como controles. Os DNAs destes dois genótipos foram misturados nas seguintes proporções molares: 1 AA:2 BB; 1 AA:1 BB; 2 AA:1 BB e 3 AA:1BB para simulação dos genótipos ABB, AB, AAB e AAAB, respectivamente. O segundo ensaio foi conduzido para verificar o efeito da dosagem do genoma B: 'Calcutta 4' (AA) e 'Butuhan' (BB) como controles; e as misturas nas seguintes proporções 2 AA:1 BB; 1 AA:1 BB; 1 AA:2 BB para os genótipos AAB, AB, ABB e ABBB, respectivamente. Os genótipos Figo Cinza (ABB), Prata Anã (AAB), PA42-44 (AAAB) e PA Songkla (AA), com constituição genômica conhecidas, foram utilizados como padrão e referência para os ensaios. Os DNAs das amostras foram todos padronizados em 5 ng/μL e as condições de amplificações foram às mesmas utilizadas no PCR-RFLP.

3.6 Clonagem e sequenciamento das regiões do ITS1 e ITS4

Objetivando comparar e identificar as diferenças entre as sequências das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA de *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, essas regiões foram amplificadas, clonadas e sequenciadas. Foram utilizados nesse estudo oito acessos diplóides distribuídos em algumas subespécies de *M. acuminata* spp. *burmannica/burmannicoides* ('Jaran' e 'Calcutta 4'); dois da *M. acuminata* ssp. *microcrapa* ('Tjau Lagada' e 'Borneo'); dois da *M. acuminata* ssp. *banksii* ('NBA-14' e 'Mambee Thu'); o diplóide 'Madu', o híbrido M53 e um acesso de *M. balbisiana* ('Butuhan'). Outros seis acessos entre triplóides e tetraplóides também foram avaliados: 'Pelipita' (ABB); 'Prata Anã' (AAB); um híbrido de 'Prata Anã' o 'PA42-44' (AAAB); 'Grande Naine' (AAA); 'Calypso' (AAAA) e híbrido ornamental 'Royal'.

Foram amplificadas as regiões ITS1 e ITS2 utilizando os primers *ITS1* e *ITS4* (Figura 3). A reação de amplificação foi a mesma utilizada na reação de amplificação do

PCR-RFLP do ITS. Após a confirmação da amplificação e sua quantificação, foi realizada a ligação direta do amplicon em no vetor *pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit* (Promega), seguindo as especificações do kit de clonagem. A ligação foi mantida a 8°C por 17 h. Após esse período, 2 µL da ligação foram transferidos para um tubo contendo 40 µL células competentes de *E. coli* DH10B. Posteriormente, utilizou-se a técnica de eletroporação das bactérias, utilizando-se um eletroporador Micropulser (modelo-BioRad, U.S) em cubetas de 0,2 cm, sob pulso de corrente elétrica de 1,8 kV durante 3,4 ms. Logo em seguida, as células foram transferidas para um tubo contendo 1 mL de meio líquido LB e mantidas durante 1 h em agitação constante a 37°C. Procedeu-se a uma centrifugação por 5 min a 2.000 *g* para a sedimentação das bactérias e o sobrenadante foi descartado. Um volume de 100 µL de célula foi plaqueado em meio sólido LB contendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina; adicionado de 40 µL de 100 mM IPTG (*isopropil β-D-thiogalactopiranosideo*); e 25 µL de 120 mM X-gal (*5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galacto-piranosideo*). As placas foram mantidas a temperatura de 37°C por 17 h para promover o crescimento e isolamento de colônias contendo o inserto do fragmento de interesse. Foram isoladas pelo menos duas colônias para os clones oriundos dos genótipos diplóides ('Royal', 'Calcutta 4', 'Madu', 'Butuhan' e 'M53') e seis para os demais acessos.

As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB com 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, e mantidas em agitação constante de 140 rpm a 37°C durante aproximadamente 17 h. Após o crescimento das colônias; 1,5 mL do volume foi submetido à centrifugação por 1 min a 12.000 *g*. O sobrenadante foi descartado, e esse procedimento repetido por mais uma vez para aumentar o rendimento da minipreparação. A extração de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina. O precipitado de células foi ressuspenso em 300 µL da Solução I (50 mM glicose, 0,25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM Na₂EDTA) com a ajuda de um agitador, incubando-se a temperatura ambiente por 10 min. Após esse período, foi adicionado 300 µL de Solução II (0,2 M NaOH e 1% SDS), misturando-se por inversão e incubando-se no gelo por 5 min. Em seguida, acrescentou-se 300 µL de Solução III (3M KOAc pH 5,5), também misturando-se por inversão e incubando-se no gelo por 5 min. Posteriormente, realizou-

se uma centrifugação por 10 min a 10.000 *g*, e se transferiu o sobrenadante de cada tubo para microtubos novos, aos quais foram adicionados 500 μ L de isopropanol gelado. Os microtubos foram mantidos a -20°C por 30 min, seguido de centrifugação a 10.000 *g* por 15 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi feita a lavagem do precipitado com 500 μ L de álcool 70%, submetidos a centrifugação de 10.000 *g* por 5 min a 4°C. Os microtubos foram deixados à temperatura ambiente até que as amostras secassem. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 50 μ L de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), contendo 50 μ g mL⁻¹ de RNase. O DNA plasmidial foi quantificado e posteriormente foi feita uma reação de PCR para confirmação do inserto no plasmídeo utilizando os primers *ITS1* e *ITS4* nas mesmas condições de amplificação já mencionada.

Após a confirmação da presença do inserto, procedeu-se a reação de sequenciamento. Amostras de DNA plasmidial foram amplificadas em reações de 10 μ L contendo 100 ng de DNA plasmidial; 3 μ L de 2,5X tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH 9,0; 5 mM MgCl₂.6H₂O); 1 μ L do kit *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences) e 0,25 μ M dos iniciadores universal T7 e mesma reação para o iniciador SP6. A reação de sequenciamento foi estabelecida com o seguinte perfil: 30 ciclos de 20 s a 95°C; 15 s a 50°C; 1 min a 60°C, finalizando com 10 min a 4°C. Os produtos amplificados foram precipitados com 60 μ L de 100% etanol e 2 μ L de 3 M acetato de sódio, centrifugados por 45 min a 8.000 *g* a 4°C, seguido por lavagem com 150 μ L de 70% etanol, centrifugado novamente por 15 min e a secagem do *pellet* foi realizada a 37°C por 1 h. O precipitado foi então ressuspense em tampão de sequenciamento (80% v/v formamida deionizada; 20% *loading buffer*), para carregamento em gel de poliacrilamida para análise em sequenciador automático ABI-3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA).

Os cromatogramas gerados foram examinados, para qualidade e presença de vetor com o programa Phred/Phrap/Crossmatch (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) e as sequências resultantes foram submetidas à busca por similaridade no *GenBank*. Além dos clones sequenciados também foram analisados conjuntamente o clone da 'Calcutta 4' (EU418630) e do Tani - BB (EU433930) depositando no NCBI

(BOONRUANGROD, FLUCH e BURG, 2009). Posteriormente as sequências foram alinhadas utilizando programa *BioEdit Sequence* (HALL, 1999) e editadas manualmente. O alinhamento final das sequências foram feitas no MultAlin (CORPET, 1988).

Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o software MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). A distância foi calculada utilizando a estimativa de p-distância (TAMURA et al., 2007). Todas as posições que contém *gaps* foram eliminadas da análise (deleção completa). Como método de agrupamento foi utilizado o *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), para verificar a consistências das bifurcações foi feito uma análise *bootstrap* como 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).

3.7 Construção e validação de novos locos de microssatélites

As sequência das bibliotecas genômicas enriquecidas para microssatélites derivadas das cultivares 'Ouro' (Creste et al., 2006) e 'Calcutta 4', ambas desenvolvidas pela Dra. Silvana Creste no laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP, foram analisadas para identificação e construção dos *primers* utilizando o programa *WebSat* (<http://wsmartins.net/websat/>) desenvolvido por Martins et al. (2009) que usa o serviço do *software Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A qualidade dos *primers* desenhados foi analisada utilizando o programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>).

Para a otimização das condições de amplificação, as reações foram preparadas em um volume final de 15 µL, contendo 25 ng de DNA genômico; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,08% NP-40; 1,5 mM MgCl₂; 100 µM de cada dNTPs; 0,2 µM de cada *primer* (frente e verso) e 1 U de *Taq polimerase* (Fermentas). As amplificações foram conduzidas em termociclador 9700 empregando-se programa *touchdown*, inicialmente com um ciclo a 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 60 s a 60° ou 55°C, de acordo com a T_m dos *primers* (Tabela 4), decrescendo 1°C por cada ciclo por 10 ciclos, seguido de 25 ciclos a 50 ou 45°C, e 72°C por 60 s. Os produtos amplificados foram separados em gel de 6% poliacrilamida desnaturante (CRESTE et al., 2001). Inicialmente, foi feita uma pré-corrida de aquecimento de 70 W por 60 min. As amostras foram desnaturadas com tampão de carregamento (95% formamida; 0,05% xilenocianol;

0,05% azul de bromofenol; 12,5% sacarose; 10 mM NaOH) a 95°C por 5 min, e mantidas em gelo até o carregamento no gel. A corrida foi realizada a 55 W por duas horas e meia e a coloração dos géis foi feito com nitrato de prata conforme descrito por Creste et al. (2001). Os tamanhos dos fragmentos foram determinados com base em padrão molecular 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).

3.8 Reação de microssatélites

Para a caracterização dos acessos do germoplasma foram utilizados dois locos de microssatélites da série Ma (JARRET et al., 1994); três AGMI (LAGODA et al., 1998); um Mb (BUHARIWALLA et al., 2005); sete derivados de 'Ouro' (*MaO*; CRESTE et al., 2006), e mais quatro novos locos, sendo dois de 'Ouro' (*MaO-CEN*) e dois de 'Calcutta 4' (*MaC-CEN*). Os *primers forward* foram sintetizados contendo cauda específica para cada fluorescência e analisados por sequenciamento (MISSIAGIA; GRATTAPAGLIA, 2006).

As reações de amplificação foram preparadas conforme descrito acima, exceto que continham um dos três *primers* marcados (FAM, HEX ou NED) na concentração final de 0,02 µM. As caudas e suas respectivas fluorescências utilizadas foram DYS437 (FAM GACTATGGGCGTGAGTGCAT); D8S1132 (HEX GGCTAGGAAAGGTTAGT GGC); ou D12S1090 (NED ACCAACCTAGGAAACACAGT) de acordo com Missiagia e Grattapaglia (2006). As análises dos fragmentos no sequenciador automático foram realizadas após conduzir as amplificações em paralelo com três locos distintos de microssatélites. De acordo com o tamanho esperado do fragmento amplificado, uma alíquota de 1 µL foi retirada de cada reação para o mesmo genótipo, totalizando 3 µL, que foi misturados a 12 µL de Hi-Di formamide (*Applied Biosystems*) e 0,5 µL de marcador de peso molecular (35-500 pb) ROX-500 size standard (*Applied Biosystems*) na concentração original de 8 nM. Essa mistura foi então desnaturada a 95°C por cinco min em termociclador e mantido em gelo até aplicação. A eletroforese foi então realizada no sequenciador automático de capilar ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystem*) e o resultado da corrida foi analisadas pelos programas *GeneScan* e *Genotyper*.

3.9 Análise dos dados da genotipagem com SSR

Os marcadores microssatélites foram computados como dados binários (presença ou ausência de bandas) devido à natureza poliplóide da espécie, que não permite estabelecer a relação alélica entre os genótipos heterozigotos com distintos níveis de ploidia (CRESTE et al., 2003; PERRIER et al., 2009). A partir dos dados binários, utilizou-se o índice de Jaccard com 1000 permutações para obtenção da matriz de dissimilaridade utilizando o programa Genes (CRUZ, 2001). A matriz obtida foi empregada para a construção do dendrograma utilizando o software Mega 4.0 (TAMURA et al., 2007) e como método de agrupamento foi utilizado o *neighbour-joining* (SAITOU; NEI, 1987). Para os diplóides foi calculado o conteúdo de informação polimórfica - PIC (*Polymorphism information content*; BOTSTEIN et al. 1980) e a heterozigosidade utilizando o software *PowerMarker* (LIU; MUSE, 2005). No tetraplóides o PIC foi calculado (<http://www.liv.ac.uk/~kempsj/pic.html>).

Para análise de presença de estrutura na população os dados foram analisados como marcador codominante e foi utilizado o programa *Structure* 2.3.2, que utiliza modelo *Bayesiano*, assumindo que alguma fração do genoma de cada indivíduo veio de k populações. Os indivíduos são probabilisticamente acessados em k subpopulações, caracterizadas por suas frequências alélicas (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003). O *Structure* não analisa múltiplas ploidias no mesmo arquivo de dados, sendo assim adequações foram feita para que a análise fosse possível. Os acessos avaliados apresentam três níveis de ploidia: diplóides 2x (78 acessos), triplóides 3x (125 acessos) e tetraplóides 4x (21 acessos). Os acessos tetraplóides tiveram comportamento semelhante aos triplóides, produzindo na sua maioria 1 a 3 alelos/loco, sendo assim todos os dados foram padronizados para a ploidia 3x. Para os diplóides, o terceiro alelo foi assumido como dado perdido para padronizar para 3x. Em bananeira é comum a presença de duplicações e translocações, que resultam no surgimento de múltiplos alelos. Assim, para os acessos diplóides com mais de dois alelos por loco (34% dos alelos) e triplóides com mais de três alelos (9% dos alelos) foram tidos como dados perdidos. O *input file* foi preparado conforme descrição de PRITCHARD et al., (2009).

Na origem das bananeiras eventos de hibridações ocorreram entre as espécies selvagens e cultivadas, o que pode resultar em múltiplas ancestralidades dos indivíduos. Diante deste fato, foi utilizado o modelo de mistura, ou seja, a fração do genoma de cada indivíduos pode originar de mais uma subpopulação, a frequência alélica foi tida como correlacionada (as frequências são similares). Empregou-se um *burn-in* de 150.000, seguida de 70.000 MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) para cada k , variando de 2 a 30, e dentro de cada k , dez corridas foram feitas. A escolha do número provável de população foi feita com base no maior valor logaritimizado da verossimilhança dos dados ($\ln(X/K)$), e como suporte usou-se também o método desenvolvido por Evanno (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da ploidia por citometria de fluxo

Foram avaliados 224 acessos de bananeira mediante a análise de citometria de fluxo no laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Juiz de Fora, MG, para o tamanho do genoma (C) e ploidia. O valor de C refere-se à quantidade de DNA contida em um núcleo haplóide (BENNETT; LEITCH, 1995; BENNETT; BHANDOL; LEITCH, 2000). Em alguns casos (organismos diplóides), o valor C e o tamanho do genoma são usados indiferentemente, entretanto, em poliplóides, o valor C pode representar mais de um genoma (GREGORY, 2005), em número diversos dependendo da constituição genômica e ploidia, contidos no mesmo núcleo. O resultado do conteúdo relativo do DNA é mostrado em histogramas, onde há presença de um pico dominante G1 (conteúdo 2C de DNA antes da fase S) com maior número de núcleos, e um pico menor que mostra um número menor de núcleos na fase G2 da mitose (equivalente a 4C após a fase S) para os acessos diplóide, triplóide e tetraplóide (Figura 4).

No diplóide 'Calcutta 4' (nº 157), o conteúdo 2C foi de 1,23 pg por núcleo; o triplóide 'Caipira' (nº 103) apresentou 1,98 pg; o tetraplóide 'Pacovan Ken' (nº 83) foi de 2,45 pg; e um caso de mixoploidia onde um terceiro pico é notado do acesso 'Prata Zulu' (nº 10) com 1,24 pg, 2,48 pg e 4,96 pg (Figura 4). Os 71 acessos diplóides (AA e BB) apresentaram média de $2C=2x$ igual a 1,26 pg, variando de 1,22 a 1,30 pg, enquanto que para os 115 triplóides (AAA, AAB e ABB) a média $2C=3x$ foi de 1,93 pg com amplitude de variação de 1,86 a 1,99 pg. Já os 23 acessos tetraplóides (AAAA e AAAB) apresentaram média de $2C=4x$ de 2,45 pg, variando de 2,28 a 2,56 pg (Tabela 2; Figura 4). O coeficiente de variação entre as amostras analisadas oscilou de 1,23 a 4,56%, com média de 3,31%. Valores de coeficiente de variação abaixo de 5% nesse tipo de análise são aceitáveis (GALBRAITH et al., 2002).

Os oito diplóides BB apresentaram um conteúdo 2C médio de 1,25 pg, sendo o menor conteúdo detectado para o acesso 'Butuhan' (nº 3), com 1,23 pg, e o maior valor de 1,30 pg para o acesso 'BB Panamá' (nº 4). Valores semelhantes também foram observados nos 63 acessos diplóides de genoma AA, com 2C médio de 1,25 pg, com o

menor valor de 1,22 pg para o acesso 'Krasan Saichon' (nº 153) e o maior de 1,30 pg para 'Lareina BT100' (nº 205).

Dentre os triplóides 42 acessos triplóides do tipo AAA, os conteúdos de DNA variaram de 1,90 pg nos acessos 'Towoolee' (nº 104), 'Torp' (nº 105) e 'Lacatan' (nº 122) a 1,98 pg para 'Walebo' (nº 99), 'Valery' (nº 100) e 'Caipira' (nº 103). Nos 54 acessos AAB, a amplitude de variação foi de 1,87 pg ['Tip Kham' (nº 33) e 'Kelat' (nº 69)] a 1,99 pg ['Prata IAC' (nº 52), 'Java IAC' (nº 70) e 'Curare Enano' (nº 74)]. Para os 19 acessos ABB, valor 2C variou de 1,86 pg 'Figo Cinza' (nº 20) e 1,99 pg o ('Tai'). O conteúdo médio de DNA em cada grupo genômico não diferiu (1,93 pg). Tanto os diplóides como os triplóides apresentaram sobreposição de valores que limitam seu uso na previsão da constituição genômica dos acessos tomando como base os diplóides BB e AA. Esta sobreposição nos valores 2C também foi feita por Lysák et al. (1999) em acessos com o genoma AAA e AAB.

Nos quatro tetraplóides AAAA e 19 acessos AAAB, o menor valor do conteúdo de DNA foi de 2,28 pg para o acesso 'PV42-114' (nº 209) e o maior valor de 2,56 pg foi representado pela 'Platina' (nº 82). A maior amplitude de variação no conteúdo de DNA foi apresentada pelos acessos tetraplóides (0,28 pg) seguidas dos triplóides (0,13 pg). Lysák et al. (1999) e por Kamaté et al. (2001) avaliaram apenas triplóides e observaram também maior variação nesta ploidia possivelmente devido a maior distinção na composição dentro desse grupo genômico (AAA, AAB, ABB).

Previamente, havia sido descrito que, em média, o genoma BB é de 8 a 12% menor que o genoma AA, sendo que Kamaté et al. (2001) avaliaram apenas seis acessos AA (1,20 a 1,33 pg) e um acesso BB (1,16 pg), enquanto que Lysák et al. (1999) avaliaram quatro acessos do genoma AA (1,22 a 1,27 pg) e dois do genoma BB (1,11 e 1,12 pg). No presente estudo, um número bem maior de acessos foi analisado, e o conteúdo médio de DNA, AA e BB foram similares. Discrepâncias entre o conteúdo de DNA detectado entre diferentes laboratórios são comuns. Dentre as possíveis causas, podem estar o uso de diferentes padrões de referência, preparação das amostras e diferentes citômetros utilizados (DOLEZEL et al., 1998).

O padrão interno de referência é importante na determinação do conteúdo de DNA, sendo tanto mais precisa a determinação quanto mais próximos forem os

conteúdos de DNA da amostra padrão e da amostra a ser analisada (JOHNSTON et al., 1999). Para Dolezel e Bartos (2005) também é importante que a estrutura da cromatina do padrão e da amostra sejam similares para uma ação uniforme do fluorocromo. Nesse estudo, foi utilizado como padrão externo *Pisum sativum* (9,09 pg), conteúdo bem maior do que usado por Lysák et al. (1999) e Kamaté et al. (2001), que utilizaram *Glycine max* (2C = 2,50 pg) e *Petunia hybrida* (2C = 2,85 pg), respectivamente como padrão. Essa divergência do tipo de padrão utilizado pode justificar as diferenças nos valores de 2C. Apesar dessas diferenças, a estimativa da ploidia dos acessos não fica prejudicada e o maior número de amostras assegura a maior precisão nos dados obtidos.

Dos 224 acessos avaliados, 218 (subgênero *Eumusa*) tinham informação da ploidia derivadas de características morfológicas e destes, apenas cinco acessos (2,3%) discordaram da ploidia mencionada; outros três acessos sem informação prévia tiveram sua ploidia definida; cinco (1,8%) apresentaram mixoploidia e de outros quatro, não foi possível definir a ploidia. Os outros três acessos foram do subgênero *Rhodochlamys* que não são poliplóides. A baixa proporção de acessos que discordaram em relação a ploidia conhecida também foi relatadas nos trabalhos de Nsabimana; Staden, (2006) e Dolezel et al. (2001) com bananeira, onde 5% de 89 acessos, e 7,6% dos 890 acessos, respectivamente discordaram da ploidia mencionada.

Entre os cinco acessos que diferiram na ploidia determinada por citometria de fluxo incluíam a 'Prata Branca' (nº 54) e 'Azedinha' (nº 123) que são eram tidas como triplóides, se apresentaram como tetraplóides pela análise de citometria de fluxo. Enquanto a 'Pacha Nadan' (nº 202) tida como diplóide trata-se de um triplóide pela análise de citometria de fluxo. A 'Preciosa' (nº 80), um híbrido desenvolvido pela Embrapa resultante do cruzamento entre a cultivar triplóide 'Pacovan', doadora de gametas não reduzido $3n$, e o diplóide M53 (doador de gametas reduzidos n) supostamente um tetraplóide, foi considerada como um triplóide pela presente análise de citometria de fluxo. Esse resultado confirma o padrão de segregação complexo de bananeira onde o cruzamento de um triplóide com um diplóide pode resultar em progênes diplóides, triplóides e tetraplóides (PILLAY et al., 2006). Os acessos

‘Marmelo’ (nº 204), ‘Lareina BT100’ (nº 205) e ‘P. Kermain’ (nº 215), cuja ploidia ainda não tinha sido determinada, mostraram-se como sendo diplóides.

Cinco acessos [‘Prata Zulu’ (nº 10), ‘Poteau Nain’ (nº 11), ‘Espermo’ (nº 21), ‘Muga’ (nº 117) e ‘Malbut’ (nº 183)] apresentaram tecidos aparentemente com mixoploidia, que é presença de células em um único tecido com diferente número de cromossomos, sendo um fenômeno comum em plantas, podendo alcançar um alto nível de ocorrência em gêneros de plantas com pequenos cromossomos (KUNAKH et al., 2008). Em bananeira a mixoploidia é mais comum em plantas resultantes de processos biotecnológicos como duplicação de cromossomos por cultura *in vitro* e hibridação somática (SAHIRAM; BOLLAMMA, 2003; MATSUMOTO et al., 2002). Porém, a ocorrência de mixoploidia também tem sido detectada *in vivo* utilizando citometria como detectado na bananeira ‘Gros Michel’ (KAMATÉ et al., 2001), e na caracterização da ploidia do germoplasma do INIBAP onde 2% (dos 890 acessos) apresentaram com mixoploidia (DOLEZEL et al., 2001). Shepherd (1999), utilizando contagem cromossômica, identificou células com diferentes número de cromossomos em diversas ploidias e constituição genômica de bananeira. Em cultivares de azaléia (*Rhododendron* spp) também tem sido detectado mixoploidia (SCHEPPER et al., 2001).

A isolação de insuficiente quantidade de núcleos, agregação de partículas fluorescente (*debris*) na superfície dos núcleos e a resolução do histograma gerado são problemas comuns na análise de citometria de fluxo (CIRES et al., 2009). Possivelmente problemas similares não permitiram a estimativa da ploidia dos acessos ‘Platain N.2’ (nº 56), ‘Pisang Ceylan’ (nº 206), ‘Tugoomomboo’ (nº 102) e ‘Uw Ati’ (nº 218). Nestes dois últimos casos, onde a ploidia não foi definida por citometria de fluxo, utilizou-se a informação dos grupos formados em um dendrograma gerado de dados de marcadores microssatélites (Tabela 2). Sendo assim, a exceção da ‘Uw Ati’ e ‘Malbut’ que são diplóides todos os outros acessos são triplóides.

Os grupos formados pelos acessos em um dendrograma derivados da análise de SSR mostraram uma boa capacidade de previsibilidade da ploidia dos acessos (ver abaixo). Assim, dos 221 acessos do subgênero *Eumusa* avaliados, 212 coincidiram em relação a ploidia definida por citometria de fluxo e por SSR. Os nove acessos cuja ploidia não foi definida por citometria, foi possível mediante o uso de marcadores SSR.

Enquanto que quatro (1,8%) acessos (números 54, 80, 201 e 204) apresentaram ploidia diferente da relatada por citometria de fluxo (Tabela 2).

