

**“DNA FINGERPRINT” VIA MARCADORES RAPD E AVALIAÇÃO  
DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE BANANEIRA  
(*Musa* spp.)**

**CAROLINA MARIA PALÁCIOS DE SOUZA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO de 2006**

**“DNA FINGERPRINT” VIA MARCADORES RAPD E AVALIAÇÃO  
DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE BANANEIRA  
(*Musa* spp.)**

**CAROLINA MARIA PALÁCIOS DE SOUZA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Genética e Melhoramento  
de Plantas”

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pio Viana

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO de 2006

**“DNA FINGERPRINT” VIA MARCADORES RAPD E AVALIAÇÃO  
DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE BANANEIRA  
(*Musa spp.*)**

**CAROLINA MARIA PALÁCIOS DE SOUZA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Genética e  
Melhoramento de Plantas”

Aprovada em 30 de março de 2006

Comissão Examinadora:

---

Dr<sup>a</sup>. Cláudia Fortes Ferreira (D.Sc., Produção Vegetal) – EMBRAPA

---

Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Citogenética Vegetal e Recursos  
Genéticos Vegetais) – UENF

---

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Marcadores Moleculares de DNA) –  
UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Rosana Rodrigues (D.Sc., Melhoramento Visando Resistência à Doenças  
e Recursos Genéticos Vegetais) – UENF

---

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Melhoramento de Fruteiras) – UENF  
Orientador

A Deus por todas as graças e proteção.  
Aos meus pais pelo apoio em todas as fases da minha vida

**AGRADEÇO**

Aos meus avós Firmino e Jacy (*in memoriam*)

**DEDICO**

A todos que me ajudaram a realizar este trabalho

**OFEREÇO**

*“Se enxerguei mais longe  
foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”*

*Isaac Newton*

## AGRADECIMENTO

- A Deus por todas as graças e proteção, que em todos os momentos me guiou e me fortaleceu, expressando, de forma simples e grandiosa, seu imenso amor;
- À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF pela oportunidade concedida para a realização de um ótimo curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas;
- A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ pela concessão bolsa e pelo financiamento do projeto;
- Aos meus pais Maria da Penha Palácios de Souza e Advair Oliveira de Souza por todo entusiasmo, dedicação e ensinamentos e pelo apoio em todas as fases da minha vida, em especial, a acadêmica.
- À minha irmã Soraya Helena Palácios de Souza por toda a ajuda, incentivo, interesse, companheirismo, apoio e que, mesmo com a distância, esteve presente participando de todos os momentos;
- À minha querida sobrinha Letícia Palácios de Souza Colombi pela alegria, inspiração, leveza, ou seja, tudo que uma criança pode transmitir nesse momento;
- Aos meus avós Firmino Palácios e Jacy Ferreira Palácios, que mesmo não presentes fisicamente, estiveram em meus pensamentos em todos os momentos;

- Ao meu Orientador Prof. Alexandre Pio Viana por toda a atenção, apoio e dedicação dispensados a mim, e pelo exemplo de profissional onde seus ensinamentos contribuíram para o aprimoramento e realização deste trabalho;
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, em nome da Dr<sup>a</sup>. Cláudia Fortes Ferreira e do Dr. Sebastião de Oliveira Silva pelas valiosas contribuições e sugestões para realização deste trabalho e pela doação dos rizomas de diplóides de bananeira utilizados neste trabalho e pelo rápido atendimento à minha solicitação;
- Aos meus Conselheiros Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira pelo apoio constante e pelos estímulos para continuar firme na minha caminhada, pelos preciosos ensinamentos para a vida científica e, sobretudo, pela amizade e Prof. Messias Gonzaga Pereira pelos ensinamentos, amizade e pela grande colaboração desprendida aos trabalhos realizados durante o mestrado;
- Aos professores do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal - LMGV em especial ao professor Antônio Teixeira do Amaral Junior pelas sugestões, por todo apoio e pelas excelentes aulas de melhoramento genético vegetal;
- À técnica Vitória que sempre foi tão dedicada e amorosa, pela imprescindível colaboração, pelas sugestões e pela amizade;
- Aos funcionários da secretaria de pós-graduação do CCTA: Daniel, Patrícia, Luciana e Fátima sempre prontos a ajudar;
- Aos amigos do curso de Pós-Graduação aqui conquistados, especialmente os do LMGV: Ana Paula, Lucileia, Gustavo, Karina, Neuma, Ramon, Francisco, Felipe, Francisco e tantos outros pelo apoio e pela ótima convivência;
- As