Figura 4 - Histograma do conteúdo relativo de DNA dos núcleos corados com iodeto de propídio em quatro acessos de bananeira. Pico G1 refere-se ao conteúdo 2C de DNA enquanto o G2 ao 4C

4.2 Caracterização da constituição genômica por PCR-RFLP

Para confirmar suas constituições genômicas estabelecidas com base em descritores morfológicos, os 224 acessos de *Musa* foram então avaliados por meio de de PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms) das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dos genes ribossomiais (rDNA), desenvolvida por Nwakanma et al. (2003a). Essa abordagem consiste na digestão dos produtos de amplificação das regiões ITS1 – 5.8S – 26S com a enzima *RsaI*, gerando três fragmentos (530 pb, 120 pb e 50 pb) presentes nos acessos com genoma de *M. acuminata* (genoma A), ou os fragmentos de 380 pb, 180 pb, 120 pb e 50 pb identificados em *M. balbisiana* (genoma B). Portanto, os fragmento de 530 pb são específicos para a presença do genoma A, e os fragmentos de 380 pb e 180 pb são comuns para os acessos com presença do genoma B. A dosagem do genoma pode ser inferida visualmente com base nas intensidades dos fragmentos gerados.

Foi realizado um ensaio exploratório para a verificação da utilidade dessa metodologia. Os ensaios consistiram em verificar os efeitos das dosagens dos genomas A e B na intensidade das bandas, a partir de misturas com quantidades crescentes de DNA de genoma A ou B. No ensaio I onde se verifica o efeito da dosagem crescente do genoma A observa-se que um triplóide ABB seguida do AB apresentaram uma intensidade de banda maior para o genoma B que permitiu diferenciá-las das demais. Porém, quando se compara o perfil dos AAB e AAAB não se nota diferenças marcante. Fato este também observado nos acessos AAB e AAAB utilizados como referência. Ao contrário, quando se tem o genoma B em proporções crescentes não se consegue diferenciar os genomas ABB e AB BB, porém estes diferenciam dos AAB e parcialmente dos AB (Figura 5). Nesse caso, o uso associado da citometria de fluxo é necessária para a definição correta da composição genômica dos acessos.

Nwakanma et al. (2003a) relatam que a maior intensidade das bandas em cultivares possuindo dois genoma B poderia estar refletindo o número de variantes dos rDNA presente nas cultivares. Porém, esses dois ensaios mostraram que poderia estar ocorrendo competição por sítio de amplificação entre os genoma A e B e não a variação no número de cópias dos alelos de rDNA. Isso corrobora com outros trabalhos

desenvolvidos utilizando FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) onde Valárik et al. (2002) construíram uma biblioteca genômica da 'Pisang Mas' (AA) e 'Cameroun' (BB) e observaram que clones possuindo partes do genes ribossomais (26S) apresentavam pouca diferenças no número de cópias entre a 'Calcutta 4' (AA) e a 'Tani' (BB). Bartos et al. (2005) utilizaram este mesmo clone não detectaram variação no número de sítios de hibridização de 45S de rDNA em cinco acessos avaliados AA e dois BB. Hribová et al. (2007) isolaram DNA altamente repetitivo da 'Calcutta 4' (através *Cot*) e encontraram três clones associado partes repetitivas do IGS (*Non-transcribed intergenic spacers*) do 45S rDNA cujo número de cópia mostrou-se maior na 'Calcutta 4' (AA) e do que 'Tani' (BB).

Figura 5 - Ensaio para verificação de competição por sítio de restrição/amplificação com base na dosagem dos genomas A e B de bananeira. A: quantificação das amostras utilizadas nos ensaios. Ensaio I: AA (1AA:0BB); BB (0AA:1BB); ABB (1AA:2BB); AB (1AA:1BB); AAB (2AA:1BB); AAAB (3AA:1BB); ABB, AAB; AAAB; AAA. Ensaio II: AA (1AA:0BB); BB (0AA:1BB); AAB (2AA:1BB); AB (1AA:1BB); ABB (1AA:2BB); ABBB (1AA:3BB); ABB; AAB; AAAB; AAA. M marcador λ metilado (25ng), M1 marcador 100pb

Quando essa metodologia foi utilizada nos acessos que compõem o banco de germoplasma, foi detectado um fragmento de 700 pb em todos os acessos. Após a digestão com a enzima *RsaI*, foram detectados os fragmentos que caracterizam a presença dos genomas A e B (Figura 6). Ao contrário do que foi detectado por Nwakanma et al. (2003a), não foi detectado o fragmento de 50 pb, talvez por se tratar de dímero de *primers* devido a maior quantidade (0,5 μ M) de *primers* utilizado quando comparado (0,2 μ M) deste estudo.

Dos 224 acessos avaliados, apenas dez (4,6%) discordaram em relação à constituição genômica com base nos descritores morfológicos ['Tip' (nº 7), 'Njok Kon' (nº 203), 'Figue Rose Naine' (nº 72), 'Pacha Nadan' (nº 202), 'Diplóide da Bélgica' (nº 219), 'Yangambi n.2' (nº 28), 'Tropical' (nº 79), 'Tugoomomboo' (nº 102), 'Madu' (nº 195) e 'Pitogo' (nº 201)]. Foram estabelecidas a constituição genômica de três acessos ['Marmelo' (nº 205), 'Lareina BT100' (nº 205) e 'P. Kermain' (nº 215)] cuja ploidia foi definida neste estudo. Os acessos 'Prata Zulu' (nº 10) e 'Poteau Nain' (nº 11) tidos como ABB, e os acessos 'Kepok Bung' (nº 68) tida como AAB, apresentaram padrões de intensidade de bandas intermediários entre genótipos do tipo ABB e AAB (Tabela 2). Nesses três casos, outras informações além daquelas obtidas por essa metodologia, foram necessárias para estabelecer a correta classificação da constituição genômica. Informações obtidas de classificação com base no dendrograma a partir de marcadores SSR subsidiaram a caracterização desses acessos (Tabela 2).

Assim, o acesso 'Tip', tido como ABB pela caracterização morfológica, se mostrou pela digestão do produto de ITS, como sendo AAB, enquanto o acesso 'Njok Kon' (nº 203) tido como AAB é um ABB. O acesso 'Figue Rose Naine' (nº 72) é um AAA e não um AAB. O acesso 'Pacha Nadan' (nº 202) tido como AB, na verdade é um triplóide AAB (Figura 6; Tabela 2). Um diplóide BB é perfeitamente diferenciado de um diplóide AA pelas características do porte da planta, que tende ser mais robusta, pela cor verde claro e sem machas do pseudocaule, forma do coração, entre outras características. Assim no caso do 'Diplóide da Bélgica' (nº 219), cuja informação de registro é de um diplóide AA, se trata na verdade de um diplóide *M. balbisiana*, que apresentou erro de registro pela Embrapa (Figura 6).

Curiosamente, o acesso 'Yangambi n.2' (nº 28), cuja constituição genômica é tido internacionalmente como AAB, não produziu a banda de 350 pb esperada que caracteriza o genoma B de *M. balbisiana*, sendo então classificada aqui como um triplóide AAA. Esse acesso foi utilizado no programa de melhoramento da Embrapa como genitor feminino juntamente com o diplóide M53 para obtenção da cultivar 'Tropical' (nº 79) (SILVA et al., 2003), que também não apresentou banda específico para o genoma B, sendo aqui classificada como AAAA (Tabela 2 e Figura 2). Apesar de sugerir a ausência do genoma B em ambas cultivares ('Yangambi n.2' e 'Tropical'), quando se analisam vários locos SSR conjuntamente por dendrograma, estes confirmam sua caracterização morfológica como AAB e AAAB, respectivamente (Figura 6). A mesma classificação também foram obtidas por Creste et al. (2003) e por Jesus et al. (2006) utilizando SSR.

Esta divergência nas detecções do genoma B pode estar relacionada à ocorrência de mutação no sítio de reconhecimento restrição da *RsaI* no rDNA, ou o genoma B derivar de uma forma variante do loco rDNA. Boonruangrod, Fluch e Burg, (2009) também não identificaram a presença do loco do genoma A em dois híbridos ABB (Kluau Tiparod e Simili Radjah), possivelmente sugerindo que esses híbridos possuíam genoma de *M. acuminata* incompleto que não incluem o loco representado pelo marcador SNP específico utilizado. No caso da 'Yangambi n.2' e da 'Tropical' pode ter ocorrido em relação ao genoma B.

O acesso 'Tugoomomboo' (nº 102), procedente da Nova Guiné, classificado no banco de germoplasma como sendo AAA, apresentou um perfil típico de acesso com o genoma ABB (Figura 6), embora na análise com SSRs, aparentou ser AAB. Estranhamente, o acesso diplóide 'Madu' (nº 195) de Honduras, tido como AA pela classificação por descritores morfológicos e por SSR, mostrou um perfil de genoma AB (Figura 6), produzindo os fragmentos que caracterizam o genoma B, embora com leve desvios em relação ao tamanho, indicando que a localização do sítio de restrição da enzima *RsaI* pode ter sido diferente neste acesso (Figura 6). Boonruangrod, Fluch e Burg (2009) detectaram a presença de genoma B em diplóide AA (ssp. *banksii*) e presença de genoma A em diplóide BB utilizando marcadores SNPs específicos de rDNA. Para esses autores, a presença de outro genoma possivelmente está

relacionada a eventos de hibridação entre *M. acuminata* e *M. balbisiana*, com a subsequente recombinação dos dois genomas. Esse resultado poderia explicar o surgimento do marcador específico para B em 'Madu' e da maior intensidade da banda B - específica em 'Tugoomomboo', que poderia apresentar em um dos genomas A, partes de rDNA de *M. balbisiana*.

Os três acessos cuja constituição genômica não haviam sido relatada foram definidos assim, o 'Lareina BT100' (nº 205) e 'P. Kermain' (nº 215) são diplóides AA. No caso do 'Marmelo' (nº 204) tido como diplóide pela análise de citometria, apresentaram um padrão de banda do PCR-RFLP típica de um ABB, também confirmado por SSR. Fato idêntico aconteceu com o acesso 'Pitogo' (nº 201) (Figura 6; Tabela 2). Uma nova avaliação da ploidia nestes dois acessos se faz necessária. O acesso 'Tai' (nº 41) provavelmente trata-se de um ABB pelos dados de SSR, e não AAB como sugerido pelo marcador morfológicos e PCR-RFLP de ITS (Tabela 2). Este corrobora também com o genoma ABB do banco de dados do MGIS - *Germplasm Information System* (MGIS, 2009).

Nos casos dos diplóides ornamentais, representados pelas espécies *M. basjoo* (nº 1) e o híbrido Royal (nº 224) resultante do cruzamento entre duas espécies do subgênero *Rhodochlamys* (*M. ornata* x *M. velutina*) (SANTOS-SEREJO et al., 2007), ambos apresentaram um fragmento um pouco maior do que os 350 pb do genoma *M. balbisiana* e o fragmento de 530 pb de *M. acuminata*. Já o acesso de *M. laterita* (nº 222) (subgênero *Rhodochlamys*) apresentou apenas o fragmento de 530 pb característico de *M. acuminata* (Figura 6). Shepherd (1999) descreveram que *M. laterita* cruzou mais facilmente com *M. acuminata* do que com espécie do próprio subgênero. Nwakanma et al. (2003b), utilizando marcadores PCR-RFLP de DNA de cloroplastos, mostraram que *M. laterita* se agrupou em um dendrograma com acessos diplóides de *M. acuminata*, enquanto *M. basjoo* se agrupou com acessos da espécie *M. balbisiana*. Comportamento semelhante ocorreu para as espécies genitores (*M. ornata* e *M. velutina*) do híbrido Royal que agruparam com subespécies de *M. acuminata* (WONG et al., 2002; BARTOS et al., 2005).

Os acessos 'Prata Zulu' (nº 10) e 'Poteau Nain' (nº 11) tidos como ABB e o acesso 'Kepok Bung' (nº 68), tidos como AAB, se mostraram como AAB/ABB por PCR-

RFLP de ITS (Tabela 2). Dessa forma, 'Prata Zulu' e 'Poteau Nain' agruparam com base marcadores SSR com acessos do genoma ABB, confirmando sua classificação morfológica, da mesma forma que os acessos representados pela 'Kelat' (nº 69) e 'Java IAC' (nº 70) tiveram sua classificação como sendo AAB, enquanto o acesso 'Kepok Bung' não foi possível a determinação perfeita sua composição genômica, devido a sua posição intermediária entre genótipo ABB e AAB (Tabela 2).

Muitos dos acessos identificados com a metodologia de PCR-RFLP de genes ribossomal foram congruentes com a classificação morfológica disponível. Fato este também observado por Ning et al. (2007), que utilizaram esta mesma metodologia (PCR-RFLP) e apenas um acessos dos 216 acessos do INIBAP avaliados discordou da classificação morfológica. Esses dados indicam que a classificação convencional utilizando descritores morfológicos permanece como fidedigna e útil. Porém, a utilização dos marcadores moleculares, por ter como base o genótipo e ser mais objetiva é uma prova irrefutável da sua constituição genômica.

Figura 6 - Perfil molecular de acessos de bananeira com diferentes constituições genômicas por meio de marcadores PCR-RFLP. Topo perfil da amplificação das regiões ITS1 – 5,8S-ITS2 antes da digestão com *RsaI*. 1: Butuhan 2: BB Panamá, 3: Figue Rose Naine, 4: Tugoomomboo, 5: Madu, 6: Pacha Nadan, 7: Njok Kon, 8: Marmelo, 9: Lareina BT100, 10: Pisang Ceylan, 11: PV42-114, 12: PV03-76, 13: Diplóide Bélgica, 14: *Musa laterita*, 15: Musa Royal (*M.ornata* x *M.velutina*), 16: Prata Ponta Aparada, 17: Chifre Vaca, 18: Pulut, 19: Pratao, 20: Pacova Ken, 21: Garantida, 22: Kelat, 23: Java IAC, 24: Tropical. As constituições genômicas com base nos descritores morfológicos estão identificadas entre parênteses, NI constituição genômica não informada, (-): acesso do subgênero *Rhodochlamys*; M: marcador 100 pb. As setas indicam o perfil de 530 pb para o genoma A (A1), e 350 e 180 pb para o genoma B (B1 e B2)

Tabela 2 – Caracterização da constituição genômica mediante marcadores moleculares e da ploidia por citometria de fluxo nos acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa

(continua)

Nº	Acessos	Genoma ¹	Citometria		Marcador Molecular				
			pg	Ploidia	Fragmentos ITS (pb)			Genoma	SSR ²
					530	350	180		
1	<i>Musa basjoo</i>	ES	1,23	2x	++	++		-	-
2	Piraí	BB(S)	1,22	2x		++	++	BB	BB
3	Butuhan	BB(S)	1,23	2x		++	++	BB	BB
4	BB Panamá	BB(S)	1,30	2x		++	++	BB	BB
5	Balbisiana França	BB(S)	1,27	2x		++	++	BB	BB
6	Musa Balbisiana	BB(S)	1,25	2x		++	++	BB	BB
7	TIP	ABB	1,98	3x	++	+	+	AAB	AAB
8	Saba Honduras	ABB	1,93	3x	++	++	++	ABB	ABB
9	Saba	ABB	1,95	3x	++	++	++	ABB	ABB
10	Prata Zulu	ABB	M	?	++	+	+	ABB/AAB	ABB
11	Poteau Nain	ABB	M	?	++	+	+	ABB/AAB	ABB
12	Pelipita	ABB	1,89	3x	++	++	++	ABB	ABB
13	Namwa Khom	ABB	1,91	3x	++	++	++	ABB	ABB
14	Namwa Daeng	ABB	1,94	3x	++	++	++	ABB	ABB
15	Muisa Tia	ABB	1,90	3x	++	++	++	ABB	ABB
16	Monthan	ABB	1,93	3x	++	++	++	ABB	ABB
17	Ice Cream	ABB	1,94	3x	++	++	++	ABB	ABB
18	Ice Cream	ABB	1,93	3x	++	++	++	ABB	ABB
19	Gia Hui	ABB	1,90	3x	++	++	++	ABB	ABB
20	Figo Cinza	ABB	1,86	3x	++	++	++	ABB	ABB
21	Espermo	ABB	M	?	++	++	++	ABB	ABB
22	Champa Madras	ABB	1,98	3x	++	++	++	ABB	ABB
23	Cachaco	ABB	1,93	3x	++	++	++	ABB	ABB
24	Cacambou Naine	ABB	1,93	3x	++	++	++	ABB	ABB
25	Bendetta	ABB	1,93	3x	++	++	++	ABB	ABB
26	Abuperak	ABB	1,94	3x	++	++	++	ABB	ABB
27	IAC	AB(H)	1,26	2x	++	+	+	AB	?
28	Yangambi N. 2	AAB	1,93	3x	++			AAA	AAB
29	Warik	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
30	Walha	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
31	Ustrali	AAB	1,93	3x	++	+	+	AAB	AAB
32	Umpako	AAB	1,89	3x	++	+	+	AAB	AAB
33	Thap Maeo	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
34	Trois Vert	AAB	1,90	3x	++	+	+	AAB	AAB
35	Tomnam	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
36	Tipo Velhaca	AAB	1,92	3x	++	+	+	AAB	AAB
37	Tip Kham	AAB	1,87	3x	++	+	+	AAB	AAB
38	Thong Ruong	AAB	1,98	3x	++	+	+	AAB	AAB
39	Terrinha	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
40	Terra S/ Nome	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
41	Tai	AAB	1,99	3x	++	+	+	AAB	ABB

Tabela 2 – Caracterização da constituição genômica mediante marcadores moleculares e da ploidia por citometria de fluxo nos acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa

(continuação)

Nº	Acessos	Genoma ¹	Marcador Molecular						
			Citometria		Fragmentos ITS (pb)				
			pg	Ploidia	530	350	180	Genoma	SSR ²
42	Sempre Verde	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
43	Saney	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
44	Samurá B	AAB	1,89	3x	++	+	+	AAB	AAB
45	Red Yade	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
46	Pulut	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
47	Pratão	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
48	Prata Sta. Maria	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
49	Prata P. Aparada	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
50	Prata Maceió	AAB	1,93	3x	++	+	+	AAB	AAB
51	Prata Comum	AAB	1,90	3x	++	+	+	AAB	AAB
52	Prata IAC	AAB	1,99	3x	++	+	+	AAB	AAB
53	Prata Anã	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
54	Prata Branca	AAB	2,29	4x	++	+	+	AAAB	AAB
55	Poovan	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
56	Plantain N. 2	AAB	?	?	++	+	+	AB?	AAB
57	Pinha	AAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAB
58	Padath	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
59	Pacovan	AAB	1,93	3x	++	+	+	AAB	AAB
60	N. 113	AAB	1,89	3x	++	+	+	AAB	AAB
61	Mysore	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
62	Muracho	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
63	Mongolo	AAB	1,98	3x	++	+	+	AAB	AAB
64	Moenang	AAB	1,99	3x	++	+	+	AAB	AAB
65	Maçã Caule Roxo	AAB	1,90	3x	++	+	+	AAB	AAB
66	Kune	AAB	1,92	3x	++	+	+	AAB	AAB
67	Kingala N.1	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
68	Kepok Bung	AAB	1,95	3x	++	+	+	ABB/AAB	ABB/AAB
69	Kelat	AAB	1,87	3x	++	+	+	AAB	AAB
70	Java IAC	AAB	1,99	3x	++	+	+	AAB	AAB
71	Garoto	AAB	1,93	3x	++	+	+	AAB	AAB
72	Figue Rose Naine	AAB	1,93	3x	++			AAA	AAA
73	Eslesno	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
74	Curare Enano	AAB	1,99	3x	++	+	+	AAB	AAB
75	Comprida	AAB	1,98	3x	++	+	+	AAB	AAB
76	Chifre De Vaca	AAB	1,92	3x	++	+	+	AAB	AAB
77	Adimoo	AAB	1,93	3x	++	+	+	AAB	AAB
78	AAB S/Nome	AAB	1,95	3x	++	+	+	AAB	AAB
79	Tropical	AAAB	2,50	4x	++			AAAA	AAAB
80	Preciosa	AAAB	1,94	3x	++	+	+	AAB	AAAB
81	Porp	AAAB	2,43	4x	++			AAAB	AAAB
82	Platina	AAAB	2,56	4x	++	+	+	AAAB	AAAB

Tabela 2 – Caracterização da constituição genômica mediante marcadores moleculares e da ploidia por citometria de fluxo nos acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa

(continuação)

Nº	Acessos	Genoma ¹	Citometria		Marcador Molecular				
			pg	Ploidia	Fragmentos ITS (pb)			Genoma	SSR ²
					530	350	180		
83	Pacova Ken	AAAB	2,45	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
84	PA42-44	AAAB	2,45	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
85	Ouro Da Mata	AAAB	2,46	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
86	Ngern	AAAB	2,55	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
87	Langka	AAAB	2,48	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
88	Garantida	AAAB	2,48	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
89	FHIA-21	AAAB	2,49	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
90	FHIA-18	AAAB	2,48	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
91	FHIA-02	AAAB/AAAA	2,40	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
92	FHIA-01	AAAB	2,49	4x	++	+	+	AAAB	AAAB
93	IC - 2	AAAA	2,49	4x	++			AAAA	AAAA
94	Calypso	AAAA	2,43	4x	++			AAAA	AAAA
95	Buccaneer	AAAA	2,45	4x	++			AAAA	AAAA
96	Ambrosia	AAAA	2,47	4x	++			AAAA	AAAA
97	Yangambi Km 5	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
98	Wasolay	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
99	Walebo	AAA	1,98	3x	++			AAA	AAA
100	Valery	AAA	1,98	3x	++			AAA	AAA
101	Umbuk	AAA	1,95	3x	++			AAA	AAA
102	Tugoomomboo	AAA	?	?	++	++	++	ABB	ABB/AAB
103	Caipira	AAA	1,98	3x	++			AAA	AAA
104	Towoolee	AAA	1,90	3x	++			AAA	AAA
105	Torp	AAA	1,90	3x	++			AAA	AAA
106	Sri	AAA	1,93	3x	++			AAA	AAA
107	Sapon	AAA	1,93	3x	++			AAA	AAA
108	São Tomé	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
109	Roombum	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
110	Poyo	AAA	1,91	3x	++			AAA	AAA
111	Pirua	AAA	1,91	3x	++			AAA	AAA
112	Pagatow	AAA	1,91	3x	++			AAA	AAA
113	Ouro Mel	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
114	Orotawa	AAA	1,93	3x	++			AAA	AAA
115	Nanicão	AAA	1,94	3x	++			AAA	AAA
116	Nam	AAA	1,94	3x	++			AAA	AAA
117	Muga	AAA	M	?	++			A?	AAA
118	Morong	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
119	Markatooa	AAA	1,91	3x	++			AAA	AAA
120	Maida	AAA	1,94	3x	++			AAA	AAA
121	Leite	AAA	1,93	3x	++			AAA	AAA
122	Lacatan	AAA	1,90	3x	++			AAA	AAA
123	Azedinha	AAB	2,36	4x	++	+	+	AAAB	AAAB

Tabela 2 – Caracterização da constituição genômica mediante marcadores moleculares e da ploidia por citometria de fluxo nos acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa

(continuação)

Nº	Acessos	Genoma ¹	Citometria					Marcador Molecular	
			pg	Ploidia	530	350	180	Fragmentos ITS (pb)	
								Genoma	SSR ²
124	Imperial	AAA	1,93	3x	++			AAA	AAA
125	Highgate	AAA	1,91	3x	++			AAA	AAA
126	Gros Michel	AAA	1,94	3x	++			AAA	AAA
127	Grande Naine	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
128	Dois Cachos	AAA	1,91	3x	++			AAA	AAA
129	Dodoga	AAA	1,94	3x	++			AAA	AAA
130	Cocos	AAA	1,95	3x	++			AAA	AAA
131	Caru Verde	AAA	1,96	3x	++			AAA	AAA
132	Caru Roxa	AAA	1,95	3x	++			AAA	AAA
133	Canela	AAA	1,94	3x	++			AAA	AAA
134	Bakar	AAA	1,91	3x	++			AAA	AAA
135	Bagul	AAA	1,93	3x	++			AAA	AAA
136	Amritsagar	AAA	1,93	3x	++			AAA	AAA
137	Ambei	AAA	1,94	3x	++			AAA	AAA
138	AAA Desconhecida	AAA	1,93	3x	++			AAA	AAA/AAB
139	Zebrinha	AA(S)	1,23	2x	++			AA	AA
140	Selangor	AA(S)	1,25	2x	++			AA	AA
141	Perak	AA(S)	1,26	2x	++			AA	AA
142	Pa Songkla	AA(S)	1,23	2x	++			AA	AA
143	Pa Rayong	AA(S)	1,26	2x	++			AA	AA
144	Pa Phatthalung	AA(S)	1,23	2x	++			AA	AA
145	Pa Musore 3	AA(S)	1,25	2x	++			AA	AA
146	Pa Musore 2	AA(S)	1,27	2x	++			AA	AA
147	Pa Abissinea	AA(S)	1,28	2x	++			AA	AA
148	N.118	AA(S)	1,29	2x	++			AA	AA
149	Monyet	AA(S)	1,23	2x	++			AA	AA
150	Modok Gier	AA(S)	1,25	2x	++			AA	AA
151	Microcarpa	AA(S)	1,26	2x	++			AA	AA
152	Malaccensis	AA(S)	1,23	2x	++			AA	AA
153	Krasan Saichon	AA(S)	1,22	2x	++			AA	AA
154	Khae	AA(S)	1,28	2x	++			AA	AA
155	Jambi	AA(S)	1,27	2x	++			AA	AA
156	Cici	AA(S)	1,24	2x	++			AA	AA
157	Calcutta 4	AA(S)	1,23	2x	++			AA	AA
158	Burmannica	AA(S)	1,23	2x	++			AA	AA
159	Buintenzorg	AA(S)	1,27	2x	++			AA	AA
160	Birmanie	AA(S)	1,28	2x	++			AA	AA
161	M 61	AA(H)	1,23	2x	++			AA	AA
162	M 53	AA(H)	1,27	2x	++			AA	AA
163	M 48	AA(H)	1,28	2x	++			AA	AA

Tabela 2 – Caracterização da constituição genômica mediante marcadores moleculares e da ploidia por citometria de fluxo nos acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa

(continuação)

Nº	Acessos	Genoma ¹	Citometria		Marcador Molecular					
			pg	Ploidia	Fragmentos ITS (pb)			Genoma	SSR ²	
					530	350	180			
164	F3P4	AA(H)	1,23	2x	++				AA	AA
165	F2P2	AA(H)	1,25	2x	++				AA	AA
165	F2P2	AA(H)	1,25	2x	++				AA	AA
166	Tuugia	AA(C)	1,28	2x	++				AA	AA
167	Tongat	AA(C)	1,23	2x	++				AA	AA
168	Giral	AAB	1,90	3x	++	+	+		AAB	AAB
169	Tjau Lagada	AA(C)	1,23	2x	++				AA	AA
170	Thong Dok Mak	AA(C)	1,24	2x	++				AA	AA
171	TA	AA(C)	1,24	2x	++				AA	AA
172	Sowmuk	AA(C)	1,26	2x	++				AA	AA
173	SA	AA(C)	1,23	2x	++				AA	AA
174	S/N. 2	AA(C)	1,25	2x	++				AA	AA
175	Raja Uter	AA(C)	1,25	2x	++				AA	AA
176	Pipit	AA(C)	1,28	2x	++				AA	AA
177	Ouro	AA(C)	1,23	2x	++				AA	AA
178	Niyarma Yik	AA(C)	1,28	2x	++				AA	AA
179	NBF 9	AA(C)	1,27	2x	++				AA	AA
180	NBA 14	AA(C)	1,23	2x	++				AA	AA
181	Mangana	AA(C)	1,23	2x	++				AA	AA
182	Mambee Thu	AA(C)	1,27	2x	++				AA	AA
183	Malbut	AA(C)	M	?	++				AA?	AA
184	Lidi	AA(C)	1,27	2x	++				AA	AA
185	Khi Maeo	AA(C)	1,27	2x	++				AA	AA
186	Khai Nai On	AA(C)	1,27	2x	++				AA	AA
187	Khai	AA(C)	1,23	2x	++				AA	AA
188	Jari Buaya	AA(C)	1,25	2x	++				AA	AA
189	Jaran	AA(C)	1,26	2x	++				AA	AA
190	Fako Fako	AA(C)	1,28	2x	++				AA	AA
191	Berlin	AA(C)	1,23	2x	++				AA	AA
192	Babi Yadefana	AA(C)	1,26	2x	++				AA	AA
193	Prata Manteiga	AAB	1,92	3x	++				AAB	AAB
194	Borneo	AA (S)	1,25	2x	++				AA	AA
195	Madu	AA	1,28	2x	++	++	+		AB?	AA
196	Prata Maçã	AAAB	2,46	4x	++	+	+		AAAB	AAAB
197	Verde	AAB	1,90	3x	++	+	+		AAB	AAB
198	Prata Anã 2	AAB	1,90	3x	++	+	+		AAB	AAB
199	Prata Anã 3	AAB	1,91	3x	++	+	+		AAB	AAB
200	Pacovan Ken	AAAB	2,46	4x	++	+	+		AAAB	AAAB
201	Pitogo	ABB	1,24	2x	++	++	++		AB	ABB
202	Pacha Nadan	AB	1,97	3x	++	+	+		AAB	AAB
203	Njok Kon	AAB	1,94	3x	++	++	++		ABB	ABB

Tabela 2 – Caracterização da constituição genômica mediante marcadores moleculares e da ploidia por citometria de fluxo nos acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa

(conclusão)

Nº	Acessos	Genoma ¹	Marcador Molecular						
			Citometria		Fragmentos ITS (pb)			Genoma	SSR ²
			pg	Ploidia	530	350	180		
204	Marmelo	NI	1,25	2x	++	++	++	AB?	ABB
205	Lareina BT100	NI	1,30	2x	++	+	+	AA	AAA/AAAA
206	Pisang Ceylan	AAB	?	?	++	+	+	AAB	AAB
207	Pisang Nangka	AA	1,28	2x	++			AA	AAB
208	Willians	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
209	PV42-114	AAAB	2,28	4x	++			AAAB	AAAB
210	PV03-76	AAAB	2,29	4x	++			AAAB	AAAB
211	Khae Prae	AA	1,23	2x	++			AA	AA
212	Pitu	AA	1,23	2x	++			AA	AA
213	Paka Iv	AA	1,26	2x	++			AA	AA
214	Ido 110	AA	1,28	2x	++			AA	AA
215	P.Kermain	NI	1,23	2x	++			AA	AA
216	P.Serum	AA	1,24	2x	++			AA	AA
217	Pisang Mas	AA	1,25	2x	++			AA	AA
218	Uw Ati	AA	?	?	++			AA?	AA
219	Diplóide Bélgica	AA	1,24	2x		++	++	BB	BB
220	BB França	BB	1,27	2x		++	++	BB	BB
221	BB IAC	BB	1,28	2x		++	++	BB	BB
222	<i>Musa laterita</i>	Musa	1,28	2x	++			-	-
223	Tambi	AAA	1,92	3x	++			AAA	AAA
224	Musa royal	Musa	1,27	2x	++	++		-	-
CV mínimo (%)			1,23						
CV máximo (%)			4,56						
CV médio (%)			3,31						

¹NI: Não informado. ?: ploidia não definida ou constituição genômica duvidosa; M: mixoploidia; C: cultivado; S: selvagem e H: híbrido.² Constituição com base nos grupos formados no dendrograma (Figura 14)

4.3 Sequenciamento das regiões de ITS1-5,8S-ITS4 de rDNA

Os genes ribossomais (rDNA) codificadores das subunidades 18S – 5,8S – 26S estão arrançados em múltiplas cópias repetidas em linha nos genomas de eucariotos (CHUNG et al., 2008). Essas unidades gênicas codificadoras são separadas por regiões menos conservadas, denominadas de ITS (*internal transcribed spacer* - espaçador transcrito interno), que tem sido utilizada para investigar as relações genéticas em nível intra e interespecíficas e a história evolutiva das espécies (WEIDER et al., 2005; CHUNG et al., 2008; BOONRUANGROD; FLUCH; BURG, 2009). Para verificar essas relações entre as espécies *M. acuminata* e *M. balbisiana*, bem como estudar o comportamento diferenciado dos acessos 'Madu' e '*Musa basjoo*' após digestão do produto de ITS, e as possíveis relações entre diplóides das subespécies de *M. acuminata* e cultivares triplóides e tetraplóides, essa região foi amplificada e sequenciada (Tabela 1). Foram clonados e sequenciados 17 fragmentos de rDNA amplificados de acessos representantes das respectivas espécie, subespécies, grupos genômicos, subgrupos de bananeira. Juntamente com essas informações, foram incluídas as sequências oriundas de 'Calcutta 4' - AA (EU418630) e 'Tani' - BB (EU433930) depositadas no NCBI (BOONRUANGROD, FLUCH e BURG, 2009).

Foram amplificados e clonados fragmentos do gene rDNA utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990; HSIAO et al., 1994). Os clones sequenciados apresentaram um tamanho médio de 699 pb, cobrindo completamente as regiões ITS1 (média de 228 pb), 5.8S (média de 158 pb) e ITS2 (média de 233 pb), e partes dos genes 18S (24 pb) e 26S (47 pb), onde se ancoravam os iniciadores. Procurou-se sequenciar mais de um clone de cada amplificação de cada acesso. Dos seis clones sequenciados derivados do acesso 'Pelipita' (ABB), quatro derivaram do genoma B, congruente com a presença de dois terços de genoma B; já para os clones obtidos a partir de 'Prata Anã' e 'do híbrido tetraplóide 'PA42-44'', cinco clones derivaram do haplótipo do genoma A e um do genoma B, inferior a proporção esperada de 33,3% e 25% respectivamente. No haplótipo do genoma A, dois clones diferentes foram encontrados para os acessos 'Prata Anã', o híbrido 'PA42-44', o híbrido 'Calypso' e para os dois diplóides 'M53' e 'Jaran' no 'Grande Naine' três clones diferentes foram

observados (Tabela 3; Figura 7). Entre os clones obtidos dos acessos 'Butuhan' e 'Tani' (EU433930) de *M. balbisiana* não foi detectado nenhum polimorfismo, enquanto que foi observado um maior polimorfismo entre as sequências dos clones obtidos das subespécies de *M. acuminata* e entre os acessos triplóides e tetraplóides. A maior diversidade observada em *M. acuminata* tem sido uma observação recorrente (GRAPIN et al., 1998; CRESTE et al., 2004; AMORIM et al., 2008).

O alinhamento das sequências dos clones de 'Calcutta 4' (AA) com a 'Butuhan' (BB) permitiram a identificação entre o genoma A e B de 23 sítios de polimorfismo de base única (SNPs), uma de duas bases - DNP (ITS 1) e uma de três bases - TNP (ITS 2) (Figura 7 e Tabela 3). Desses 28 sítios de polimorfismo, 17 sítios (61%) mostraram ser exclusivos para o genoma B, sendo que dois destes sítios (na posição 254 e 583; Figura 7) eram *indels*, resultantes de deleção de uma guanina (G) ou inserção de uma timina (T), respectivamente. Os outros 11 SNPs (39%) estavam presentes no genoma B e também no genoma A. A posição 435 apresentou uma guanina (G) presente na maioria dos acessos contendo genoma A, porém ausente nas sequências referência B ('Butuhan') e A ('Calcutta 4'), e nos clones da 'Pa-Musore-2' e 'Pa-Musore-3' (Tabela 3; Figura 7). Três SNPs (posições 553, 574 e 589) apareceram nos sete clones da 'PA42-44'-C2 (AAAB), 'Prata Anã'-C1 (AAB), 'Grande Naine'-C2 (AAA), 'Calypson'-C2 (AAAA), e os diplóides AA 'M53'-C2 e Mambee Thu. Outros SNPs (176, 204 e 207) também foram notados com frequência em alguns destes acessos (Figura 7). É possível que estes SNPs sejam associada à subespécie *zebrina* (não incluída neste estudo), que segundo Boonruangrod; Fluch e Burg (2009) está associada na formação de cultivares tipo Prata ('Prata Anã' e 'PA42-44') e Cavendish ('Grande Naine').

Os 17 SNPs encontrados associado ao genoma B poderão ser utilizados para a detecção da participação do genoma B nos acessos desconhecido ou híbridos desenvolvidos mediante desenvolvimentos de *primers* específicos para os SNPs. A presença de haplótipos do genoma B em acessos com composição AA ou vice-versa foi detectada por Boonruangrod, Fluch e Burg (2009) utilizando dois *primers* específicos para SNPs na região 5'ETS associado ao genoma B. Os novos sítios aqui identificados serão de grande utilidade para validar essas informações.

As sequência amplificada contendo as regiões 18S – 5,8S – 26S apresentam um sítio de restrição para a *RsaI* (GTAC) na posição 127 (Figura 7), presente em todos os acessos com genoma A ou B, enquanto que clones derivados do genoma de *M. balbisina* possuem um segundo sítio na posição 506. Nwakanma et al. (2003a) detectaram um fragmento de 50 pb em todos os acessos avaliados após a digestão com *RsaI* do produto amplificado dessa região. Na sequência obtida a partir dos 17 acessos no presente estudo, o sítio de restrição que geraria esse fragmento de 50 pb não foi encontrado, corroborando a observação prévia da ausência desse fragmento nos géis (Figura 6 e Figura 7). Também foi observada após a digestão com *RsaI*, a presença de um fragmento típico de genoma B no acesso ‘Madu’, supostamente AA (Figura 6). O sequenciamento dos clones obtidos desse acesso revelaram a presença de uma inserção de quatro bases (GTAC) na posição 538 que corresponde a um sítio de reconhecimento desta enzima, resultando em um fragmento ligeiramente maior do genoma B quando comparados aos demais (Figura 6 e Figura 7).

No caso do híbrido ornamental ‘M. Royal’ (*M. ornata* x *M. velutina*) não foi detectado o sítio de restrição relacionado ao genoma B (Figura 7). A sequência desse clone foi empregada numa busca de homologia por BLAST identificando o rDNA de cloroplastos de *M. velutina* (FJ428092.1) e *M. ornata* (FJ428096.1), com 98% e 94% de identidade, respectivamente. A digestão *in silico* mostrou que a sequência de *M. velutina* apresentou apenas o fragmento característico do genoma A, enquanto que a de *M. ornata* apresentou os dois sítios de cortes, gerando um fragmento (376 pb) similar em tamanho ao do genoma B (Figura 8). É provável que o clone amostrado foi do parental *M. velutina*.

Figura 7 - Alinhamento das sequências das regiões do ITS1 - 5,8S - ITS2 do gene ribossomal de bananeira. Regiões de anelamento das *primers*, regiões do ITS1 - 5,8S -ITS2 e parte do 26S são mostradas. Os sítios da enzima RsaI (GTAC) estão identificados com uma seta vertical. C: denominação para os diversos clones isolados

(conclusão)

Figura 7 - Alinhamento das sequências das regiões do ITS1 - 5,8S - ITS2 do gene ribossomal de bananeira. Regiões de anelamento dos *primers*, regiões do ITS1 - 5,8S -ITS2 e parte do 26S são mostradas. Os sítios da enzima *RsaI* (GTAC) estão identificados com uma seta vertical. C: denominações para os diversos clones isolados

Figura 8 – Digestão *in silico* das sequências de ‘Butuhan’, ‘Calcutta 4’, Musa Royal, *M. velutina* (FJ428092.1), *Musa ornata* (FJ428096.1). O tamanho das sequências foi normalizado em tamanho com base na ‘Calcutta 4’. MW marcador 100 pb (Invitrogen)

Objetivando estabelecer as relações genéticas entre os acessos foi gerada uma árvore filogenética empregando a abordagem de *p*-distância, que se refere à proporção de sítio de nucleotídeos na qual duas sequências comparadas são diferentes. É um método simples, que apresenta bons resultados quando as diferenças entre pares de distância são pequenas, como no presente estudo (TAMURA et al., 2007). A matriz obtida foi utilizada para obtenção da árvore filogenética utilizando como método de agrupamento o *neighbor-joining* (Figura 9). Os altos valores do *bootstrap* revelam confiabilidade dos agrupamentos gerados para quase a totalidade dos agrupamentos (Figura 9).

Os agrupamentos permitiram a separação de dois grupos principais. Um grupo menor incluiu todos os clones que possuem 17 SNPs relacionados ao genoma B de *M. balbisiana* (Subgrupo I) e o outro grupo, bastante heterogêneo, de acessos que contêm

exclusivamente o genoma A de *M. acuminata*, e que podem ser subdivididos arbitrariamente em sete subgrupos (Subgrupo II a VIII; Tabela 3 e Figura 9). A exceção do subgrupo II todos os outros apresentaram *bootstrap* maior que 50% provando a consistência dos grupos formados. O híbrido ‘Musa Royal’ do subgênero *Rhodochlamys* apresentou-se isolado em relação aos grupos dos clones de *M. acuminata* e *M. balbisiana*, certamente por trata-se da espécie *M. velutina* distinta das espécies do subgênero *Eumusa* (Figura 8 e 9).

Para o estudo das relações entre as subespécies do grupo de *M. acuminata* foram avaliados dois acessos representando a subespécie *malaccensis* (‘Pa Musore 2’ e ‘Pa Musore 3’), dois de *banksii* (‘Mambee Thu’ e ‘NBA-14’), dois de *microcarpa* (‘Tjau Lagada’ e ‘Borneo’), um de *burmannicoides* (‘Calcutta 4’) e um de *burmannica* (‘Jaran’). Os acessos das subespécies *banksii* e *microcarpa* agruparam em subgrupos distintos (Figura 9). Creste et al. (2004) utilizando marcadores microssatélites para caracterizar 58 acessos de bananeira não encontraram relação entre os acessos ‘Mambee Thu’ e ‘NBA-14’. Este agrupamento diferenciado pode tratar-se de variabilidade que existem dentro das subespécies já que, sendo férteis esses diplóides podem cruzar entre si.

Por outro lado, o subgrupo V foi formando pelas subespécies *malaccensis* (‘Pa Musore-2’ e ‘Pa Musore-3’) e *burmannicoides* (‘Calcutta 4’). A relação entre estas duas subespécies também tem sido relatado por outros grupos (WONG et al., 2002; BOONRUANGROD et al., 2008; PERRIER et al., 2009). Provavelmente os quatro SNPs (posições 183, 435, 437 e 616) comuns a estes acessos contribuíram para este agrupamento (Figura 7 e 9).

O agrupamento entre as subespécies *burmannica* e *burmannicoides* tem sido detectado por vários autores (CARREEL et al., 1994; UDE et al., 2002; CARREEL et al., 2002) que sugerem tratá-la como sendo da mesma subespécie. Porém este comportamento não foi evidenciado no presente estudo, onde o acesso ‘Jaran’ (ssp. *burmannica*) apresentou dois clones totalmente distintos. Um dos clones (Jaran-C1) agrupou-se com a ‘Tjau Lagada’ da subespécie *microcarpa* (subgrupos IV) e o outro clone (Jaran-C2) com cultivares triplóides e tetraplóides no subgrupo VII (Figura 9). O agrupamento da subespécie *burmannica* e *microcarpa* não tem sido relatado na literatura. Provavelmente o diplóide ‘Jaran’ utilizado neste estudo não pertença à

subespécie *burmannica*. Creste et al. (2004) descreveram ‘Jaran’ como sendo um diplóide cultivado. Fato este também observado no banco de dados do INIBAP (*international network for improvement of banana and plantain*) onde a maioria dos acessos foi tida como diplóides cultivados e apenas um como sendo da subespécie *burmannica* (MGIS, 2009). Face a sua localização juntamente com o ‘Tjau Lagada’ é provável que se trate da subespécie *microcarpa* ou de um diplóide cultivado. Sabe-se que a subespécie *microcarpa* é considerada bastante heterozigótica, enquanto os diplóides cultivados apresentam-se como sendo híbridos de subespécies distintas (GRAPIN et al., 1998; PERRIER et al., 2009) justificando assim os clones distintos obtidos (Figura 9). Esta heterozigosidade também foi detectada nos grupos formados pela análise do *Structure* discutido posteriormente (Figura 16).

Nos triplóides e tetraplóides avaliados, mais de um clone diferente (relacionado ao genoma A) foi encontrado, uma exceção foi a ‘Pelipita’ que apresentou apenas um clone. A ‘Grande Naine’ (AAA) mostrou-se bastante heterozigótica apresentando três clones distintos alocados nos subgrupos IV, VII e VIII. Nos demais apenas dois clones foram identificados. Na ‘Calypso’ (AAAA) os clones ficaram nos subgrupos II e VI; na ‘Prata Anã’ (AAB) nos subgrupos V e VI e no híbrido PA42-44 (AAAB) nos subgrupos VI e VII (Figura 9). Este resultado pode ser justificado pelo fato de que estes acessos derivam de subespécies distintas e, portanto, apresentam múltipla ancestralidade.

No subgrupo II ficaram o clone da ‘Pelipita’ (C1), ‘NBA-14’ (*ssp. banksii*) e um dos clones de ‘Calypso’ (C1). Carreel et al. (2002), baseados em RFLP de genes citoplasmático descreveram a participação materna (cloroplasto) da *ssp. banksii* e paterna (mitocôndria) de *M. balbisiana* no acesso Pelipita. O mesmo resultado foi encontrado por Boonruangrod et al. (2008) utilizando *primers* específicos para genes mitocondriais e de cloroplastos.

Os clones da ‘Grande Naine’ compartilharam sequências com as subespécies *microcarpa* (subgrupo IV) e *banksii* (subgrupo VI) (Figura 9). Creste et al. (2004) encontraram similaridade entre o acesso diplóide ‘Mambee Thu’ e as cultivares ‘Nanica’ (subgrupo Cavendish) e ‘Gros Michel’ (subgrupo Gros Michel) justificando assim, a presença Grande Naine (C3) no subgrupo VI (Figura 9). Carreel et al. (2002) utilizando RFLP identificaram o mesmo citotipo para acessos do subgrupos Cavendish (AAA) e

Gros Michel (AAA). Assim, estes dois subgrupo (Cavendish e Gros Michel) apresentam relação, fato este evidenciado por Perrier et al. (2009) que detectaram a participação das subespécies *banksii* e *malaccensis* nestes subgrupos utilizando marcadores microssatélites. Por outro lado, Boonruangrod; Fluch e Burg (2009) identificaram, a partir das sequências obtidas das regiões 5' ETS do rDNA de bananeira, a presença da subespécie *zebrina*, e de duas subespécies *malaccensis* (alocadas em grupos distintos) na formação dos acessos do subgrupo Cavendish. Alguns acessos das subespécies *zebrina* e *microcarpa* estão relacionadas e não são perfeitamente distinguíveis (PERRIER et al., 2009) o que pode justificar, em parte, a locação 'Grande Naine' (C1) do subgrupo IV (Figura 9). O último clone ficou juntamente com o híbrido PA42-44 (C2) no subgrupo VIII (Figura 9).

No acesso 'Gros Michel', representado por um híbrido tetraplóide ('Calypso'), foi detectado a participação das subespécies *zebrina*, *malaccensis* e do complexo *microcarpa/errans/banksii* (BOONRUANGROD; FLUCH; BURG, 2009). Esse resultado pode explicar o agrupamento do clone da 'Calypson' C1 com 'NBA-14' (subgrupo II) e o 'Calypson' C2 com o clone 'Mambee Thu' (subgrupo VI), com os diplóides 'NBA-14' e 'Mambee Thu' pertencentes a subespécie *banksii*.

Desde a dizimação da cultivar 'Gros Michel' (AAA) na Jamaica e na América Central pela murcha do *Fusarium*, a 'Grande Naine' (AAA) se tornou a principal cultivar tipo exportação. Apesar de sua aceitação, o melhoramento desta cultivar pela hibridação artificial não tem obtido resultado devido a sua alta esterilidade. Assim, o fato do clone da 'Grande Naine' (C1) apresentar semelhança com clones (AA) dos acessos 'Madu', 'Tjau Lagada' e 'Jaran' (grupo IV), sugere que estes diplóides possam ser importantes para uso em programas de melhoramento visando obtenção (ressíntese) de cultivares tipo Cavendish utilizando de métodos não convencionais de melhoramento como duplicação cromossômica e hibridação somática.

Para o agrupamento contendo a sequência do híbrido 'PA42-44' (Prata Anã x M53), apenas o clone da Prata Anã (C1) agrupou-se com o clone PA42-44 (C1; subgrupo VII) enquanto o genitor masculino M53 foi divergente (Figura 9). O 'M53' é um diplóide melhorado, duplo híbrido, altamente heterozigoto, desenvolvido na Jamaica, resultante do cruzamento entre dois híbridos melhorados cuja ascendência deriva das

subespécies *banksii*, *malaccensis* e o Paka (AA) (JENNY, AUBOIRON, BEVERAGGI, 1994), o que poderia justificar a localização de seus dois clones nos subgrupos III e VI (Figura 9).

A natureza híbrida das cultivares de bananeira corrobora com os resultados deste estudo. Porém, para que uma relação possa ser feita mais acuradamente é necessário um número maior de acessos diplóides em todas as subespécies (*burmannicoides*, *malaccensis*, *banksii*, *microcarpa*, *zebrina* e *errans*) e acessos triplóides dentro de cada grupo/subgrupo. Isso de ser realizado para que toda variabilidade possa ser explorada e as relações genéticas claramente estabelecidas.

Tabela 3 - Sítio das regiões do ITS1 e ITS2 que diferenciam entre os genomas de *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*. Os SNPs comuns ao Butuhan (BB) estão identificados com cinza escuro e os de Calcutta 4 (BB) cinza claro

		SNPs entre o genoma A e B																											
Clones	Genoma	112	183	202	206	208	229	230	231	236	246	247	254	259	262	435	437	463	478	493	506	517	552	553	563	574	576	583	616
EU433930	BB	C	C	C	G	G	A	C	A	T	C	C	G	T	G	A	C	T	A	C	A	C	C	G	A	G	T	-	A
Butuhan	BB	C	C	C	G	G	A	C	A	T	C	C	G	T	G	A	C	T	A	C	A	C	C	G	A	G	T	-	A
Pelipita-C2	ABB	C	C	C	G	G	A	C	A	T	C	C	G	T	G	A	C	T	A	C	A	C	C	G	A	G	T	-	A
PA42-44-C3	AAAB	C	C	C	G	G	A	C	A	T	C	C	G	T	G	A	C	T	A	C	A	C	C	G	A	G	T	-	A
Prata Anã-C3	AAB	C	C	C	G	G	A	C	A	T	C	C	G	T	G	A	C	T	A	C	A	C	C	G	A	G	T	-	A
EU418630	AA	T	A	T	C	A	G	T	T	C	-	-	-	A	A	A	A	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	T
Calcutta 4	AA	T	A	T	C	A	G	T	T	C	-	-	-	A	A	A	A	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	T
Pelipita-C1	ABB	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	C	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
PA42-44T7-C1	AAAB	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	C	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	A	C	T	A
PA42-44T7-C2	AAAB	C	C	T	C	G	G	T	T	C	-	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	G	C	T	A
Prata Anã-C1	AAB	C	C	T	C	G	G	T	T	C	-	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	A	C	T	A
Prata Ana-C2	AAB	T	C	T	C	A	G	T	T	C	-	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	G	C	T	A
Grande Naine-C1	AAA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	C	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
Grande Naine-C2	AAA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	-	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	G	C	T	A
Grande Naine-C3	AAA	T	C	T	C	A	G	T	T	C	-	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
Calypso-C1	AAAA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	C	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
Calypson-C2	AAAA	T	C	T	C	A	G	T	T	C	-	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	G	C	T	A
Madu	AA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	C	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	A	C	T	A
Pa Musore-2	AA	T	A	T	C	G	A	T	T	C	-	-	-	A	A	A	A	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	T
Pa Musore-3	AA	T	A	T	C	G	A	T	T	C	-	-	-	A	A	A	A	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	T
M53-C1	AA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
M53-C2	AA	T	C	T	C	A	G	T	T	C	-	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	G	C	T	A
Tjau Lagada	AA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	C	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
NBA-14	AA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	C	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
Mambee Thu	AA	T	C	T	C	A	G	T	T	C	-	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	G	G	C	T	A
Borneo	AA	C	C	T	C	A	G	T	T	C	C	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
Jaran-C1	AA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	-	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
Jaran-C2	AA	C	C	T	C	G	G	T	T	C	C	C	-	A	A	G	C	G	C	T	T	A	G	A	G	A	C	T	A
Musa Royal	Musa	C	C	T	C	G	G	T	T	C	-	-	G	A	A	G	C	G	C	C	T	A	G	A	A	A	C	T	A

¹ Distância com base no alinhamento (Figura 7). SNPs específicos para o genoma B estão identificados em negrito. C: identifica os diferentes clones encontrados

Figura 9 - Relações genéticas entre os 29 clones rDNA (ITS1 - 5.8S - ITS2) de bananeira obtida por *p* – distância e como método de agrupamento *neighbor – joining*. Valores dos bootstrap e grupo genômico estão identificados na árvore

4.4 Desenvolvimento de novos locos de microssatélites

A biblioteca genômica enriquecida para microssatélites da cultivar ‘Ouro’ desenvolvida por Creste et al. (2006) contém 288 clones (3 placas de 96) sequenciados, e iniciadores específicos para 25 locos já foram validados (série MaOCEN) (Creste et al., 2006). A partir dessa mesma biblioteca, foram sintetizados 22 novos pares *primers* (série MaO-), que foram agora avaliados (Tabela 4). Já a análise das 288 sequências da biblioteca genômica enriquecida para microssatélites derivada da cultivar ‘Calcutta 4’ permitiram identificar 119 novos locos de microssatélites (MaC-), dos quais *primers* específicos para 28 locos foram sintetizados e validados (Tabela 4).

Das sequências analisadas da biblioteca ‘Calcutta 4’, 13,9 % eram compostas por mais de um motivo repetitivo (principalmente dinucleotídeos) na mesma região. Os motivos repetidos mais abundantes foram dinucleotídeos (87%), principalmente do tipo ‘CT/AG’ e ‘GA/TC’ com 39% e 38% das sequências, respectivamente. As menores frequências foram de mono-, tri- e tetranucleotídeos (3,7%). Na biblioteca derivada de ‘Ouro’, os motivos mais frequentes foram os dinucleotídeos GA/TC e AT/TA, aparecendo em uma frequência de 24% e 5,4% respectivamente, enquanto os trinucleotídeos ocorreram numa frequência de 0,48% (CRESTE et al., 2006). Em BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) de ‘Calcutta 4’ os motivos mais frequentes foram de AT/AT seguida de AG/CT (CHEUNG; TOWN, 2007) semelhante ao encontrado no presente estudo.

Esses 50 novos locos foram então validados numa amostra de 14 acessos: ‘Butuhan’ (BB); ‘*Musa balbisiana*’ (BB); ‘Pelipita’ (ABB); ‘Namwa Khrom’ (ABB); ‘Terrinha’ (AAB); ‘Prata IAC’ (AAB); ‘PA42-44’ (AAAB); ‘Ouro da Mata’ (AAAB); ‘Calcutta 4’ (AA); ‘Ouro’ (AA); ‘Caipira’ (AAA); ‘Grande Naine’ (AAA); ‘Bucaneiro’ (AAAA); e ‘Ambrosia’ (AAAA). Dos 28 locos derivados de ‘Calcutta 4’ avaliados, dois não amplificaram produtos nas condições testadas e 26 foram polimórficos, gerando entre 2 a 9 alelos por loco, com média de 5,0 alelos loco⁻¹ (Tabela 4; Figura 10). Já para aqueles 22 novos locos derivados de ‘Ouro’, quatro não amplificaram e 18 foram polimórficos, gerando entre 4 a 11 alelos por loco, com média de 6,4 alelos loco⁻¹ (Tabela 4; Figura 10). De maneira geral, os locos derivados da biblioteca de ‘Ouro’

apresentaram maior polimorfismo, com o PIC média geral de 0,69, variando 0,47 a 0,85, enquanto que para os locos derivados de 'Calcutta 4', o PIC médio estimado foi de 0,61, variando de 0,32 a 0,86 (Tabela 4; Figura 10). O número de alelos para locos identificados na biblioteca de 'Ouro' variou de 1 a 3 para diplóides; 1 a 4 para triplóides; e 2 a 3 para tetraplóides. Já para os locos derivados de 'Calcutta 4', o número de alelos variou de 1 a 2 nos acessos diplóides; de 2 a 3 para os triplóides; e de 1 a 4 para os tetraplóides.

Em relação o tamanho dos alelos amplificado houve algumas divergências entre o tamanho esperado (clone) e observado para alguns locos, que poderia estar relacionado às diferenças na composição de base dos microssatélites e marcador utilizado para inferir o tamanho dos alelos amplificados (TESTOLIN et al., 2000). Essa discrepância entre tamanho de alelos foi observado por Creste et al. (2003) para alelos do loco AGMI 24/25.

A busca por alelos e/ou locos associado aos genomas A ou B é desejável para caracterizar o nível de ploidia, composição genômica e auxiliar na determinação das relações entre os diversos acessos selvagens e as cultivares derivadas (PERRIER et al., 2009). Em geral, os locos microssatélites desenvolvidos de *Musa acuminata* de cultivares comercial ('Ouro') e selvagem ('Calcutta 4') nesse estudo, apresentaram homeólogos (BUHARIWALLA et al., 2005) também em *Musa balbisiana*. Dos 50 locos avaliados em 14 acessos, dois locos da biblioteca 'Ouro' (*MaO-FB08* e *MaO-FG01*) e oito locos da biblioteca 'Calcutta 4' (*MaC-CEN03*, *MaC-CEN06*, *MaC-CEN12*, *MaC-CEN14*, *MaC-CEN18*, *MaC-CEN21*, *MaC-CEN30* e *MaC-CEN34*) mostram alelos específicos para o genoma A e/ou B. O loco *MaO-FB08* apresentou um alelo de 360pb específico para o genoma A de *M. acuminata* (Figura 10). O loco *MaO-FG01* também amplifica alelos (menores que 260 pb) específicos para o genoma A, exceto para o acesso Pelipita (ABB; Figura 10). O loco *MaC-CEN12* produziu um fragmento de 213 pb presente em todos os acessos com genoma B, a exceção de 'Bucaneiro' (AAAA; Figura 10), que também apresentou o fragmento. O loco *MaC-CEN18* (Figura 10) apresentou três alelos (176, 180 e 189 pb), o loco *MaC-CEN34* um alelo de 326 pb, o *MaC-CEN06* um de 280 pb e o *MaC-CEN14* como alelos maiores que 350pb mostraram ser específicos para os acessos como genoma A. O loco *MaC-CEN03* produziu alelos de

168 e 181 pb, específicos para o genoma A e B, respectivamente. Já o loco MaC-CEN30 produziu um grupo de alelos de 250 a 300 pb, específicos para o genoma B, enquanto outro grupo de alelos maiores que 300 pb pareceram ser específicos para o genoma A. O loco *MaC-CEN21* amplificou dois alelos um de 271 pb presente nos acessos com genoma A, porém ausente nos ABB, e um outro de 384 pb presente em todos com genoma B e na Bucaneiro (Figura 10).

A especificidade desses locos e alelos deverá ser validada posteriormente com a análise de um número maior de acessos, englobando diversas ploidia e constituição genômica para a seleção de locos e/ou alelos verdadeiramente associado ao genoma A e B de bananeira.

De maneira geral os locos foram polimórficos nos acessos testados e serão de grande utilidade na caracterização de acessos ou para mapeamento de QTLs utilizando a estratégia de mapeamento por associação, que apresenta grande potencial de utilização nessa espécie face a esterilidade da cultura e a presença de distorções na segregação dos alelos que dificultam o mapeamento utilizando as metodologias clássicas.

Dos 50 locos de microssatélites que foram validados, quatro que apresentaram alto polimorfismo e padrão de banda bem definidos, juntamente com outros 17 locos de microssatélites previamente desenvolvidos (JARRET et al., 1994; KAEMMER et al., 1997; LAGODA et al., 1998; BUHARIWALLA et al., 2005; CRESTE et al., 2006) tiveram seus *primers forward* re-sintetizados com cauda para marcação com fluorescência e foram empregados na genotipagem dos 224 acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Tabela 4 - Características dos locos de microsatélites validados em 14 acessos de bananeira desenvolvida da biblioteca Calcutta 4 (MaC-) e da Ouro (MaO-)

(continua)

Nome	SSR	Forward-F (5' - 3')	Reverse-R (5' - 3')	Tm (F-R)	Clone (pb)	Touchdown	Amplitude	A	PIC
MaC-CEN1	(ct) ₁₈	agatgatgacccccacctc	ttctcctatcccgtggttg	59-59	263	na	na	na	na
MaC-CEN2	(ga) ₁₈	gcttttcgttgatgttccag	tgaggtgaaggcttacacg	58-58	258	55-45	230-289	4	0,61
MaC-CEN3	(ag) ₂₁	ggaggaggaagaggagaagg	tgaactgacaccctgagcac	59-59	168	60-50	168-181	2	0,35
MaC-CEN4	(acc) ₅ .(ct) ₁₆	tgtcagataggtcggaattg	agtgtcttgttaggtttcc	56-53	175	55-45	117-217	8	0,70
MaC-CEN5	(ga) ₁₀ .(ga) ₆	atctcgctcacctcgtcttc	tcatagacagcccagcagaa	59-59	288	55-45	263-284	2	0,37
MaC-CEN6	(ag) ₁₃	ttctgctgggctgtctatga	aagggcagttcacaacacaa	59-59	275	55-45	266-300	8	0,70
MaC-CEN7	(ga) ₉	tgtgtccaacttatcaatc	ctggctacttttggttgc	54-57	254	55-45	260-290	4	0,51
MaC-CEN8	(tg) ₈	gacgccatgttcttttagtgc	gctaccaaggacaataaccag	47-52	195	na	na	na	na
MaC-CEN9	(tcc) ₅	ggtattgctgttgggagttga	agtttggtcgtttgctgct	59-59	156	55-45	163-176	3	0,35
MaC-CEN10	(tc) ₁₄	atctgtgggcttatggctgt	gcagggttgggagaagacat	59-59	180	60-50	159-217	6	0,62
MaC-CEN11	(tc) ₁₄	gttttgggtttaggcgttga	ggcatatcgaggtgggtct	59-59	190	55-45	166-190	6	0,73
MaC-CEN12	(ct) ₁₁	gcaccctgttctctcgtta	cggggactagctcattgtct	60-59	168	60-50	213-241	3	0,48
MaC-CEN14	(at) ₁₄	cacagtttctgcgttctccc	ctggccttgttggtgattt	61-60	308	60-50	200-370	8	0,81
MaC-CEN18	(tc) ₁₅	gcttcgtaccgctctcac	gcgttcattcattttcatc	57-56	217	60-50	176-211	5	0,69
MaC-CEN19	(tc) ₁₃	ttcctgccttgcctgta	ggttaccattgctctgac	58-57	294	60-50	271-314	5	0,62
MaC-CEN20	(gt) ₁₁	ctaccttgattgccttgct	ctctcttagtcaccctccct	55-55	210	60-50	150-185	8	0,80
MaC-CEN21	(ac) ₉	acaacaacacctgaaagac	tcaccgactaagggaataa	55-55	304	60-50	271-384	3	0,44
MaC-CEN23	(tc) ₁₇	atagaaggaaacgggaaatc	aaaggagtttgttaggaagc	55-55	320	60-50	271-367	5	0,74
MaC-CEN24	(tg) ₇	tgtgaatacagcgagtgaga	aaaactatcagaaggggctc	55-55	191	60-50	244-262	2*	0,32
MaC-CEN25	(ag) ₁₆	gctcatcttacctcttacia	atacctaaatatgctacccc	50-50	226	60-50	268-288	2	0,37
MaC-CEN26	(ct) ₁₉	gcccaattcaacacaagtaa	ccgtaataggatgaggatgc	56-57	170	60-50	202-232	4	0,64
MaC-CEN28	(tg) ₁₂ (ga) ₁₆	ttttgctcatgtttgctag	cgacaaggtttcatctctct	54-54	160	60-50	127-164	5	0,69
MaC-CEN29	(t) ₁₇ (ga) ₁₃	cactcaaccagtagctttcc	gcatagtagccttttctcca	55-55	258	60-50	197-265	6	0,60
MaC-CEN30	(at) ₁₄	tcacagtttctgcgttctc	atagttcctacctggccttt	55-55	320	60-50	215-350	9	0,84
MaC-CEN31	(ga) ₁₂	aattacgagaaggcacagg	ggaaacatgaagtcaaagga	55-55	105	60-50	196-211	3	0,43
MaC-CEN32	(ga) ₁₀	gtgaggtgatgaactaatgga	gccttaccctaactgtctct	55-55	157	60-50	124-160	5	0,71
MaC-CEN33	(ct) ₂₂	tagagccttttgttctgtg	gtttgccttcgtttgttg	56-55	220	60-50	277-340	9	0,86
MaC-CEN34	(ga) ₁₀ .(ga) ₁₆	gagaatggcaaagtgtcaagt	gggtcccagtggttattgtc	55-55	265	60-50	317-353	6	0,78
MÉDIA								5,0	0,61

Tabela 4 - Características dos locos de microssatélites validados em 14 acessos de bananeira desenvolvida da biblioteca Calcutta 4 (MaC-) e da Ouro (MaO-)

(conclusão)									
Nome	SSR	Forward-F (5' - 3')	Reverse-R (5' - 3')	Tm (F-R)	Clone (pb)	Touchdown	Amplitude	A	PIC
MaO-EC02	(ga) ₁₁	ggggaaggtggtgtagga	ggcaaatggaagagaggag	58-57	241	55-45	265-288	4	0,61
MaO-EC05	(ga) ₁₃	tggagtcgcttttgccttt	gtggtgatttccgagtggtt	60-59	164	60-50	130-155	8	0,82
MaO-EC11	(tc) ₁₆	gcacaaccttactcccatcac	cactacaactcaccctccaatc	59-59	243	60-50	224-281	7	0,73
MaO-EH10	(ag) ₁₄	catcccgaagtcacccatct	agcccctctgaaccatcc	60-60	227	60-50	154-180	4	0,47
MaO-FA12	(tc) ₈	cccgtgtattggtgctgtag	gagactgatggcaaaggatg	58-58	285	55-45	347-350	4	0,47
MaO-FB08	(tc) ₁₀	cagcagaataaaagggaagaaa	cacccaaacccagtaggag	58-58	285	55-45	207-360	11	0,73
MaO-FD02	(ac) ₈	ggcatcacacacgcaaaa	attacattcccagccacac	60-60	175	55-45	172-253	5	0,60
MaO-FF10	(ga) ₁₁	ctcctgttcttacctccgtgt	cgtgactggctttactgtg	58-58	221	60-50	187-200	4	0,65
MaO-FG01	(ga) ₁₄	tcgaaaaacccaaaacc	gaagcactcctctcctgtctc	60-60	228	60-50	193-231	9	0,76
MaO-FG09	(ag) ₁₆	ttcttctgaccaccttttc	ccaagtatcacaccaacacca	53-55	150	60-50	163-177	9	0,85
MaO-FH03	(ag) ₁₄	atcacagccctcttgacac	aaccttctctgctttactct	57-55	201	60-50	220-247	6*	0,68
MaO-1G12	(at) ₉ (ag) ₁₃	gcgggattctctgcttac	cccattgcttctctgctac	53-54	124	na	na	na	na
MaO-1G09	(tc) ₁₈	cctctgaccccatcttttg	tttcttgcgtggattaggg	53-53	207	na	na	na	na
MaO-2B08	(ga) ₁₈	agcatctcactcgctcaacc	tctgggctgttctaattgttctc	57-55	187	60-50	168-196	9	0,81
MaO-2B10	(ct) ₁₉	cgtgacttccacctctctcc	gggcttccgctccatac	57-56	271	60-50	264-306	6	0,77
MaO-2C01	(ga) ₂₇	tccaaagaagtcgtccaagaa	ccgttccgataggttgag	54-53	212	60-50	201-231	5	0,71
MaO-2H03	(ag) ₁₈	tttgccagatgagatagaatg	tcttgtaggtggtgatgaag	51-54	198	na	na	na	na
MaO-EC09	(ag) ₂₂	ggactgtatttgtgcttctc	atcatctccagccatctcc	52-54	177	na	na	na	na
MaO-EC12	(ga) ₁₁ .(ga) ₈	aagcagcacgccttatcttg	tatccccaccaccctatcct	56-57	281	60-50	163-190	5	0,58
MaO-ED04	(tg) ₁₀	tgggtctggttttgatggt	ccctcttccaccctttctc	53-55	185	60-50	150-164	5	0,58
MaO-ED09	(ct) ₁₆	cttgattggatgaggagga	cgtgaagtgaatggcaaaa	54-51	243	60-50	215-254	6	0,84
MaO-EH12	(ag) ₁₇	aacccaacaccaaaggaaga	atggaagcatgtggaggaac	54-55	240	60-50	230-269	8	0,80
MÉDIA								6,4	0,69

A: número de alelos, * falhou em alguns acessos, na: não amplificou

Figura 10 - Perfil molecular de alguns locos microssatélites validados derivados da biblioteca de 'Ouro' (MaO-) e 'Calcutta 4' (MaC-). Setas mostram alelos associada ao genoma A e/ou B de bananeira. M: marcador 50 pb

4.5 Caracterização dos locos SSR utilizados na genotipagem do germoplasma

Para a caracterização do germoplasma foram testados inicialmente 21 locos SSR, dos quais apenas 16 (76%) amplificaram produto estáveis e foram utilizados nas análises. Os cinco locos que não amplificaram foram três da série *Mb* (*Mb1-139*, *Mb1-69* e *Mb1-134*) desenvolvidos por BUHARIWALLA et al. (2005) a partir do acesso 'Tani' com genoma BB, um *AGMI24-25* (LAGODA et al., 1998), desenvolvido a partir de 'Calcutta 4' e o loco *MaOCEN09* (CRESTE et al., 2006) derivado do diplóide 'Ouro'. Dos 16 locos que amplificaram, dois foram da série *Ma* (*Ma1-17* e *Ma1-27*), um da série *Mb* (*Mb1-100*), dois da série *AGMI* (*AGMI93/94* e *AGMI67/68*), sete da *MaOCEN* (*MaOCEN01*, *MaOCEN03*, *MaOCEN10*, *MaOCEN12*, *MaOCEN13*, *MaOCEN14* e *MaOCEN19*) e quatro locos desenvolvidos nesse estudo, sendo dois da biblioteca 'Ouro' (*MaO-EC02* e *MaO-FA12*) e dois da 'Calcutta 4' (*MaC-CEN04* e *Ma-CEN06*). Os locos amplificaram entre 6 a 15 alelos, com média de 11 alelos por loco, revelando no total de 182 alelos em 224 acessos (Tabela 5). Creste et al. (2003) utilizaram 11 locos SSR para caracterizar 35 acessos de bananeira observaram 4 a 8 alelos, valores inferiores aos observados neste estudo, possivelmente devido a avaliação de um menor número de acessos e também pela utilização de genotipagem manual, em contraste com o emprego de sequenciador automático, que permite maior precisão na detecção de alelos.

De maneira geral, os locos produziram de um a quatro alelos, sendo que nos diplóides houve a predominância de no máximo dois alelos, enquanto que nos triplóides e tetraplóides revelaram em média três alelos. Este número de alelos não corrobora o observado por Creste et al. (2003), que analisaram acessos com constituição genômica AAA e AAB e Crouch et al. (1999a), no acesso e progênie de 'Obino I Ewai' (AAB), que observaram mais de quatro alelos utilizando locos na sua maioria da série *Ma* (CROUCH et al., 1998). Apesar de detectarem mais de quatro alelos, houve a predominância de locos com um e dois alelos (CROUCH et al., 1998). Os locos de microsatélites desenvolvidos a partir da cultivar 'Ouro', desenvolvidos por Creste et al. (2006), e que foram utilizados majoritariamente neste estudo (nove locos), apresentaram no máximo quatro alelos justificando parcialmente os resultados obtidos.

Tabela 5 - Locos utilizados na caracterização do banco de germoplasma, contendo cauda para marcação com fluorescência, com tamanho do alelo no clone original, variação no tamanho observado entre acessos e número de alelos observados (Na). Regiões sublinhado refere-se a cauda para marcação com as fluorescência FAM, HEX e NED

Nº	Locos	Motivo	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Tamanho dos alelos (pb)		A ¹
					Clone	Obs.	
1	Ma1-17	-	<u>gactatgggcgtgagtgca</u> ttgaggcggggaatcggt	ggcgggagacagatggagtt	126	117-150	11
2	Ma1-27	(GA) ₉	<u>gactatgggcgtgagtgca</u> ttgaatcccaagtttggtcaag	caaaacactgtcccatctc	126	130-162	10
3	AGMI 93/94	(GA) ₁₃	<u>gactatgggcgtgagtgca</u> tacaactaggatggtatgtgtgga	gatctgaggatggttctgttgag	128	135-192	15
4	AGMI 67/68	(GA) ₁₇ (GC) ₂	<u>gactatgggcgtgagtgca</u> tataccttctccgttcttctc	tggaaaccaatcattgatc	156	124-163	10
5	Mb1-100	(TC) ₁₂	<u>ggctaggaaagggttagtg</u> gctcggtggctaataagaggaa	tctcgaggatggtgaaaga	201	207-233	10
6	MaOCEN01	(CT) ₁₇	<u>accaacctaggaaacacag</u> ttctcaggaagggaacaatc	ggaccaaagggaagaaacc	244	237-281	13
7	MaOCEN03	(GA) ₁₀	<u>accaacctaggaaacacag</u> tggaggaaatggaggtcaaca	ttcgggataggaggaggag	215	205-243	9
8	MaOCEN10	(GA) ₁₄	<u>ggctaggaaagggttagtg</u> gcggaagaaagaagtggagaatgaa	tgaatggataaggcagaagaa	205	164-243	14
9	MaOCEN12	(AG) ₉	<u>accaacctaggaaacacag</u> tgcagaaagaacgagaaggaaa	gtggggaggaggcatag	208	205-244	8
10	MaOCEN13	(TC) ₁₆	<u>gactatgggcgtgagtgca</u> tgtctattttgtccttggtg	cttgatgtgggattctgg	141	160-217	11
11	MaOCEN14	(CT) ₁₀	<u>ggctaggaaagggttagtg</u> gctcttttcggtgagtttttg	cgtgggaggaacagtga	196	190-257	14
12	MaOCEN19	(AG) ₉	<u>ggctaggaaagggttagtg</u> gccgaagagcaccacaaagga	gcagcagaagcaagatagca	197	204-246	15
13	MaO-EC02	(GA) ₁₁	<u>ggctaggaaagggttagtg</u> gcggggaagggtggttagga	ggcaaatggaagagaggag	241	250-283	10
14	MaO-FA12	(TC) ₈	<u>accaacctaggaaacacag</u> tcccgtgtattggtgtcgtag	gagactgatggcaaggatg	285	293-344	7
15	MaC-CEN04	(ACC) ₅ (CT) ₁₆	<u>gactatgggcgtgagtgca</u> ttgtcagataggtcggagttg	agtgtctttaggtttcc	175	170-222	15
16	MaC-CEN06	(AG) ₁₃	<u>accaacctaggaaacacag</u> tttctgtctgggtgtctatga	aagggcagttcacacacaa	275	278-305	12
17	MaOCEN09	(GA) ₈	<u>ggctaggaaagggttagtg</u> gcacctgtggcttcgttctg	ttgtccttttcgttatttct	175	na	na
18	Mb1-139	(GA) ₂₁	<u>ggctaggaaagggttagtg</u> gcaggaggatcagaaggagga	cggcttcctctgaagggtcca	190	na	na
19	Mb1-69	(TC) ₁₅	<u>accaacctaggaaacacag</u> tctgcctctccttctccttgga	tccgtgatgctctgactca	386	na	na
20	Mb1-134	(GA) ₂₁	<u>accaacctaggaaacacag</u> tatgcccaagaagggaaggaa	taatgccggaggatcagtgga	398	na	na
21	AGMI24-25	-	<u>accaacctaggaaacacag</u> tttgatgtcacaatggtgttcc	ttaaagggtgggttagcattagg	248	na	na
Média							11,5

¹A: Número de alelos por loco, na: Não amplificou

A bananeira é uma espécie poliplóide e apresenta os três níveis de ploidia, diplóides, triplóides e tetraplóides. A presença de duplicações, inversões e translocações (PERRIER et al., 2009; SHEPHERD, 1999) pode resultar no surgimento de um número maior de alelos por loco do que o esperado. Para quantificar o número de alelos, foi contado o número de acessos que produziram um, dois, três e quatro alelos em cada grupo genômico para os 16 locos avaliados e os resultados foram expressos em proporções de acesso dentro dos números de alelos (Tabela 6).

Os acessos diplóides de constituição genômica BB foram os que apresentaram maior proporção de indivíduos com apenas um alelo, quando comparados com os outros grupos genômicos (Tabela 6). A maior proporção de acessos com apenas um alelo (homozigose) sugere uma menor variabilidade genética nos acessos avaliados, ou a ocorrência de maior número de alelos nulos. Swangpol et al. (2007) utilizando sequências não codificante de genes do cloroplastos detectaram baixo nível de diversidade nos acessos de *M. balbisiana* confirmando este estudo. Carreel et al. (1994) avaliaram 160 diplóides e três espécies (*M. acuminata*, *M. balbisiana* e *M. schizocarpa*) utilizando 30 sondas para análise de RFLP encontraram uma baixa heterozigosidade (2%) nos acessos genoma BB enquanto no genoma AA a heterozigosidade bem maior (60%).

Os acessos diplóides AA cultivados caracterizam-se pela ocorrência de partenocarpia, baixa produção de sementes e maior rendimento de polpa (PERRIER et al., 2009). Acredita-se que esses acessos são híbridos entre diversas subespécies selvagens de *M. acuminata* e estruturalmente apresentam maior heterozigose (PERRIER et al., 2009). No entanto, tanto os acessos diplóides AA, selvagens (S) e cultivados (C) revelaram, na sua maioria, entre um e dois alelos em proporções similares. Nesses acessos, 3,5% de AA (S) e 4,2% para AA (C), apresentaram três alelos. Ambos os grupos, apresentaram baixas proporções (menor que 1%) de acessos com quatro alelos. A discrepância no número de alelos nestes acessos, possivelmente é devido ao fato que muitos deles são ou derivam de subespécies de *Musa acuminata*, que apresentam alterações cromossômicas estruturais com possibilidade de duplicação de locos (SHEPHERD, 1999; PERRIER et al., 2009).

Nos triplóides AAA 52,6% dos acessos avaliados apresentaram dois alelos e o restante ficou distribuído entre três (24,3%) e um alelo (22,7%; Tabela 6). Nos AAB os acessos que apresentaram um, dois e três alelos foram 31,7%, 48,7% e 18,3% respectivamente. Os triplóides ABB apresentaram entre um e dois alelos, em proporções de 41,9% e 39,4%, respectivamente, e 18,4%, apresentaram três alelos (Tabela 6). A maior proporção de acessos ABB com um alelo também foi notada no grupo BB.

Nos tetraplóides, aos contrários dos demais, houve predominância de acessos produzindo dois e três alelos. A maioria dos AAAB e todos AAAA são cultivares híbridos tipo Prata e tipo Gros Michel, respectivamente. Este número de alelos pode derivar da participação de 25% do genoma do acesso diplóide utilizado como genitor masculino no cruzamento e que pode contribuir com alelos exógenos.

De maneira geral, independente da ploidia, houve predominância de acessos produzindo dois alelos, seguidos dos acessos com um alelo, três alelos e uma fração muito pequena dos acessos triplóides apresentaram quatro alelos (0,3 a 1,3%), enquanto que nos tetraplóides, o número de acessos com quatro alelos foi maior, de 3,0% e 15,6% para AAAB e AAAA, respectivamente.

Tabela 6 - Proporção média de acessos por grupo genômico nos locos microssatélites que apresentaram um, dois, três e quatro alelos

Nº Alelos	Grupo genômico ¹							
	BB	AA (S)	AA (C)	AAA	AAB	ABB	AAAB	AAAA
1	0,607	0,413	0,397	0,227	0,317	0,419	0,218	0,141
2	0,352	0,543	0,558	0,526	0,487	0,394	0,470	0,375
3	0,041	0,035	0,042	0,243	0,183	0,184	0,282	0,328
4	0,000	0,009	0,003	0,005	0,013	0,003	0,030	0,156
n	8	23	26	43	56	21	16	4
n _m	7,6	21,6	24,1	42,8	51,0	20	14,6	4

S: Selvagem; C: Cultivado; n: número de amostras avaliadas e n_m: número médio de amostras nos locos avaliados

A alta proporção de acessos produzindo um e dois alelos nos acessos triplóides (maior que 75%) deve estar ligado a suas origens. As cultivares de bananeira foram originados pela hibridação de gametas não reduzidos ($2n$) e gametas reduzidos (n). Esses gametas não reduzidos são formados por processo meiótico anormal, que impede a separação dos cromossomos na anáfase I (restituição da primeira divisão) ou por falha na citocinese (restituição da segunda divisão) resultando em altas proporções de gametas heterozigotos. A formação destes gametas tende a ser maior quando dois genomas diferentes são envolvidos como nos caso dos híbridos AB de *M. acuminata* e *M. balbisiana* ou híbrido entre subespécies de *M. acuminata*, como ocorre nos diplóides cultivados (PERRIER et al., 2009). Os triplóides provavelmente devem resultar da hibridação original entre indivíduos diplóides heterozigotos, como no caso dos diplóides cultivados, com gametas não reduzidos ($2n$), seguida da hibridação com outro indivíduo (n) portador de alelo semelhante ao encontrado no outro parental. Considerando esta hipótese, espera-se que os alelos presentes nos diplóides também estejam presentes nos acessos triplóides e tetraplóides. Isso fica evidenciado quando os alelos mais frequentes nos diplóides cultivados são também observados em frequência crescente nos acessos triplóides e tetraplóides com a participação do genoma de *M. acuminata* (Figura 11). A comparação com acessos diplóides cultivados é justificada pela característica de partenocarpia, esterilidade e rendimento de polpa (PERRIER et al., 2009) como ocorre nos cultivares triplóides e tetraplóides. Além disso, Ortiz, (1997a) estudando a ocorrência de gametas não reduzidos encontraram que todos genótipos que produzem gametas $2n$ também produzem frutos por partenocarpia. Carreel et al. (2001) observaram que muitos triplóides cultivados apresentaram os mesmos padrões mitocondrial e cloroplastidial dos diplóides cultivados. As subespécie *banksii* e *errans* tratada como diplóides cultivados (Tabela 1) estão envolvidas na formação de quase todos os diplóides e triplóides cultivados e variedades partenocárpicas (CARREEL et al., 2002; LEBOT, 1999).

Figura 11 - Distribuição das frequências dos alelos mais comuns nos diplóides cultivados em relação aos diferentes grupos genômicos. S: selvagem e C: cultivado

4.6 Seleção de loco/alelo específicos para o genoma A e B no Banco Ativo de Germoplasma de *Musa* spp.

A seleção de locos associados aos genomas de *Musa acuminata* (genoma A) e/ou de *Musa balbisiana* (genoma B) é de grande interesse na caracterização de germoplasma, identificação precoce de híbridos, estudos de segregação e recombinação. Além disso, marcadores específicos podem ser de grande utilidade para traçar a origem das cultivares, como no caso de marcadores DArT (*Diversity Arrays Technology*), onde marcadores específicos para genoma A permitiram a identificação da subespécie *banksii* na formação dos subgrupo Plátanos (RISTERUCCI et al., 2009).

Para seleção de locos genoma-específico foram avaliados 65 acessos AA, 8 BB, 21 ABB, 57 AAB, 4 AAAA e 17 AAAB, cuja constituição genômica e ploidia tinha sido comprovada previamente neste estudo. Dos 16 locos avaliados, oito se destacaram como possuindo alelo específico para identificação dos genomas A e/ou B (*MaOCEN13*, *MaC-CEN06*, *MaO-FA12*, *MaOCEN03*, *MaOCEN12*, *Ma1/17*, *MaOCEN14* e *AGMI93/94*;

Tabela 7). Desses os alelos *MaOCEN03*, *MaOCEN12*, *MaOCEN13* e *MaOCEN14* haviam sido indicados como genoma específico por Creste et al. (2006).

A definição de loco/alelo genoma B específico pressupõe que a maioria dos acessos dentro do grupo BB apresentam este alelo, considerando a baixa variabilidade existente neste grupo (SWANGPOL et al. 2007). Com isso, é esperado que a frequência do alelo específico para genoma B seja alta nos acesso ABB. O alelo de 172 pb do loco *MaOCEN13* estava presente em 67 (60%) dos acessos com apenas o genoma A e em 68 (61%) quando os genomas A e B estão presentes e ausente nos BB. Dois outros alelos, com 207 e 217pb respectivamente, apareceram em todos os acessos BB, em nove acessos (43%) do grupo ABB, oito (14%) dos AAB, e ausente nos AAAB. Creste et al. (2006) também encontraram alelo específico para o genoma B utilizando o loco *MaOCEN13* em 10 acessos avaliados. Devido a baixa proporção de acessos com genoma B no presente estudo, é mais viável a utilização do alelo 172 pb como genoma A específico (Tabela 7).

O loco *MaC-CEN06* também apresentou alelo com comportamento semelhante, com o alelo de 280 pb presente em 69 (62%) dos acessos com apenas o genoma A, e 79 (77%) nos acessos híbridos contendo os dois genomas (A e B). Apesar da alta frequência desse alelo nos ABB (90%), trata-se realmente de um alelo genoma A específico, pois nos acessos possuindo cópias do genoma B foram detectados dois alelos (284 e 286 pb), presentes em todos acessos BB; em 19 (90%) dos ABB, 32 (54%) dos AAB e cinco dos AAAB (29%; Tabela 7).

O terceiro loco com capacidade de discriminação foi o *MaO-FA12*, que apresentou três alelos, 305, 309 e 318 pb. Os alelos de 305 e 318 pb se mostraram específicos para o genoma A, enquanto que o alelo 309 mostrou-se específico para o genoma B, presente em 88% e 86% dos acessos BB e ABB, respectivamente, e com baixa frequência (10%) nos acessos com genoma A (Tabela 7).

O quarto loco a se destacar foi o *MaOCEN03* com o alelo (205 pb) presente em 100% dos acessos com o genoma BB e ABB, 95% nos do grupo AAB, e em 88% dos acessos AAAB. Poucos acessos com genoma A apresentaram esse alelo (16%). Diferentemente, o alelo de 231 pb mostrou-se específico para o genoma A, fazendo

parte de 78% dos acessos com apenas o genoma A, e 28% dos grupos com genoma A e B (AAB e AAAB, principalmente) (Tabela 7).

O loco *MaOCEN12* apresentou quatro alelos (218, 226, 240 e 244 pb), sendo que os dois primeiros estavam presentes em 79% e 66% dos acessos com genoma A, respectivamente. Os alelos de 240 e 244 pb são característicos do genoma B, estando presentes apenas em 0,9% dos acessos com genoma A. Comportamento similar foi observado para o loco *MaOCEN14*, cujo genoma A foi caracterizado pela presença de três alelos (214, 218 e 223 pb) em alta frequência nos acessos com pelo menos um genoma A, enquanto outros quatro alelos (249, 253, 255 e 257pb) foram encontrados em baixa frequência nos acessos contendo apenas genoma A de *Musa acuminata* (2%), caracterizando assim, a sua predominância na presença do genoma B. O loco *AGMI93/94* apresentou um alelo de 166 pb presente em 58% dos acessos possuindo genoma B, e em 2% nos acessos com o genoma A (Tabela 7).

Apesar dos locos citados apresentarem alelos associados a um genoma específico (A ou B), poucos locos/alelos poderiam ser utilizados isoladamente para a identificação dos genomas. Porém, em conjunto esses locos apresentam grande potencial para a caracterização de bancos de germoplasma. Para uma análise individual, os locos mais promissores para a detecção da presença do genoma A foram os locos *MaC-CEN06* (desenvolvido no presente estudo); *MaOCEN12* e *MaOCEN14* (Creste et al., 2006) com os alelos específicos de 280 pb, 226 pb e 214 pb, respectivamente e para o genoma B, destacam-se os locos *MaOCEN03* (Creste et al., 2006) e *MaOCEN12* (Creste et al., 2006) com os alelos específicos de 205 pb e 240 pb respectivamente.

Tabela 7 - Número de acessos dentro de cada grupo genômico para locos microssatélites específicos para caracterização da constituição genômica

Locos	Alelos pb	Nº acesso/grupo genômico								
		AA (65)	AAA (42)	AAAA (4)	Total (111)	BB (8)	ABB (21)	AAB (57)	AAAB (17)	Total (103)
<i>MaOCEN13</i>	172	28	35	4	67	0	15	41	12	68
<i>MaOCEN13</i>	207-217	0	0	0	0	8	9	8	0	25
<i>MaC-CEN06</i>	280	24	41	4	69	0	19	47	13	79
<i>MaC-CEN06</i>	284-286	14	0	0	14	9	19	32	5	65
<i>MaO-FA12</i>	305	25	36	4	65	0	6	27	11	44
<i>MaO-FA12</i>	309	10	5	1	16	7	18	24	2	51
<i>MaO-FA12</i>	318	39	31	4	74	0	10	33	10	53
<i>MaOCEN03</i>	205	13	5	0	18	8	21	54	15	98
<i>MaOCEN03</i>	231	46	37	4	87	1	0	22	6	29
<i>MaOCEN12</i>	218	46	38	4	88	0	13	12	3	28
<i>MaOCEN12</i>	226	35	34	4	73	0	8	51	16	75
<i>MaOCEN12</i>	240	0	1	0	1	6	17	50	16	89
<i>MaOCEN12</i>	244	0	0	0	0	3	13	6	2	24
<i>MaOCEN14</i>	214	35	41	4	80	0	3	44	15	62
<i>MaOCEN14</i>	218	10	13	4	27	0	5	25	16	46
<i>MaOCEN14</i>	223	25	21	0	46	0	0	13	1	14
<i>MaOCEN14</i>	227	10	10	4	24	0	0	3	1	4
<i>MaOCEN14</i>	249	1	0	0	1	0	14	23	12	49
<i>MaOCEN14</i>	253	0	0	0	0	2	8	5	0	15
<i>MaOCEN14</i>	255	0	1	0	1	6	16	17	2	41
<i>MaOCEN14</i>	257	0	0	0	0	6	3	10	3	22
<i>AGMI93/94</i>	166	2	0	0	2	7	14	24	15	60

4.7 Diversidade genética entre grupos genômicos

O banco de germoplasma da Embrapa apresenta uma ampla variabilidade morfológica de acessos diplóides, triplóides e uma minoria de acessos tetraplóides. Foram utilizados 16 locos SSR para a caracterização 224 acessos. Para saber se o número de marcadores foi suficiente para a caracterização os 182 alelos revelados foram transformados em dados binários para gerar uma matriz de dissimilaridade empregando o coeficiente de *Jaccard*.

Os dados binários foram submetidos a uma análise reamostragem que consiste em simular várias matrizes a partir de um número determinado de marcadores e correlacioná-la com a matriz original. O ajuste entre essas matrizes é determinado pelo valor de estresse (E). De acordo com Kruskal (1964), um valor de $E \leq 0,05$ é indicativo de uma excelente precisão nas estimativas. Dos 182 marcadores utilizados, 170 marcadores deram uma estimativa de correlação de 0,99 entre as matrizes e um baixo valor de estresse de 0,0575 (Figura 12) para os 224 acessos avaliados. Resultado semelhante foi obtido por Amorim et al. (2008) utilizando 15 locos microssatélites (113 marcadores) em 38 diplóides de bananeira, e encontraram que 106 marcadores eram suficiente para ter uma correlação de 0,98 e estresse de 0,0475. Porém, um número bem maior de marcadores foi necessário para ter uma correlação dessa magnitude quando Amorim et al., (2009) avaliaram 42 acesso de bananeira para o conteúdo de carotenóides utilizando marcadores DArT que se baseiam na hibridização de DNA/DNA (JACCOUD et al., 2001; WENZL et al., 2004). Naquele estudo encontraram que 282 marcadores dos 653 marcadores avaliados, eram suficientes para ter uma correlação de 0,96 e um estresse 0,052. Risterucci et al. (2009) baseando-se na mesma técnica, utilizou 836 marcadores DArT para explicar a diversidade de 173 acessos de bananeira embora não tenha demonstrado o número mínimo de marcas que pudesse explicar a diversidade encontrada.

Essa disparidade em relação a maior quantidade de marcadores DArT e SSR pode ser justificada pela presença de clones redundantes, ou seja, múltiplas cópias do mesmo marcador presente nos clones isolados (JACCOUD et al., 2001; WENZL et al., 2004). Semagn et al. (2006) mapeando uma população duplo-haplóide de trigo com

marcadores AFLP, SSR e DArT, encontraram uma alta proporção de marcadores DArT (3 a 15% maior que os SSR) vizinhos em um mesmo grupo de ligação, sugerindo que isso pode estar relacionado a presença clones redundantes na representação genômica. Em um mapa genético de cevada essa a proporção de marcadores redundantes foi de 38% (WENZL et al., 2006).

Figura 12 - Análise por reamostragem para obtenção do número ótimo de marcadores que possa representar a diversidade dos acessos. Linha tracejada mostra o número ótimo de marcador (170) onde a correlação foi de 0,99 e estresse menor 0,0575

Uma ampla variabilidade foi detectada pelos locos SSR utilizados. A matriz de dissimilaridade obtida pelo índice de *Jaccard* variou 0,0 a 1,0, com média de 0,76 entre os pares de acessos (Figura 13). Dentro dos grupos genômicos, destacam-se os acessos diplóides de *M. acuminata* como os mais divergentes, com dissimilaridade média de 0,81, variando de 0,18 a 0,98. Em seguida, dos triplóides AAB apresentaram média de dissimilaridade de 0,65 variando de 0 a 0,95; os acessos AAA apresentaram média 0,60, variando de 0,03 a 0,90; ABB com média de 0,52 variando de 0 a 0,80 e por

último os acessos BB, com média de 0,47, e dissimilaridade variando de 0,25 a 0,69 (Figura 13). Esse resultado confirma a maior diversidade dos grupos AA, que se diversificou em várias subespécies quando comprada aos grupos BB. As menores dissimilaridades médias (< 28%) foram observadas entre os acessos que compõem os subgrupos dos Plátanos, Prata, Cavendish, Gros Michel e Figo (Figura 13).

Os subgrupos de bananeira se caracterizam por ser compostos por indivíduos que se originaram de um ancestral comum por mutações somáticas e compartilham de características similares, justificando as poucas diferenças genéticas entre eles. Altas similaridades dentro dos subgrupos tem sido relatadas. Ning et al. (2007) avaliaram 216 acessos de bananas com 10 locos SSR, e encontraram alta similaridade dentro do subgrupo Cavendish, enquanto Creste et al., (2003) usaram 11 locos em 35 acessos de bananeira encontraram alta similaridade também para os subgrupo Prata, Gros Michel e Grande Naine. No subgrupo dos Plátanos, também foi relatado por Oriero et al., (2006), que utilizaram *primers* derivados de *M. balbisiana* em 40 acessos do IITA, e por Crouch et al. (2000) utilizando RAPD para caracterizar 76 plátanos. Noyer et al. (2005) avaliaram 30 plátanos utilizando nove locos microsatélites e não encontraram polimorfismo para oito locos utilizados. Apesar desse baixo polimorfismo DNA no subgrupo dos plátanos, grandes diferenças morfológicas existem para inflorescência (ORTIZ, 1997b), altura da planta e do cacho (CROUCH et al., 2000).

Figura 13 - Distribuição da dissimilaridade entre pares de acessos para os principais grupos genômicos e todos os grupos juntos (geral). Média total, dos subgrupos (amplitude) para pares de dissimilaridade estão em destaques. Eixo da abscissa mostra a dissimilaridade e eixo da ordenadas número de pares de acessos dentro de cada dissimilaridade

4.8 Relações genéticas entre os acessos de bananeira

Para caracterizar os acessos de bananeira do banco de germoplasma foram utilizadas duas estratégias de análises. A primeira consistiu em uma análise de diversidade, onde a matriz de dissimilaridade obtida pelo índice de Jaccard foi utilizada para gerar um dendrograma utilizando como método de agrupamento *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987). A utilização dos marcadores microssatélites como marcadores codominantes é limitada pelas múltiplas ploidias e presença de locos duplicados, e restringem a exploração do estabelecimento das relações genéticas entre acessos. O programa *Structure* utiliza um modelo Bayesiano implementado que permite a análise de múltiplas ploidias, verificando a presença de estrutura na população em estudo. Um dos grandes pontos deste programa é que, além de identificar os grupos (subpopulações) que compõem a população, este programa permite a estimar a fração do genoma de uma unidade taxonômica que pode ser derivada de uma das inferidas subpopulações (k), abrindo a possibilidade de estabelecer as relações genéticas entre os diversos acessos que compõem o banco da Embrapa.

A análise de agrupamento derivada da dissimilaridade de Jaccard permitiu a separação em dois grandes grupos: o primeiro correspondendo aos acessos que contêm exclusivamente o genoma A, e o segundo pelos acessos que possuem pelo menos uma cópia do genoma B (Figura 14). Dentro dos dois grandes grupos, os *clusters* foram formados em função da constituição genômica e níveis de ploidia dos acessos (AA, BB, ABB, AAB, AAA, AAAB e AAAA) estabelecidos com base nos descritores morfológicos. Tal resultado possivelmente deriva do fato que alelos de nove dos 16 locos de microssatélites analisados, estão associados à ocorrência do genoma A ou B (CRESTE et al., 2006). Dentro de cada grupo genômico foi possível identificar os seguintes subgrupos: Prata (*Pome*) e híbridos derivados de Prata (que nas discussões subsequentes serão denominados tipo Prata); Plátanos (*Platain*); Maçã (*Silk*); Pisang Awak; Figo (*Bluggoe*); Cavendish e Gros Michel (Figura 14).

Para análise de estrutura da população empregando o *Structure*, foram testados k (subpopulações) variando de 2 a 30. Para estimação do número de subpopulações, utiliza-se o maior valor das estimativas do logaritmo da verossimilhança ($\ln P(D)$).

Porém, nos acessos avaliados o valor de $\ln P(D)$ atinge um *plateau* e o $\ln (X/K)$ continuou crescendo juntamente com as variâncias entre os diferentes k testados (Figura 15A). Nesta situação, o número de subpopulações (k) ficou entre 16 a 23. O método que computa a segunda ordem de mudança da verossimilhança (Δk) é mais sensível que o método anterior para detectar o número subpopulações, quando este fato ocorre (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Utilizando esse método, o valor de Δk atingiu um pico máximo quando o $k = 21$ (Figura 15B).

Dos 21 grupos formando pelo *Structure*, seis foram de acessos diplóides, nove por triplóides e/ou tetraplóides, e outros seis apresentaram grupos mistos (diplóides e triplóides). Essencialmente, os grupos dos triplóides e/ou tetraplóides foram formados pelos subgrupos tipo Prata (*Pome*), Cavendish e Gros Michel, Plátano, Figo (*Bluggoe*) e Pisang awak (Figura 16). De maneira geral, os grupos formados nesta análise Bayesiana foram os mesmos apresentados pelo dendrograma (Figura 14 e Figura 16). Sendo assim, os resultados serão discutidos conjuntamente para cada grupo formado. Inicialmente serão discutidos os grupos dos triplóides e tetraplóides, e posteriormente os grupos dos diplóides.

Figura 15 - Escolha do mais provável número de subpopulações (k) nos acessos avaliados. A) Médias dos valores de $\ln P(X/K)$ de 10 corridas independentes para cada k . B) Plotagem dos valores de Δk para cada k baseado na segunda ordem de mudança da função de verossimilhança

4.8.1 Relações genéticas nos acessos triplóides

O subgrupo tipo Prata se caracteriza por apresentar banana com aroma suave, doce, pouco ácida e de digestão leve, sendo muito apreciadas no Nordeste brasileiro (MOREIRA, 1999). Pela análise de agrupamento foram identificados 32 acessos (Figura 14), dos quais 15 possuíam subgrupo já relatado (Tabela 1): ‘Walha’ (nº 30), ‘Prata Maceió’ (nº 50), ‘Prata Comum’ (nº 51), ‘Prata Anã’ (nº 53), ‘Pratão’ (nº 47), ‘Prata Santa Maria’ (nº 48), ‘Prata Ponta Aparada’ (nº 49), ‘Prata IAC’ (nº 52), ‘Prata Branca’ (nº 54), ‘Pacovan’ (nº 59), ‘Ouro da Mata’ (nº 85), ‘Prata Anã 1’ (nº 198), ‘Prata Anã 2’ (nº 199), ‘Prata Manteiga’ (nº 193) e ‘Prata Maçã’ (nº 196). Outros nove híbridos derivados de ‘Prata Anã’ e/ou da ‘Pacovan’ (mutante da Prata) foram incluídos neste subgrupo, sendo quatro derivados de Prata Anã, representado pela ‘PA42-44’ (nº 84), ‘Garantida’ (nº 88), FHIA-01’ (nº 92) e ‘FHIA-18’ (nº 90), e outros cinco híbridos obtidos a partir da ‘Pacovan’, representado pela ‘Preciosa’ (nº 80), ‘Pacovan Ken’ (nº 83 e nº 200), ‘PV42-114’ (nº 209) e ‘PV03-76’ (nº 210). Além destes, outros oito acessos cuja constituição genômica ainda não tinha sido avaliada também foram incluídos neste grupo: ‘Sempre Verde’ (nº 42), ‘Padath’ (nº 58), ‘FHIA-02’ (nº 91), ‘Azedinha’ (nº 123), ‘Giral’ (nº 168), Verde’ (nº 197), ‘Pacha Nadan’ (nº 202) e ‘Pisang Ceylan’ (nº 206).

Este mesmo agrupamento foi evidenciado na análise pelo *Structur*. Porém, e a ancestralidade dos híbridos tetraplóides desenvolvidos pela Embrapa foi inferida precisamente nos grupos onde estavam alocados os genitores masculinos ‘M53’ (Grupo IV) e ‘Calcutta 4’ (Grupo XI). Fato interessante é que estes híbridos (AAAB) são resultantes do cruzamento de um genitor feminino triplóide (AAB), produzindo gametas não reduzidos, com um genitor masculino diplóide (AA), com gametas reduzidos. Assim, é de se esperar que os tetraplóides apresentem 25% do genoma provenientes dos acessos diplóides, fato este evidenciado no gráfico gerado pelo *Structure* (Grupo XX; Figura 16). Os triplóides ‘Prata Manteiga’ e os tetraplóides ‘Azedinha’, ‘Prata Maçã’ e híbrido natural ‘Ouro da Mata’ (SILVA et al., 1999c) apresentaram ancestralidade nos diplóides do grupo II (Figura 16). Isto pode ser explorado pelos programas de melhoramento visando a obtenção de híbrido tipo Prata, com características semelhante a estas cultivares utilizando como genitor masculino um dos cinco acessos diplóides do

grupo II. No caso dos híbridos da FHIA cujos parentais diplóides não estão representados neste estudo, apresentaram ancestralidade nos grupos X, XVI e XIX (Figura 16).

O acesso 'FHIA-02' (nº 91) é relatada como sendo um híbrido AAAA desenvolvido pela *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola* (FHIA), resultante do cruzamento da 'Williams' com o diplóide SH3393 e tem características do subgrupo Cavendish (CRUZ et al., 2007). Porém, não se trata do mesmo acesso, pois tanto pela análise empregando a digestão da região ITS do rDNA com enzima de restrição como por microssatélites, o FHIA 02 se comporta como um híbrido AAAB, provavelmente do subgrupo Prata (Tabela 2 e Figura 14). Também os dois acessos denominados de Pacovan Ken (nº 83 e 200), apresentaram uma dissimilaridade de 19%. Possivelmente se trata de algum outro híbrido desenvolvendo pela Embrapa da série PV (Pacovan), conforme Silva et al. (2003).

O subgrupo de maior importância econômica por ser a única cultivar de valor no mercado para exportação são as cultivares pertencentes ao subgrupo Cavendish e Gros Michel. Em relação aos agrupamentos formados no dendrograma, nota-se que os subgrupos Gros Michel e Cavendish ficaram no mesmo grupo, porém separados em dois pequenos agrupamentos (Figura 14). O primeiro agrupamento contém 10 acessos de Cavendish (AAA), sendo seis previamente relatados a este subgrupo (Tabela 1): 'Valery' (nº 100), 'Poyo' (nº 110), 'Nanicão' (nº 115), 'Lacatan' (nº 122), 'Grande Naine' (nº 127), 'Williams' (nº 208) e quatro sem subgrupo definido: 'Umbuk' (101), 'Pirua' (nº 111), 'Imperial' (nº 124) e 'Canela' (nº 133). O segundo agrupamento inclui os acessos do subgrupo Gros Michel (AAA), representados por oito acessos, sendo dois cultivares triplóides ['Gros Michel' (nº 126) e 'Highgate' (nº 125)] e quatro híbridos tetraplóides ('High Gate' x 2n), representados pelas cultivares IC-2' (nº 93), 'Calypso' (nº 94), 'Bucaneiro' (nº 95) e 'Ambrosia' (nº 96). Outros dois acessos representados pelo triplóide 'Roombum' (nº 109) e 'Amritsagar' (nº 136) também se localizaram nesse agrupamento. O acesso diplóide 'Lareina BT100' (nº 205) foi localizado entre os agrupamentos contendo os Cavendish e Gros Michel (Tabela 1; Figura 14). O acesso 'Lareina BT100' na primeira análise de citometria de fluxo mostrou-se como mixoploide (2x e 4x) e posteriormente em uma segunda análise confirmou sua ploidia com sendo

diplóide. O agrupamento deste diplóide com estes dois subgrupos abre uma grande possibilidade para seu uso nos programas de melhoramento visando principalmente a obtenção de cultivares tipo Cavendish utilizando metodologia não convencional de melhoramento como a duplicação de cromossomos em virtude da esterilidade deste subgrupo que impossibilita a obtenção de híbridos utilizando métodos clássicos de melhoramento.

Quando se utilizou o programa *Structure*, não houve separação dos acessos que compõem os dois subgrupos citados (Figura 16). Como ocorrido com o subgrupo do tipo Prata, todos os híbridos tetraplóides (AAAA) da Gros Michel (nº 94, 95 e 96) apresentaram ancestralidade no grupo VI, enquanto o híbrido IC-2 apresentou ancestralidade no grupo II. Interessantemente, os acessos triplóides ‘Umbuk’ e ‘Amritsagar’, que se agruparam com os subgrupos Cavendish e Gros Michel, apresentaram ancestralidade nos grupos I (diplóides) e IX (diplóides e triplóides), respectivamente. Os diplóides destes dois agrupamentos podem ser os potenciais parentais destes dois acessos e podem ser utilizados para programas de melhoramento convencional (Gros Michel) ou hibridação somática (Cavendish).

O termo plátano tem sido utilizado para acessos triplóides AAB e ABB, cujos frutos apresentam uma quantidade elevada de amido quando comparados as bananas destinadas ao consumo *in natura*, como o subgrupo Prata, Maçã, Gros Michel e Cavendish (SUESCÚN,1993), devendo ser consumidos preferencialmente cozidos ou fritos. No grupo AAB, destacam-se os Plátanos, e no ABB, os subgrupos Pisang awak e Bluggoe (Figo). Estes dois subgrupos também têm sido utilizados largamente como bananas para fabricação de cerveja (*beer banana*) nas regiões de Uganda, Rwanda, Burundi e Tanzânia (KARAMURA et al., 1998).

O subgrupo dos plátanos AAB engloba banana cujos frutos são os mais compridos e de polpa consistente e de cor rosada. Os grupos formando pela análise de agrupamento incluíram 14 acessos, sendo nove previamente descritos como pertencendo ao subgrupo dos Plátanos (Tabela 1): ‘Terrinha’ (nº 39), ‘Terra sem Nome’ (nº 40), ‘Red Yade’ (nº 45), ‘Plantain’ (nº 56), ‘Mongolo’ (nº 63), ‘Curare Enano’ (nº 74), ‘Chifre de Vaca’ (nº 76), ‘Adimo’ (nº 77) e híbrido AAAB ‘FHIA-21’ (nº 89), e cinco outros ainda não descritos como parte desse subgrupo (Tabela 1): ‘Trois Vert’ (nº 34), ‘Tipo

Velhaca' (nº 36), 'Samurá' (nº 44), 'Pinha' (nº 57) e 'Comprida' (nº 75). Neste agrupamento, dois acessos (nº 45 e 63) mostraram ser 100% idênticos pelos locos analisados (Figura 14). Esse mesmo agrupamento também foi verificado pela análise conduzida pelo *Structure* (grupo IV). Nesse caso, apenas o híbrido tetraplóide AAAB FHIA-21 apresentou ancestralidade nos grupos V e VI.

O subgrupo Pisang awak (ABB) é favorecido em regiões da Ásia não só pelas qualidades dos frutos, mas também porque as plantas são robustas, resistente a doença foliares, porém suscetível a raça 1 do *Fusarium* (ROWE e ROSALES, 1995), produzem bem em condições adversas como seca (KARAMURA et al., 1998). No dendrograma (Figura 14) seis acessos foram incluídos, sendo três acessos previamente descritos como membros desse subgrupo (Tabela 1): 'Namwa Khom' (nº 13), 'Gia Hui' (nº 19) e 'Muisa Tia' (nº 15), e outros três cujo subgrupo não havia sido descrito: 'Prata Zulu' (nº 10), 'Namwa Daeng' (nº 14) e 'Tai' (nº 41). Esse agrupamento mostrou-se bastante uniforme pela análise pelo *Structure* (Grupo III; Figura 16). É provável que dentro deste subgrupo existam acessos duplicado, pois o acesso 'Tai' é também conhecido como 'Awak', 'Gia Hui', 'Muisa Tia', 'Yawa', 'Namwa Daeng' (SILVA et al., 1999a), além disso, os acessos 'Muisa Tia' e 'Gia Hui' demonstraram ser idênticos para os locos SSR utilizados (Figura 14). Poucas diferenças foram observadas quando 53 descritores qualitativos (caracteres da planta, cacho, coração e frutos) foram comparados entre estes acessos (SILVA et al., 1999b).

O subgrupo Figo (Bluggoe), também de genoma ABB, se caracteriza por clones vigorosos, cachos com poucas pencas (usualmente quatro a sete pencas), frutos pequenos retos, polpa amilácea e ácida quando madura, e de consumo cru ou cozido, e constituem em uma importante fonte alimentar em Samoa, Filipinas, Sul da Índia e Antilhas (SUESCÚN et al., 1993; PLOETZ et al., 2007). O agrupamento gerado incluiu seis acessos já classificados como Figo (Tabela 1): 'Poteau Nain' (nº 11), 'Figo Cinza' (nº 20), 'Espermo' (nº 21), 'Champa Madras' (nº 22), 'Cachaco' (nº 23) e 'Cacambou Naine' (nº 24), além de outros sete de classificação desconhecida: 'Monthan' (nº 16), 'Ice Cream' (nº 17), 'Ice Cream' (nº 18), 'Abuperak' (nº 26), 'Pitogo' (nº 201), 'Njok Kon' (nº 203) e 'Marmelo' (nº 204). Os acessos de nº 11, 16; 20, 21 e 24 não diferiram entre si para os locos SSR utilizados. É provável que estes acessos estejam duplicados ou os

locos utilizados não permitiram acessar as diferenças entre eles. Quanto a análise pelo *Structure*, todos estes acessos foram agrupados com os oito acessos diplóides BB, avaliados apesar da separação desses acessos em grupos diferentes pela análise de agrupamento (Figura 14 e Figura 16). No Brasil, a banana 'Figo Cinza' é cultivada em pequena escala. As plantas possuem de 3,5 a 4 m de altura, engão longo, frutos curtos, com casca grossa e revestida de cera, sendo a polpa de cor creme-pálida, doce e macia. Uma característica marcante é a presença de quinas proeminentes quando maduros (SILVA et al., 1999). A banan Figo apresenta pouca importância econômica, mas possui grande interesse para os programas de melhoramento devido sua resistências as sigatokas amarela e negra (GOMES 2002).`

O subgrupo Maçã (AAB) é caracterizado por frutos com casca fina e de cor amarelo claro, polpa branca e sabor ácido adstringente. Esse agrupamento foi formado por sete acessos: 'IAC' (nº 27), 'Yangambi n.2' (nº 28), 'Kingala n.1' (nº 67), 'Maçã Caule Roxo' (nº 65) e os tetraplóides AAAB representados pelos acessos 'Tropical' (nº 79), 'Porp' (nº 81) e 'Platina' (nº 82) (Figura 14).

Outroagrupamento conteve os acessos associados a Mysore (AAB), com os acessos triplóides 'Mysore', 'Thap Maeo', 'Poovan' e o tetraplóide 'Langka'. A 'Thap Maeo' é uma variante da 'Mysore', enquanto quea 'Poovan' já foi descrita como pertencente ao subgrupo Maçã/Mysore (MGIS, 2009; Tabela 1), e aqui foi incluída no agrupamento do subgrupo Mysore (Figura 14). De acordo com o banco de dados de Musa (MGIS, 2009), otetraplóide Langkademostrou muitas características em comum com acessos pertencente a este grupo, tais como cacho compacto e com muitas pencas, pseudocaule amarelo alaranjado e folha verde escura (JESUS et al., 2006).

Tanto os acessos do subgrupo Maçã como os do subgrupo Mysore foram incluídos no grupo XVI pela análise do *Structure*. (Figura 16). Há algumas justificativas para esse agrupamento. Por exemplo, o acesso IAC foi o primeiro híbrido de bananeira obtido no Brasil em 1984, resultante do cruzamento ente 'Maçã' com um diplóide de *Musa balbisiana* (MOREIRA, 1999). Essa origem híbrida foi comprovada pela análise, pois esse acesso apresentou parte do seu genoma com ancestralidade no grupo formado pelos acessos BB (Figura 16). A 'Mysore' é uma variante a 'Thap Maeo', e a 'Langka' e 'Poovan' mostraram ser muito similares geneticamente, e apresentaram uma

contribuição elevada (40%) do grupo V em seu genoma. Porém, pouco pode se inferir sobre essa percentagem, já que o grupo V se mostrou bastante heterogêneo (Figura 16). A cultivar Tropical é um híbrido da Yangambi n.2 (subgrupo Maçã) com o diplóide M53, e demonstrou possuir uma proporção elevada (~50%) de contribuição de *Musa acuminata* (M53), ao invés de 25% esperado, o que poderia justificar a ausência do genoma B quando avaliado pela análise de por diegção das regiões ITS (Figura 6 e Figura 16), com predominância do genoma A. O híbrido 'Platina' apresentou ancestralidade de 25% num agrupamento dos diplóides (grupo II). Curiosamente, a 'Maçã Caule Roxo' apresentou uma ancestralidade de ~25% com no grupo III, que contém o subgrupo Pisang awak.

Outros dois agrupamentos foram formados com acessos do grupo genômico AAA. Um agrupamento incluiu sete acessos, 'Figue Rose Naine' (nº 72), 'Muga' (nº 117), 'Leite' (nº 121), 'Cocos' (nº 130), 'Caru Verde' (nº 131), 'Caru Roxa' (nº 132), juntamente com um diplóide Fako-Fako (nº 190). Possivelmente, trata-se do subgrupo contendo acessos com fruto vermelho (red), englobando 'Caru verde', 'Caru roxa', 'Figue Rose Naine' (Figura 14 e Tabela 1). Observações em campo demonstram que estes acessos são similares morfologicamente. Este subgrupo se caracteriza por apresentar plantas vigorosas, com pseudocaule vermelho, e cacho de moderado tamanho, suscetíveis ao mal do Panamá, e resistente a mal de Sigatoka, e com pouca importância econômica, sendo utilizada como ornamental no Havaí e algumas regiões do Pacífico (BALLESTERO, 1985; PLOETZ et al., 2007). A 'Caru Roxa' apresenta plantas revestidas com uma cor rosada, e seus frutos são roxos, chegando ao laranja claro quando maduros (MOREIRA, 1999; PLOETZ et al., 2007), podendo ser consumidos cru ou cozidos (PLOETZ et al., 2007). Também apresentam alta produção de sementes quando polinizadas (SHEPHERD 1999). A 'Caru Roxa' e 'Caru Verde' são relacionadas geneticamente, e pode ocorrer que plantas roxas mudarem para o verde (SIMMONDS, 1966). No *Structure* estes acessos se agruparam a 18 diplóides cultivados (Figura 16), e apenas os acessos triplóides Muga e Leite apresentaram forte ancestralidade no grupo XXI.

O segundo agrupamento do dendrograma foi constituído pelos acessos triplóides 'Wasolay' (nº 98), 'Walebo' (nº 99), 'Towoolee' (nº 104), 'Torp' (nº 105), 'Pagatow' (nº

112), 'Ouro Mel' (nº 113), 'Orotawa' (nº 114), 'Nam' (Prata Baby)' (nº 116), 'Morong' (nº 118), 'Markatooa' (nº 119), 'Dodoga' (nº 129), e 'Bakar' (nº 134). Juntamente a estes acessos foi agrupado o 'Sapon' (nº 107) no grupo XXI do *Structure* (Figura 16). Apenas os os acessos 'Sapon', 'Nam', 'Orotawa' e 'Ouro Mel' se mostraram bastante heterozigóticas, indicado pelas múltiplas ancestralidades presentes (Figura 16). Esses acessos são provenientes, na sua maioria, da Nova Guiné, e não possuem subgrupos definidos (Tabela 1). O acesso 'Towoolee', embora não inserido em nenhum subgrupo, apresentou um padrão citoplasmático e mitocondrial não encontrado em nenhum dos acessos avaliados (CARREEL et al., 2002). Os acessos 'Dodoga' e 'Walebo' são muito similares, e provavelmente diferiram por mutações, e não se trata de sinonímia (Figura 14), e possuem também uma quantidade apreciável de pólen e fertilidade feminina (SHEPHERD, 1999), indicando seus potenciais para ações de melhoramento, tanto como genitor feminino como também masculino. Os acessos 'Wasolay', 'Nam' (Prata Baby), 'Towoolee' e 'Markatooa' apresentaram aspectos semelhantes para altura de planta, diâmetro do pseudocaule, diâmetro e peso do fruto, peso e do engaço, número de pencas, número de frutos e peso do cacho (MATTOS et al., 2009) (Figura 14 e Figura 16).

O agrupamento Ibota compreendem os acessos 'Yangambi km 5' (nº 97) e 'Caipira' (nº 103) (Tabela 1), e associando também o acesso AAB 'Thong Ruong' (nº 38), e os diplóide AA 'Thong Dok Mak' (nº 170) (Figura 14). Porém, o grupo XIV do *Structure* incluiu o acesso 'Lidi' (nº 184), 'Tjau Lagada' (nº 169) e 'Pisang Nangka' (nº 207), sendo que esses dois últimos apresentaram ancestralidade em diversos grupos (V, VII, VIII e XVII) (Figura 16). Creste et al. (2003) também observaram o agrupamento do diplóide 'Lidi' com a 'Caipira', utilizados 11 locos de microssatélites, porém com baixa similaridade (20%). O acesso 'Pisang Nangka' apresenta um comportamento duvidoso em relação a sua ploidia e composição genômica. Creste et al. (2004) apontam para a possibilidade desse acesso está erroneamente classificado no banco de germoplasma com base na informação do banco do INIBAP, que o cita como provável AAA/AAB, e com base no agrupamento com acesso triplóides baseado na análise de microssatélites. Com base na análise de PCR-RFLP das regiões dos ITS, a presença do genoma B não foi detectada e a análise de citometria de fluxo neste estudo mostrou como sendo um

diplóides (Tabela 2). Porém, esse acesso agrupou-se com acessos de genoma AAB com base no fenograma (Figura 14), e apresentou ancestralidade com quatro populações distintas, inclusive de AAB, o que reforça a possibilidade da presença desse genoma (ou parte dele) nesse acesso (Figura 14).

Os acessos ‘Saba Honduras’ (nº 8), ‘Saba’ (nº 9), ‘Benedetta’ (nº 25) e ‘Tugoomomboo’ (nº 102) de genoma ABB; e os acessos de genomas AAB ‘Saney’ (nº 43), ‘Tomnam’ (nº 35), ‘Kepok Bung’ (nº 68), ‘Adimo’ (nº 77), ‘AAB s/Nome’ (nº 78), ‘Garoto’ (nº 71) e ‘Upako’(nº 32); e ‘AAA Desconhecida’ (nº 138) com genoma AAA formaram um agrupamento com base no dendrograma (Figura 14). O grupo XII do *Structure* continha todos esses acessos, mais o diplóide cultivado TA (nº 171; Figura 16). Nesse grupo gerado pelo *Structure*, os acessos ‘Kepok Bung’, ‘Adimoo’ e ‘TA’ mostraram ancestralidade nos grupos dos triplóides XVI e no grupo IX, triplóides e diplóides respectivamente (Figura 16). Desses agrupamentos, apenas os acessos ‘Saba Honduras’, ‘Saba’ e ‘Benedetta’ pertencem ao subgrupo Saba (Tabela 1) e poucas informações existem em relação aos demais acessos. Sabe-se que Kepok Bung (nº 68) parece pertencer ao grupo genômico ABB (SHEPHERD, 1999; CARREEL et al., 2002), e apresenta alta fertilidade feminina (SHEPHERD, 1999). Amorim et al., (2009) avaliaram 42 acessos de bananeira para conteúdo de carotenóide, identificou que ‘Saney’ (AAB) apresenta o maior conteúdo entre os acessos avaliados.

Dois outros pequenos agrupamentos (grupo V e VI) foram detectados pela análise com *Structure*. O agrupamento VI inclui o acesso tetraplóide AAAB ‘Ngem’ (nº 86), e os triplóides AAB representados pelos ‘Kune’ (nº 66), ‘Ustrali’ (nº 31), ‘Java IAC’ (nº 70) e ‘Muracho’ (nº 62). Na análise por dendrograma, esses acessos ficaram separados em dois subgrupos, um contendo os acessos ‘Ngem’, ‘Kune’ e ‘Ustrali’ e o outro representado pelos acessos ‘Java IAC’ e ‘Muracho’. De maneira geral esse agrupamento mostrou heterogêneo sendo que ‘Java IAC’ e ‘Muracho’ apresentaram ancestralidade marcante com o grupo V, que pode justificar sua alocação em grupos distintos (Figura 14 e Figura 16). O segundo grupo representado por acessos AAB ‘Tip’ (nº 7), ‘Warik’ (nº 29), ‘Tip Kham’ (nº 37), ‘N.113’ (nº 60), ‘Moenang’ (nº 64) e ‘Eslesno’ (nº 73) (Figura 14), corroboram com o resultado do *Structure* (Figura 14 e Figura 16). Apenas o acesso ‘Tip Kham’ apresentou ancestralidade no grupo IX (Figura 16).

Apesar da natureza codominante dos marcadores microssatélites eles tem sido utilizado como dominante (presença ou ausência) em bananeira face à natureza poliplóide da espécie, limitando o estabelecimento das relações alélicas. Este trabalho é o primeiro que tenta explorar a natureza codominante dos marcadores SSR em bananeira com múltiplas ploidias utilizando o modelo Bayesiano implementado no software *Structure*. Esta metodologia tem sido utilizada eficientemente em diplóides de diversas espécies como milho (WANG et al., 2008); alface (SIMKO, 2008) e lúpulo (STAJNER et al. 2008). Em poliplóide com múltiplas ploidias e com padrão de segregação polissômica não tem sido relatado o uso deste software. De maneira geral o modelo utilizado corroborou com resultados previamente relatados e com os grupos formados em um dendrograma apesar da eliminação de alguns alelos que estavam presente em maior quantidade do que sua ploidia dos acessos avaliados.

Na origem da bananeira, houve eventos de hibridação e seleção envolvendo as espécies e subespécies diplóides *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, que deram origem as cultivares existentes. Sendo assim, era de se esperar que os acessos avaliados apresentassem múltiplas ancestralidades (mistura). O *Structure* se mostrou eficiente na detecção de ancestralidade de híbridos tetraplóides desenvolvidos recentemente pelos programas de melhoramento da Embrapa e FHIA. Porém, a abordagem se mostrou ineficiente para detectar a ancestralidade dos acessos comerciais que compõem os principais subgrupos, a exemplo dos subgrupos Cavendish, Prata e Plátanos.

Os principais subgrupos comerciais (Prata, Plátano, Cavendish e Gros Michel) apresentam baixa variabilidade (CRESTE et al., 2003). Um alto nível de similaridade entre as cultivares de um mesmo subgrupo tem sido uma observação comum, porque elas compartilham de mesmo ancestral (CRESTE et al., 2003), ou seja um único evento meiótico com ausência total de evolução em nível sexual na sua formação (NOYER et al., 2000). No caso dos plátanos, certamente mutações somáticas afetaram caracteres agrônômicos e foram selecionados pelo homem durante sua evolução em seu centro secundário de diversidade na África, e as diferenças fenotípicas observadas causadas por essas mutações ao longo das gerações foram estabilizadas por propagação vegetativa (NOYER et al., 2000).

Certamente devido a alta similaridade nos acessos triplóides que compõem esses subgrupos dificultou que alelos que os caracterizam também fossem encontrados nos acessos diplóides cultivados e selvagens. Além disso, o longo e desconhecido período evolutivo que estas cultivares passaram desde suas origens podem resultar em mudanças em diversos locos, seja por deleção, ação de retrotransposons, seleção natural, que poderiam resultar na completa eliminação ou modificação do alelo em um dos parentais. Esta hipótese é aceita em virtude da capacidade do *software* detectar a ancestralidade dos híbridos tetraplóides desenvolvidos recentemente, certamente por não terem ainda sofrido pressão evolutiva.

4.8.2 Relações genéticas nos acessos diplóides

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) mensura a probabilidade de que dois alelos escolhidos ao acaso possam ser distinguidos (YAN et al., 2009). O PIC dos locos avaliados foram altamente informativos, com média de 78,4% para os diplóides avaliados, variando de 62,2% (*MaOCEN03*) a 86,8% (*Ma1-17*), sendo os menores valores médios detectados entre os diplóides BB e a subespécie *banksii* com 34,2% e 36,6%, respectivamente (Tabela 8). Os acessos diplóides apresentaram alta diversidade. A heterozigosidade geral média dos acessos diplóides AA e BB foram de 56,1%, sendo que os diplóides das subespécies *microcarpa* e *burmannica/burmannicoides* apresentaram as maiores heterozigosidade média (74% e 71,9%, respectivamente), e por locos avaliados. A menor heterozigosidade média (37,4%) foi detectada nos acessos diplóides de *M. balbisiana*, confirmando a menor diversidade dentro deste grupo (Tabela 8).

Quando se analisam os diplóides por agrupamento, é possível observar a perfeita separação dos acessos contendo genoma de *M. acuminata* (AA) ou *M. balbisiana* (BB). Este resultado era esperado por envolver duas espécies distintas (Figura 14). De maneira geral, entre os diplóides AA houve a separação dos acessos selvagens daqueles cultivados, tanto por meio da análise de agrupamento quanto pelo *Structure* (Figura 16). Na análise com o *Structure* foi possível a identificação de seis agrupamentos exclusivamente diplóides (Grupo I, Grupo II, Grupo VII, Grupo VIII, Grupo

XI e Grupo XIII), e outros seis que continham também acessos triplóides (Grupo V, Grupo IX, Grupo XIV, Grupo XVII Grupo XVIII e Grupo XIX) (Figura 16).

De maneira geral os diplóides avaliados se apresentaram muito heterogêneos em relação a sua ancestralidade quanto a análise empregando o *Structure* (Figura 16). Essa ancestralidade ficou restrita aos grupos dos diplóides com exceção apenas dos acessos 'Madu' (nº 195), 'M53' (nº 162), 'M61' (nº 161) e 'Malbut' (nº 183) que apresentaram ancestralidade no grupo XXI dos triplóides AAA, e o BB IAC (nº 221), que apresentou ancestralidade no grupo III do subgrupo Pisang awak (ABB).

Os diplóides de *Musa acuminata* (AA) são classificados em nove subespécies: *burmannica*, *burmannicoides*, *malaccensis*, *truncata*, *microcarpa*, *siamea*, *zebrina*, *banksii* e *errans*, distribuídas em regiões geográficas específicas (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). Neste estudo, foram avaliados sete de *malaccensis*, cinco da *banksii*, três acessos da subespécie *zebrina*, três da *burmannica/burmannicoides*, duas da *siamea* e *microcarpa* e uma da *errans*.

O agrupamento II pela análise de *Structure* reuniu cinco acessos não associados ainda com nenhuma das subespécies (Figura 16). Neste grupo ficaram os acessos 'Khi Maeo' (nº 185), 'Pisang Mas' (nº 217), Ouro (nº 177), 'Pa Phatthalung' (nº 144) e 'Berlin' (nº 191). Destes, o único que não se agrupou pelo dendrograma foi o 'Khi Maeo' (Figura 16 e Figura 14).

Os sete acessos da subespécie *malaccensis* foram distribuídos em três agrupamentos distintos (I, VII e VIII; Figura 16). O agrupamento I continha dois acessos da subespécie *malaccensis* ['Pa Musore 2' (nº 146) e 'Pa Musore 3' (nº 145)], junto com os acessos 'Birmanie' (nº 160) e 'N118' (nº 148), ambos sem subespécie definida. O mesmo agrupamento também foi verificado pelo dendrograma (Figura 14). A terceira subespécie *malaccensis* foi representada pela 'P. Serum' (nº 216), alocada no agrupamento VII, e demonstrou forte ancestralidade (50%) com o grupo XI, agrupando-se com os híbridos 'M48' (nº 163), 'M61' (nº 161), M53 (nº 162), 'F3P4' (nº 164) e os acessos 'Paka IV' (nº 213) e um acesso da subespécie *siamea* representado pela 'Pa Songkla' (nº 142). É provável que a presença dessas duas subespécies *malaccensis* e *siamea* no mesmo agrupamento esteja associada ao fato de habitarem regiões geográficas próximas e, portanto relacionadas geneticamente (PERRIER et al., 2009).

No dendrograma houve consistência apenas para os acessos de nº 161, 162, 163 e 213 (Figura 14). O agrupamento VIII foi formado por três acessos da subespécie *malaccensis*, ['Jambi' (nº 155), 'Malaccensis' (nº 152) e 'Selangor' (nº 140)], dois acessos 'F2P2' (nº 165), 'Perak' (nº 141), Ido 110 (nº 214) e o triplóide AAA 'Tambi' (nº 223). No dendrograma não houve separação evidente deste grupo com o grupo VII, com exceção apenas para os acessos de número 140, 155 e 214 que se agruparam em grupos distintos (Figura 14). O último acesso tido como da subespécie *malaccensis* foi 'Cici' (grupo XIX) que apresentou 50% de ancestralidade no grupo XVIII (Figura 16).

Os diplóides cultivados são híbridos entre as distintas subespécies (GRAPIN et al., 1998; PERRIER et al., 2009), e isso fica evidenciado pela maior heterozigosidade média (62,4%) em relação aos diplóides selvagens (média de 56,4%) (Tabela 8). Valores semelhantes foram encontrados por Creste et al. (2004), empregando nove locos SSR em 17 acessos diplóides selvagens, encontrando uma heterozigosidade média de 53%, enquanto que nos 26 AA cultivados a heterozigozise média foi de 62%. Carreel et al. (1994) observaram uma heterozigosidade média de 30% nos diplóides selvagem e 60% nos diplóides cultivados empregando marcadores RFLP. Essa heterozigosidade se for cromossômica pode levar a uma limitada fertilidade dos diplóides cultivados, devido anomalias estruturais comuns em bananeiras (CARREEL et al. 1994; GRAPIN et al. 1998; JENNY et al. 1999), que impedem uma meiose regular, levando a quebras e perdas de fragmentos cromossômicos, sendo portanto um fator importante para causar a esterilidade total ou parcial, tanto masculina como feminina (DESSAUW 1988; PERRIET et al., 2009).

O agrupamento IX compreendeu 46% dos acessos diplóides AA cultivados, e todos os cinco acessos pertencente à subespécie *banksii* da Papua Nova Guiné ('Mambee Thu' (nº 182), 'Niarma Yik' (nº 178), 'NBA-14' (nº 180), 'Sowmuk' (nº 172) e 'S/N.2' (nº 174), além do acesso 'Khæ' (nº 154). Estudo com marcadores de cloroplastos e mitocôndria identificaram um padrão típico nos diplóides partenocárpicos cultivados associado à subespécie *banksii* (CARREEL et al., 2002; LEBOT, 1999). Essa subespécie possui origem na Papua Nova Guiné e no norte de algumas ilhas da Indonésia, sendo geograficamente isolada das demais subespécies e preferencialmente autógama (CARREEL et al., 2002). Três dos 16 locos analisados nessa subespécie

apresentaram em homozigose, que resultou numa baixa heterozigosidade média (55,8%) e um baixo PIC (36,6%). Essa fato também foi descrito por Grapin et al. (1998), que descreveu uma alta proporção de locos em homozigose para a subespécie *banksii* e nos diplóides cultivados da Papua Nova Guiné. Esse resultado pode justificar a baixa ancestralidade detectada para essa subespécie, quando comparada as demais (Figura 16). Esse agrupamento também foi verificado no dendrograma, porém os diplóides ficaram distribuídos principalmente em dois grupo (Figura 14), com exceção para os acessos 'Nyarma Yik' (nº 178) e 'Khai Nai On' (nº 186), que ficaram em grupos distintos.

O complexo das subespécies *burmannica/burmannicoides/siamea* possuem suas origens no Nordeste da Índia, Burma e Sudeste da China, Tailândia, e são consideradas geneticamente próximas da subespécie *malaccensis* (Península da Malásia), e não foram perfeitamente separadas com base em dados de 22 locos de microssatélites (PERRIER et al., 2009). Esse fato pode justificar em parte a formação do agrupamento XI e XVIII. No grupo XI (Figura 16) ficaram os seis acessos das seguintes subespécies: *burmannicoides/burmannica* ('Calcutta 4' nº 157 e 'Burmanica' nº 158), *siamea* ('Pa Rayong' nº 143 e 'Khae Prae' nº 211), *zebrina* ('Buitenzorg' nº 159) e *microcarpa* ('Borneo' nº 194). Carreel et al. (2002) avaliaram os acessos 'Buitenzorg' e 'Khae Prae' e identificaram um padrão de restrição para o genoma mitocondrial distinto de todos os acessos analisados da seção *Eumusa*. Essas discrepâncias também foram observadas no presente estudo, onde o 'Buitenzorg' (nº 159) e 'Khae Prae' (nº 211) apresentaram ancestralidade nos acesso da seção *Rhodochlamys* (grupo XIII), fato também evidenciado pelos agrupamentos formados no dendrograma (Figura 14). Neste caso, apenas os acessos 'Pa Rayong' (nº 143), 'Calcutta 4' (nº 157) e 'Burmannica' (nº 158) se localizaram em um grupo bem definido, e os demais apresentaram-se distribuídos em um grupo próximo.

O agrupamento XVIII foi representado por acessos de cinco subespécies: ssp. *errans* ('Tongat' nº 167), *siamea* ('Pa Abissinea' nº 147), *burmannica* ('Jaran' nº 189), *microcarpa* ('Microcarpa' nº 151), e *zebrina* ('Zebrina' nº 139 e 'Monyet' nº 149) e os acessos Pipit (nº 176), Krasan Saichion (nº 153) e Modok Gier (nº 150). Agrupamentos semelhantes foram encontrados por Risterucci et al. (2009) utilizando marcadores DArT, que identificaram o agrupamento entres as subespécies *malaccensis*, *zebrina*, *siamea* e

burmannica. Carreel et al. (2002) avaliaram os acessos ‘Zebrina’ e ‘Monyet’, que apresentaram um mesmo citótipo (padrão molecular de DNA de cloroplasto e mitocôndria). No dendrograma, três acessos (‘Pa Abissinea’ nº 147, ‘Monyet’ nº 149, e ‘Zebrina’ nº 139) se agruparam, enquanto os acessos ‘Tongat’ (nº 167) e ‘Pipit’ nº 176 se localizaram em um grupo distinto. A origem do acesso ‘Pa Abissinea’ (nº 147) como sendo da ssp *siamea* é questionável, pois Carreel et al. (2002) não conseguiram associá-lo com nenhum citótipo das subespécies estudadas apesar da aparente relação com ssp *zebrina* observada neste estudo.

A subespécie *microcarpa* se apresentou como a mais heterozigota das subespécies, e tem-se mostrado bastante heterogênea em nível molecular (PERRIER et al., 2009). Este fato fica demonstrado pela maior heterozigosidade média (74%) observada (Tabela 8), e pela múltipla ancestralidade dos acessos como ‘Borneo’ (nº 194) e ‘Tjau Lagada’ (nº 169) (Figura 15). Alguns acessos das subespécies *zebrina* (ilhas da Indonésia) e *microcarpa* (Borneo) são próximos geneticamente e compartilham alelos comuns (PERRIER et al., 2009), o que poderia justificar a presença do acesso ‘Borneo’ (ssp. *microcarpa*) juntamente com ‘Buintenzorg’ (ssp. *zebrina*) no agrupamento XI, e os acessos ‘Microcarpa’ da ssp. *microcarpa* com a subespécie *zebrina* (‘Zebrina’ e ‘Monyet’) (agrupamento XVIII), embora não haja a separação dessas duas subespécies em relação às demais (ssp. *errans*, ssp. *siamea* e ssp. *burmannica*). Creste et al. (2004) também observaram agrupamento entre os acessos da subespécie *zebrina* e *microcarpa* utilizando marcadores SSR. Risterucci et al. (2009) detectaram a separação das subespécies *microcarpa* em dois subgrupos, um próximo a *banksii*, e outro próximo a subespécie *errans*.

No agrupamento XIV foi observado os acessos ‘Thong Dok Mak’ (nº 170), ‘Lidi’ (nº 184), ‘Tjau Lagada’ (nº 169) da subespécie *microcarpa* e o ‘Pisang Nangka’ (nº 207). O agrupamento XII alocou os diplóides ornamentais do subgênero *Rhodochlamys* (*Musa laterita* nº 222, *M. bajoo* nº 1 e Royal nº 224) e o diplóide ‘Tuugia’ nº 166.

De maneira geral os agrupamentos dos acessos diplóides formados no dendrograma apresentaram comportamento muito distinto ao observado para os acessos triplóides avaliados. Essa discrepância poderia derivar da metodologia adotada. Na análise de agrupamento, as relações entre indivíduos são estabelecidas de

forma relativa, e o agrupamento depende da abordagem escolhida e os grupos são definidos visualmente. Na abordagem empregada no *Structure*, os agrupamentos são definidos com base na probabilidade de verossimilhança e utiliza as frequências alélicas que caracterizam cada população (PRITCHARD et al., 2000), o que torna este método mais confiável para avaliar os grupos de indivíduos com características comuns.

O comportamento diversificado dos diplóides no que diz respeito ao agrupamento de acessos da mesma subespécie em diferentes grupos e/ou com diferentes subespécies pode estar associado à ampla variabilidade que existe dentro de *M. acuminata*. Segundo (IQBAL et al., 1997) um baixo ou moderado nível de polimorfismo contribui para estimação fidedigna da variabilidade genética e assim ajudando na definição do conjunto gênico das cultivares. Jarret et al. (1992), utilizando RFLP para caracterizar 28 acessos dentre as subespécies, observou que três acessos da ssp. *banksii* e uma ssp. *malaccensis* ficaram no mesmo grupo, e justificaram que essa não separação das duas subespécies poderia estar relacionada ao alto polimorfismo encontrado em *M. acuminata*. Grapin et al. (1998) atribuíram ao isolamento da subespécie *errans* em uma análise de dispersão, com a detecção da presença de muitos alelos raros nesta subespécie. Boonruangrod, Faluch e Burg (2009) analisaram sequências das regiões 5'ETS (*external transcribed spacer*) do rDNA, e identificaram quatro grupos (*gene-pool*) representados pela subespécie *zebrina* (dois acessos), ssp. *malaccensis* (dois acessos), ssp. *siamea*, *burmannica* e *burmannicoides* com um acesso de cada subespécie, e o último grupo pelas subespécies *microcarpa* (um acesso), *errans* (um acesso) e *banksii* (dois acessos). Em todos esses estudos um número limitado de acessos das distintas subespécies foram avaliados o que pode resultar nos diferentes resultados obtidos na literatura.

Tabela 8 - Heterozigosidade e Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) dos locos microsssatélites utilizados na caracterização dos acessos diplóides

Geral		Locos SSR ¹																Média
		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	
	H	0,613	0,586	0,703	0,500	0,364	0,662	0,286	0,487	0,532	0,517	0,753	0,394	0,686	0,507	0,738	0,652	0,561
	PIC	0,868	0,778	0,765	0,726	0,692	0,853	0,622	0,862	0,692	0,802	0,845	0,791	0,843	0,712	0,866	0,825	0,784
<i>Musa balbisiana</i>	H	0,000	0,200	0,571	0,250	0,625	0,000	0,250	0,750	0,125	0,375	0,750	0,333	0,375	0,750	0,000	0,625	0,374
	PIC	0,000	0,164	0,427	0,456	0,371	0,305	0,215	0,359	0,337	0,258	0,511	0,652	0,258	0,375	0,269	0,520	0,342
AA Selvagem	H	0,708	0,524	0,750	0,632	0,217	0,773	0,474	0,478	0,542	0,267	0,583	0,478	0,696	0,545	0,789	0,565	0,564
	PIC	0,883	0,831	0,808	0,759	0,759	0,863	0,703	0,839	0,627	0,758	0,836	0,860	0,808	0,576	0,829	0,840	0,786
AA Cultivado	H	0,720	0,640	0,652	0,632	0,385	0,870	0,192	0,423	0,577	0,783	0,846	0,316	0,739	0,571	0,905	0,737	0,624
	PIC	0,811	0,649	0,635	0,758	0,602	0,735	0,303	0,622	0,497	0,677	0,634	0,485	0,816	0,599	0,832	0,717	0,648
AA ssp, banksii	H	0,600	0,600	0,400	0,667	0,000	1,000	0,000	0,200	0,000	1,000	0,800	0,500	1,000	0,750	0,750	0,667	0,558
	PIC	0,499	0,410	0,269	0,346	0,269	0,563	0,000	0,164	0,000	0,492	0,365	0,305	0,511	0,468	0,746	0,449	0,366
AA ssp, burmannica	H	0,667	1,000	1,000	0,333	0,333	1,000	0,333	0,333	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	0,333	0,667	1,000	0,719
	PIC	0,593	0,671	0,375	0,239	0,449	0,671	0,239	0,449	0,375	0,305	0,671	0,671	0,744	0,239	0,593	0,375	0,479
AA ssp, malaccensis	H	0,857	0,571	1,000	0,750	0,000	0,714	0,500	0,286	0,429	0,200	0,286	0,286	0,571	0,571	0,571	0,571	0,510
	PIC	0,841	0,766	0,676	0,605	0,406	0,841	0,605	0,689	0,427	0,645	0,744	0,689	0,657	0,655	0,802	0,768	0,676
AA ssp, microcarpa	H	1,000	1,000	0,667	0,500	1,000	0,667	0,333	1,000	1,000	0,500	0,667	0,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,740
	PIC	0,671	0,375	0,346	0,555	0,703	0,744	0,671	0,744	0,671	0,555	0,744	0,375	0,703	0,375	0,375	0,555	0,573
AA ssp, siamea	H	0,667	0,500	1,000	1,000	0,667	1,000	1,000	0,667	0,333	0,000	0,667	0,667	0,667	0,667	1,000	0,667	0,698
	PIC	0,620	0,555	0,375	0,620	0,535	0,744	0,375	0,620	0,671	0,375	0,671	0,744	0,671	0,449	0,744	0,671	0,590
AA ssp, zebrina	H	0,000	0,333	0,667	0,333	0,000	1,000	0,667	0,667	0,333	0,500	1,000	0,667	0,333	0,333	1,000	0,333	0,510
	PIC	0,346	0,671	0,671	0,375	0,346	0,744	0,620	0,671	0,375	0,555	0,744	0,671	0,535	0,449	0,703	0,535	0,563
AA Híbrido	H	0,800	0,750	1,000	0,750	0,400	0,400	0,000	0,500	0,800	1,000	0,800	0,250	0,750	0,000	0,800	0,800	0,613
	PIC	0,645	0,582	0,492	0,555	0,492	0,672	0,305	0,371	0,365	0,593	0,586	0,359	0,605	0,000	0,581	0,701	0,494

¹ Locos SSR (Tabela 4)

Figura 14 - Dendrograma demonstrando as relações genéticas entre 224 acessos de bananeira baseado em marcadores microssatélites gerado pelo método de agrupamento *neighbor-joining* a partir dos dados de dissimilaridade do coeficiente de Jaccard. Constituição genômica com base em informação de passaporte estão identificados. Cores das ramificações estão relacionadas com a Figura 16. (*) bootstraps maiores que 50%

(continua)

Figura 16 - Composição genética dos 224 acessos baseado em 16 locos SSR gerado pelo *Structure* usando modelo de mistura. Os 21 grupos (subpopulações) estão representados por cores diferentes. Cada coluna representa um acesso que pode ser fracionada em segmentos cujo tamanho é proporcional a estimativa da fração genética da subpopulação a que pertence. Constituição genômica com base nos descritores moleculares (Tabela 2). ?: genoma duvidoso

(conclusão)
 Figura 16 - Composição genética dos 224 acessos baseado em 16 locos SSR gerado pelo *Structure* usando modelo de mistura. Os 21 grupos (subpopulações) estão representados por cores diferentes. Cada coluna representa um acesso que pode ser fracionada em segmentos cujo tamanho é proporcional a estimativa da fração genética da subpopulação a que pertence. Constituição genômica com base nos descritores moleculares (Tabela 2). (?) genoma duvidoso

5 CONCLUSÕES

- 1 - De maneira geral, poucos acessos do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical apresentaram discrepância de ploidia e constituição genômica, previamente estabelecidas por descritores morfológicos, quando avaliadas por citometria de fluxo, PCR-RFLP das regiões ITS e microssatélites.
- 2 - Os acessos Marmelo, Pitogo e Pisang Nangka apresentaram resultados contrastantes em relação às metodologias utilizadas e precisam ser reavaliadas principalmente em relação a sua ploidia.
- 3 - Os clones sequenciados das regiões de ITS permitiram a identificação de SNPs associado ao genoma B de bananeira e que podem ser utilizando como loco específico para *screening* de acessos de genoma desconhecido.
- 4 - A utilização dos 16 locos SSR, através de uma análise de agrupamento, mostrou-se eficientes em discriminar a ploidia e a constituição genômica dos acessos.
- 5 - Oito locos microssatélites destacaram-se para o uso conjunto na caracterização do genoma A e B sendo que os locos *MaC-CEN06*, *MaOCEN12* e *MaOCEN14* apresentaram maior capacidade de discriminação isoladamente.
- 6 - Os novos locos microssatélites apresentaram alto polimorfismo e alguns mostraram promissores para a identificação dos genomas A e B de bananeira e terão papel importante na caracterização e mapeamento genético.
- 7 - A análise de agrupamento de maneira geral permitiu a separação segundo a ploidia, constituição genômica e subgrupos e uma ampla variabilidade existe entre os acessos diplóides AA e nos principais grupos genômicos que compõem o banco de germoplasma.

8 - A análise do *Structure* corroborou com os grupos formados com base no dendrograma principalmente entre os grupos dos acessos triplóides.

9 - Os diplóides de maneira geral apresentaram muito heterogêneos com relação a sua ancestralidade.

10 - O *Structure* mostrou-se eficiente em estabelecer precisamente uma relação entre os híbridos tetraplóides e seus genitores diplóides de origem recente.

REFERÊNCIAS

AMORIM, E.P.; VILARINHOS, A.D.; COHEN, K.O.; AMORIM,V.B.O.; SANTOS-SEREJO, J.; SILVA, S.O.; PESTANA, K.N.; SANTOS,V.J.; PAES, N.S.;MONTE D.C.; REIS R.V. Genetic diversity of carotenoid-rich bananas evaluated by Diversity Arrays Technology (DArT). **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v.2, n.1, p.96-103, 2009.

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

BALLESTERO, M.S. **Bananos cultivo y comercialización**. São José: Litografia e Imprensa, 1985. 648p.

BARTOS, J.;ALKHIMOVA, O.; DOLEZELOVÁ, M.; DE LANGHE, E.; DOLEZEL, J. Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications. **Cytogenet Genome Research**, Würzburg, v. 109, n. 1-3, p. 50-57, 2005.

BENNETT, M.D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses - 807 new estimates. **Annals of Botany**, Londres, v. 86, n.1, p. 859-909, 2000.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, Londres, v.76, n.1, p. 113-176, 1995.

BOONRUANGROD, R.; DESAI, D.; FLUCH, S.; BERENYI, M.; BURG, K. Identification of cytoplasmic ancestor gene-pools of *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and their hybrids by chloroplast and mitochondrial haplotyping. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 1, p. 43-55, 2008.

BOONRUANGROD, R.; FLUCH, S.; BURG, K. Elucidation of origin of the present day hybrid banana cultivars using the 5'ETS rDNA sequence information. **MolecularBreeding**, Dordrecht, v. 24, n. 1, p. 24-77, 2009.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, n.1, p.314-331, 1980.

BUHARIWALLA, H.K.; JARRET, R.L.; JAYASHREE, B.; CROUCH, J.H.; ORTIZ, R. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 327–330, 2005.

CARREEL, F.; FAURE, S.; GONZALEZ DE LEON, D.; LAGODA, P.J.L.; PERRIER, X.; BAKRY, F.; TEZENAS DU MONTCEL, H.; LANAUD, C.; HORRY, J.P. Evaluation de la diversité génétique chez les bananiers diploïdes (*Musa* spp.). **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 26, n. 1, p. 125–136, 1994.

CARREEL, F.; LEON, D.G.; LAGODA, P.; LANAUD, C.; JENNY, C.; HORRY, J.P.; MONTCEL, T.H. Ascertaining maternal and paternal lineage within *Musa* by chloroplast and mitochondrial DNA RFLP analyses. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 4, p. 679–692, 2002.

CHEUNG, F.; TOWN, C.D. A BAC end view of the *Musa acuminata* genome. **BMC Plant Biology**, Londres, v. 29, n. 7, p. 1-7, 2007.

CHUNG M.C.; LEE, Y.I.; CHENG, Y.Y.; CHOU Y.J.; LU, C.F. Chromosomal polymorphism of ribosomal genes in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.116, n.6, p. 745–753, 2008.

CIRES, E.; CUESTA, C.; PEREDO, E.L.; REVILLA, M.A.; PRIETO, J.A.F. Genome size variation and morphological differentiation within *Ranunculus parnassifolius* group (*Ranunculaceae*) from calcareous screes in the Northwest of Spain. **Plant systematics and evolution**, New York, v. 281, n. 1-4, p. 193-208, 2009.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 4, p. 299–306, 2001.

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

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

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

CROUCH, H.K.; CROUCH, J.H.; MADSEN, S.; VUYLSTEKE, D.R.; ORTIZ, R. Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (*Musa* spp., AAB group). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 7, p. 1056 - 1065, 2000.

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

CROUCH, J.H.; CROUCH, H.K.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R. VNTR-based diversity analysis of 2x and 4x full-sib *Musa* hybrids. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 2, n. 3, p. 130-1139, 1999a.

CRUZ, C.D. **Programas GENES-versão Windows 2005.6.1**. Viçosa: UFV, 2001. 642p.

CRUZ, F.S.; GUECO, L.S.; DAMASCO, O.P.; HUELGAS, V.C.; BANASIHAN, I.G.; LLADONES, R.V.; VAN DEN BERGH, I.; MOLINA, A.B. **Catalogue of introduced and local banana cultivars in the Philippines**: results of a demonstration trial by the Institute of plant breeding. Laguna: University of the Philippines Los Baños, IPB-UPLB, Bioversity International and DA-BAR, 2007. 63p.

D'HONT, A.; PAGET-GOY, A.; JENNY, C.; NOYER, J.L.; BAURENS, F.C.; LAGODA, P.; CARRE, F. Investigation of the complex genome structure of cultivated banana (*Musa* spp.) by flow cytometry, genomic DNA *in situ* hybridisation and repeated sequence analysis. **Infomusa**, Montpellier, v. 8, n. 1, 1999.

D'HONT, A.; PAGET-GOY, A.; ESCOUTE, J.; CARREEL, F. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 177-183, 2000.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenet Genome Research**, Switzerland, v. 109, n. 2, p. 27-33, 2005.

DAMODARAN, T.; KUMAR, N.; KAVINO, M. Breeding and evaluation of *Musa* hybrids resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. **Fruits**, Les Ulis, v. 64, n. 1, p. 3-12, 2009.

DE LANGHE, E., VRYDAGHS, L., MARET, P., PERRIER, X. DENHAM, T. Why Bananas Matter: An introduction to the history of banana domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, Montpellier, v. 7, n. 1, p. 165-177, 2009.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 38, n.3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J.;LYSAK, M.A.;VAN DEN HOUWE, I.; DOLEZELOVA, H.M.; ROUX, N. Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. **Infomusa**, Montpellier, v. 6, n. 1, p. 6-9, 1997.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; ROUX, N.; VAN DEN HOUWE, I. A novel method to prepare slides for high resolution chromosome studies in *Musa* spp. **Infomusa**, Montpellier, v. 7, n. 1, p. 3-4, 1998.

DOLEZEL, J.; LYSÁK, M.A.; DOLEZELOVA M.; VALARIK, M. Analysis of Musa genome using flow cytometry and molecular cytogenetics. **Infomusa**, Montpellier, v. 8, n. 1, p. 3-4, 1999.

DOLEZEL, J. Citogenetic and cytometric analysis of nuclear genome in Musa. In: JAIN, S. M; SWENNEN, R. (Eds.). **Banana Improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Leuven: Science Publishers, 2001. p. 245-249.

DOLEZEL, J.; VALÁRIK, M.; VRÁNA, J.; LYSÁK, M.A. HIBOVÁ, E.; BARTOS, J.; GASMANOVÁ, N.; DOLEELOVÁ, M.; SAFÁR, J.; SIMKOVÁ, H. Molecular cytogenetics and cytometry of bananas (*Musa* spp.). In: JAIN, S. M; SWENNEN, R. (Eds.). **Banana Improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Leuven: Science Publishers, 2001. p.229-244.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, Londres, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.

DOLEZELOVÁ M.; VALARIK, M.; SWENNAN, R.; HORRY, J.P.; DOLEZEL, J. Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas (*Musaceae*). **Biologia Plantarum**, Praha, v. 41, n. 4, p. 497-505, 1998.

DOMINGUES, E.T.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J.; ANDO, A. Efeitos de doses de raios-gama em ápices caulinares de bananeira (*Musa* sp) desenvolvidos in vitro visando a indução de mutação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n.7, p. 1091-109, 1994.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**. Berlin, v. 164, n.4, p.1567-1587, 2003.

FAURÉ, S.; NOYER, J. L.; HORRY, J. P.; BAKRY, F.; LANAUD, C.; GONZFILEZ DE LEÓN, D. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.87, n. 4, p. 517-526, 1993.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, Malden, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER IV, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 357-74, 2003.

GALBRAITH, D.; LAMBERT, G.; MACAS, J. E DOLEŽEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J.; AZMI, A.E.; TUTOIS, S. (Eds.). **Current protocols in cytometry**. New York: John Wiley, 2002. chap. 7, p. 6.1-7.6.22.

GANGA, M.; CHEZHIAN, N. Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 572-575. 2002.

GEERING, A.D.W.; OLSZEWSKI, N.E.; HARPER, G.; LOCKHART, B.E.L.; HULL, R.; THOMAS, J.E. Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. **Journal of General Virology**, Londres, v. 86, n. 2, p. 511-520, 2005.

GOMES, G. A. C. **Divergência genética entre cultivares e certificação genética e fitossanitária de matrizes de bananeira**. 2002. 124 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

GRAPIN, A.; NOYER, J.L.; CARREEL, F.; DAMBIER, D.; BAURENS, F.C.; LANAUD, C.; LAGODA, P.J.L. Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellite sites. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, n. 8-9, p. 1374-1380, 1998.

GREGORY, T.R. The C-value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. **Annals of Botany**, Londres, v. 98, n.1, p. 133-145, 2005.

GUIMARÃES, C.T.; PADILHA, L.; SOUZA, I.R.P.; PAIVA, E. **“Fingerprinting” Molecular de linhagens de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 4p.

IQBAL, M.J.; AZIZ, N.; SAEED, N.A.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.A. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, n.1, p.139-144, 1997.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Oxford, v. 41, n. 95, p. 981-999, 1999.

HAMILL, S.D., SMITH, M.K. and DODD, W.A. In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.40, p. 887-96, 1992.

HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, R. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, Londres, v. 100, n. 5, p. 1073–1084, 2007.

HRIBOVÁ, E.; DOLEZELOVÁ, M.; TOWN, C.D.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Isolation and characterization of the highly repeated fraction of the banana genome. **Cytogenetic Genome Research**, Basel, v. 119, n. 3-4, p.268-274, 2007.

HSIAO, C.; CHATTERTON, N.J.; ASAY, K.H.; JENSEN, K.B. Phylogenetic relationships of ten grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in the nuclear ribosomal DNA in monocots. **Genome**, Ottawa, v. 37, n. 1, p. 112–120, 1994.

JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 4, p.1 - 7, 2001.

JANICK, J.; PAULL, R. **The encyclopledia of fruit and nuts**. Indiana: CABI, 2008. 954p.

JARRET, R.L.; BHAT, K.V.; CREGAN, P.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D. Isolation of microsatellite DNA markers in *Musa*. **Infomusa**, Montpellier, v. 3, n. 1, p. 3-4, 1994.

JARRET, R.L.; GAWEL, N.; WHITEMORE, A.; SHARROCK, S. RFLP-based phylogeny of *Musa* species in Papua New Guinea. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, n. 5-6 , p. 579-584, 1992.

JENNY, C.; AUBOIRON, E.; BEVERAGGI, A. Breeding Plantain-Type Hybrids at CRBP. In: JONES, D.R. (Ed.). **The Improvement and Testing of *Musa***: a global partnership. honduras: INIBAP, 1994. p.176-187.

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

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

JOHNSTON, J.S.; BENNETT, M.D.; RAYBURN, A.L.; GALBRAITH, D.W. PRICE, H.J. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, Ohio, v.5, n. 86, p. 609-613, 1999.

KAEMMER, D.; FISCHER, D.; JARRET R.L.; BAURENS, F.C.; GRAPIN, A.; DAMBIER, D.; NOYER, J.L.; LANAUD, C.; KAHL, G.; LAGODA, P.J.L. Molecular breeding in the genus *Musa*: a strong case for STMS marker technology. **Euphytica**, Wageningen, v. 96, n. 1, p. 49-63, 1997.

KALENDAR, R.; GRAB, T.; REGINA, M.; SUONIEMI, A.; SCHULMAN, A.H. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon- based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 5, p. 704-711, 1999.

KALENDAR, R.; SCHULMAN, A.H. IRAP and REMAP for retrotransposons-based genotyping and fingerprinting. **Nature protocols**, Londres, v. 1, n. 5, p. 2478-2484, 2006.

KAMATÉ, K.; BROWN, S.; DURAND, P.; BUREAU, J.-M.; DE NAY, D.; TRINH, T.H. Nuclear DNA content and base composition in 28 taxa of *Musa*. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 622-627, 2001.

KARAMURA, E.; FRISON, E.; KARAMURA, D.A.; SHARROCK, S. Banana production systems in eastern and southern Africa. In: PICQ, C.; FOURÉ, E.; FRISON, E.A (Eds.). **Bananas and Food Security**. Montpellier: INIBAP, 1998. p.401-412.

KRAAKMAN, A.T.W.; MARTINEZ, F.; MUSSIRALIEV, B.; VAN EEUWIJK, F.A.; NIKS, R.E. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 41-58, 2006.

KRUSKAL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, Greensboro, v. 29, n. 1, p.1-27, 1964.

KUMAR, A.; HIROCHIKA, A. Applications of retrotransposons as genetics tools in plant biology. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 127-134, 2001.

KUMAR, A.; BENNETZEN, J.L. Plant Retrotransposons. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 33, n. 1, p. 479-532, 1999.

KUMAR, S.G.B.; GANAPATHI, T.R.; REVATHI, C.J.; SRIVIVAS, L.; BAPAT, V.A. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. **Planta**, Berlin, v. 222, n. 3, p. 484-493, 2005.

KUNAKH, V.A.; ADONIN, V.I.; OZHEREDOV, S. P.; BLYUM, Y.B. Mixoploidy in Wild and cultivated species of *cruciferae* capable of hybridizing with rapeseed *Brassica napus*. **Cytology and Genetics**, New York, v. 42, n. 3, p. 204-209, 2008.

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

LANAUD, C.; MONTCEL, H.T.; JOLIVOT, M.P.; GLASZMANN, J.C.; GONZALEZ DE LEON, D. Variation of ribosomal gene spacer length among wild and cultivated banana. **Heredity**, Londres, v. 68, n. 2, p.147-156, 1992.

LEBOT, V. Biomolecular evidence for plant domestication in Sahul. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.46, n.6, p. 619-628, 1999.

LYSÁK, M. A.; DOLEZELOVÁ, M.; HORRY, J. P.; SWENNEN, R.; DOLEZEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in Musa. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v.98, n.8, 1344-1350, 1999.

LIU, K.; MUSE, S. V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, London, v.21, n.9, p. 2128-2129, 2005.

LOUREIRO, J.C. **Aplicação de citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal**. 2007. 268 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Aveiro, 200, Aveiro-Portugal. 2007.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. Boletim em Biotecnologia**. Disponível em: < <http://labbiocyt.web.ua.pt/Artigo.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

MACKAY, I.; POWELL, W. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 57-63, 2007.

MARCANO, M.; PUGH, T.; CROS, E.; MORALES, S.; PÁEZ, E.A.P.; COURTOIS, B.; GLASZMANN, J.C.; ENGELS, J.M.M.; PHILLIPS, W. ASTORGA, C.; RISTERUCCI, A.M.; FOCET, O.; GONZÁLEZ, V.; ROSENBERG, K.; VALLAT, I.; DAGERT, M.; LANAUD, C. Adding value to cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 5, p. 877-884, 2007.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. WebSat - A web software for microsatellite marker development. **Bioinformation**, Hong Kong, v. 3, n. 6, p. 282-283, 2009.

MATSUMOTO, K.; VILARINHOS, A.D.; OKA, S. Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts. **Euphytica**, Wageningen, v. 125, n. 3, p. 317-324, 2002.

MATTOS, L. A. **Caracterização de acessos de bananeira**. 2009. 96 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

MGIS - *Germplasm Information System*. Disponível em: < <http://www.crop-diversity.org/banana/#about.html>>. Acesso em: 20 dez. 2009.

MISSIAGGIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 5, p. 72-78, 2006.

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

NAIR, A.S.; TEO, C.H.; SCHWARZACHER, T.; HARRISON, P.H. Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 144, n. 3, p. 285-290, 2005.

NATALI, L.; GIORDANI, T.; BUTI, M.; CAVALLINI, A. Isolation of Ty1-copia putative LTR sequences and their use as a tool to analyse genetic diversity in *Olea europaea*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 19, n. 3, p. 255-265, 2007.

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

NOYER, J.L.; CAUSSE, S.; TOMEKPE, K.; BOUET, A.; BAURENS, F.C. A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers. **Genetica**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 61-69, 2005.

NSABIMANA, A.; STADEN, J. Ploidy investigation of bananas (*Musa* spp.) from the Nationalanana Germplasm Collection at Rubona–Rwanda by flow cytometry. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.72,n.2, p.302-305, 2006.

NWAKANMA, D.C.; PILLAY, M.; OKOLI, B.E. PCR-RFLP of the ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) provides markers for the A and B genomes in *Musa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, n. 1, p. 154-159, 2003a.

NWAKANMA, D.C.; PILLAY, M.; OKOLI, B.E. Sectional relationships in the genus *Musa* L. inferred from the PCR-RFLP of organelle DNA sequences. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 5, p. 850-856, 2003b.

ORIERO, C.E.; ODUNOLA, O.A.; LOCO, Y.; INGELBRECHT, I. Analysis of B-genome derived simple sequence repeat (SSR) markers in *Musa* spp. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 2, p. 126-128, 2006.

ORTIZ, R. Occurrence and Inheritance of $2n$ Pollen in *Musa*. **Annals of Botany**, Londres, v.79, p. 449-453, 1997a.

ORTIZ, R. Morphological variation in *Musa* germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, n. 5, p. 393-404, 1997b.

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

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

OSUJI, J. O. Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA and telomerase-like sequences. **Annals of Botany**, Londres, v. 82, n. 2, p. 243-248, 1998.

PEARCE, S.R.; STUART-ROGERS, C.; KNOX, M.R.; KUMAR, A.; ELLIS, T.H. N.; FLAVELL, A.J. Rapid isolation of plant Ty1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. **The Plant Journal**, Heslington, v.19, n.6, p. 711-717, 1999.

PÉREZ PONCE, J.N. Mutagêneses in vitro. In: Pérez Ponce, J.N (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las plantas. 1998. p. 297-326.

PEI, X-W.; CHEN, S-K.; WEN, R-M.; YE, S.; HUANG, J.Q.; ZHANG, Y.Q.; WANG, B.S.; WANG, Z.X.; JIA, S.R. Creation of transgenic bananas expressing human lysozyme gene for panama wilt resistance. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 47, n. 8, p. 971-977, 2005.

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**, Montpellier, v. 7, n. 1, p. 199-216, 2009.

PILLAY, M.; NWAKANMA, D.C.; TENKOUANO, A. Identification de RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa* L. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 5, p. 763-767, 2000.

PILLAY, M.; OGUNDIWINY, E.; TENKOUANOD, A.; DOLEZEL J. Ploidy and genome composition of *Musa* germplasm at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 13, p. 1224-1232, 2006.

PILLAY, M.; TENKOUANO, A.; UDE, G.; ORTIZ, R. Molecular characterization of genomes in *Musa* and its applications. In: JAIN, S. M; SWENNEN, R. (Eds.). **Banana Improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Leuven: Science Publishers, 2001. p. 271-286.

PLOETZ, R.C.; KEPLER, A.K.; DANIELLS, J.; NELSON, S.C. Banana and plantain - an overview with emphasis on Pacific island cultivars. **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**, v. 7, p. 1-27, 2007. Disponível em: < <http://www.traditionaltree.org/>>. Acesso em: 20 de fev. 2010.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N.A.; DONNELLY, P. Association mapping in structured populations. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 67, n. 1, p. 170-181, 2000.

PRITCHARD, J.K.; WEN, W. Documentation for structure software, Version 2.3. The University of Chicago, Department of Human Genetics. Disponível em: <<http://pritch.bsd.uchicago.edu/inaex.html>>. Acesso em: 20 de fev. 2010.

RABOIN, L. M.; CARREEL, F.; NOYER, J.L.; BAURENS, F.C.; HORRY, J.P.; BAKRY, F.; DU MONTCEL, H.T.; GANRY, J.; LANAUD, C.; LAGODA, P.J.L. Diploid ancestors of triploid export banana cultivars: molecular identification of $2n$ restitution gamete donors and n gamete donors. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 333–341, 2005.

RISTERUCCI, A.M.; HIPPOLYTE, I.; PERRIER, X.; XIA, L.; CAIG, V.; EVERS, M.; HUTTNER, E.; KILIAN, A.; GLASZMANN, J.C. Development and assessment of Diversity Arrays Technology for high-throughput DNA analyses in *Musa*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 6, p. 1093-1103, 2009.

ROBINSON, J.C. **Bananas and Plantains**. UK: CAB International, 1996. p. 1-33.

ROWE, P.; ROSALES, F.E. Current approaches and Future opportunities for improving major *Musa* (ABB) types presents in Asian/Pacific region: Saba, Pisang Awak e Bluggoe. In: FRISON, E.A.; HORRY, J.P.; WAELE, D. (Eds.). **Proceedings of the workshop held in Kuala Lumpur**. Malaysia: INIBAP, 1995. p. 142-148.

ROUX, A.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**. Berlin v.21, n.1, p.483-490, 2003.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.R.; BOLLAMMA, K.T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 39, n. 6, p. 551-556, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA, S.O.; DIAS, D.L. *Musa* mutants induced by gamma radiation. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 16, 2004, Oaxaca. **Resumos...** Oaxaca: ACORBAT, 2004. 263p.

SANTOS-SEREJO, J.A.; SOUZA, E.H.; SOUZA, F.V.D.; SOARES, T.L.; SILVA, S.O. Caracterização morfológica de bananeiras ornamentais. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 326-332, 2007.

SCHEPPEP, S.; LEUS, L.; MERTENS, M.; VAN BOCKSTAELE, E.; LOOSE, M.; DEBERGH, P.; HEURSEL, J. Flow cytometric analysis of ploidy in *Rhododendron* (subgenus Tsutsusi). **HortScience**, Alexandria, v. 36, n. 1, 125-127, 2001.

SCHNELL, R.J.; OLANO, C.T.; BROWN, J.S.; MEEROW, A.W.; CERVANTES-AMRTINEZ, C. Retrospective determination of superior cacao (*Theobroma cacao* L.) seedling and association of microsatellite alleles with productivity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.130, n. 2, p. 181-190, 2005.

SHEPHERD, K. **Taxonomia e caracterização de cultivares de banana**. Cruz das Almas: Embrapa CNPMF, 1984. 5p.

SHEPHERD, K. **Cytogenetics of the genus *Musa***. INIBAP: Montpellier, 1999. 154p.

SHERPHERD, K. Banana: taxonomia e morfologia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 1, 1984, Jaboticabal. **Resumos...** Jaboticabal: FCAVJ/UNESP, 1984. p. 50-74.

SILVA, S.O.; ALVES, E.J. Melhoramento genético e novas cultivares de bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 91-96, 1999.

SILVA, S.O.; CARVALHO, P.C.L.; SHEPHERD, K.; ALVES, E.J.; OLIVEIRA, C.A.P.; CARVALHO, J.A.B.S. **Catálogo de Germoplasma de Bananeira (*Musa spp.*)**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas: CNPMF, 1999. 140p.

SILVA, S .O.; SOUZA JUNIOR, M. T.; ALVES, E. J.; SILVEIRA, J. R. S.; LIMA, M. B. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 1, p. 399-436, 2001.

SILVA, S.O.; GASPAROTTO, L.; MATOS, A.P.; CORDEIRO, Z.J.M.; FERREIRA, C.F.; RAMOS, M.M.; JESUS, O.N. **Banana Breeding Program in Brazil - Recent Results**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 39p.

SILVA, S.O.; MATOS, A.P.; ALVES, E.J. Melhoramento genético de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 693-703, 1998.

SILVA, S.O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, A.S.; CARNEIRO, M.S. Germplasma. In: ALVES, E.J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**.Cruz das Almas: Embrapa-SPI, 1999. cap. 4, p. 61-94.

SIMKO, I. Population Structure in Cultivated Lettuce and Its Impact on Association Mapping. **The American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.133, n.1, p.61-68, 2008.

SIMMONDS, N.W. Isolation im Musa, sections Eumusa and Rhodochamys. **Evolution**, Malden, v. 8, p. 65-74, 1954.

SIMMONDS, N.W. **The evolution of the bananas**. London: Longmans Green, 1962.

SIMMONDS, N.W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origin of the cultivated bananas. **The Botany Journal of Linnean Society of London**, Londres, v. 55, n. 359, p. 302-312, 1955.

STAJNER, N.; SATOVIC, Z.; CERENAK, A.; JAVORNIK, B. Genetic structure and differentiation in hop (*Humulus lupulus* L.) as inferred from microsatellites. **Euphytica**, Wageningen, v.161, p. 301-311, 2008.

SUESCÚN, L.E.S. **El cultivo del banana**: produccion y comercio. Mendelin: Olimpica, 1993. 680p.

SWANGPOL, S.; VOLKAERT, H.; SOTTO, R. C.; SEELANAN,T. Utility of Selected Non-coding Chloroplast DNA Sequences for Lineage Assessment of Musa Interspecific Hybrids. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Chicago, v. 40, n. 4, p.577-587, 2007.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p.1596-1599, 2007.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, Washington, v. 101, n. 30, p.11030-11035, 2004.

TENKOUANO, A.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D. Combining ability for yield and plant phenology in plantain-derived populations. **Euphytica**, Wageningen, v.104, n.3, p. 151-158, 1998.

TENKOUANO, A.; CROUCH, J.H.; CROUCH, H.K.; ORTIZ, R. Genetic diversity, hybrid performance, and combining ability for yield in *Musa* germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v.102, p.281-288, 1998b.

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**, New York, v. 48, n. 1, p. 96-105, 2005.

TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 512-520, 2000.

TRASK, B.J. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. **Trends Genetics**, Cambridge, v.7, n.5, p.149-154, 1991.

TULMANN NETO, A.; DOMINGUES, E.T. In vitro mutation breeding methodology for Fusarium wilt resistance in banana. **Mutation Breeding Newsletter**, Bélgica v. 36, p. 12-13, 1990.

UDE, G.; PILLAY, M.; NWAKANMA, D.; TENKOUANO, A. Genetic diversity in *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and some of their natural hybrids using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 8, p. 1246–1252, 2002.

UMALI, R.P.; NAKAMURA, I. Identification of dCAPS markers that discriminate A and B cytoplasms in banana (*Musa* spp.). **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 20, n. 2, p.159-164, 2003.

VALMAYOR, R.V. Classification and characterization of *Musa exotica*, *M. alinsanaya* and *M. acuminata* ssp. *Errans*. **Infomusa**, Montpellier, v.10, n.2, p.35-39, 2001.

VALARIK, M.; SIMKOVÁ, H.; HRIBOVA, E.; SAFAR, J.; DOLEZELOVA, M.; DOLEZEL, J. Isolation, characterization and chromosome localization of repetitive DNA sequences in bananas (*Musa* spp.). **Chromosome Research**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 89-100, 2002.

WANG, X.L. ; CHIANG, T. Y.; ROUX, N.; HAO, G.; GE, X. J. Genetic diversity of wild banana (*Musa balbisiana* Colla) in China as revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, n. 5, p. 1125-1132, 2007.

WEIDER, L.J.; ELSER, J.J.; CREASE, T.J.; MATEOS, M.; COTNER, J.B.; MARKOW, T.A. The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: impacts on the evolutionary ecology of organisms. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 36, p. 219-242, 2005.

WENZL, P.; CARLING, J.; KUDRNA, D.; JACCOUD, D.; HUTTNER, E.; KLEINHOF, A.; KILIAN, A. Diversity arrays technology (DART) for whole-genome profiling of barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, Washington, v. 101, n. 26, p. 9915-9920, 2004.

WENZL, P.; LI, H.; CARLING, J.; ZHOU, M.X.; RAMAN, H.; PAUL, E.; HEARNDEN, P. K.; MAIER, C.; XIA, L.; CAIG, V.; OVESNÁ, J.; ÇAKIR, M.; POULSEN, D.; WANG, J.P.; RAMAN, R.; SMITH, K.P.; MUEHLBAUER, G.J.; CHALMERS, K.J.; KLEINHOF, A.; HUTTNER, E.; KILIAN, A. A high-density consensus map of barley linking DART markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. **BMC Genomics**, Bethesda, v. 7, n. 206, p. 1-22, 2006.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J (Eds.). **PCR protocols**: a guide to methods and applications. California: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WANG, R.; YU, Y.; ZHAO, J.; SHI, Y.; SONG, Y.; WANG, T.; LI, Y. Population structure and linkage disequilibrium of a mini core set of maize inbred lines in China. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.117, p.1141–1153, 2008.

WONG, C.; KIEW, R.; ARGENT, G.; SET, O.; LEE, S.K.; GAN, Y.Y. Assessment of the Validity of the Sections in Musa (Musaceae) using AFLP. **Annals of Botany**, Londres, v. 90, n. 2, p. 231-238, 2002.

YAN, W.G.; LI, Y.; AGRAMA, H.A.; LUO, D.; GAO, F.; LU, X.; REN, G. Association mapping of stigma and spikelet characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.4, n.3, p. 277-292, 2009.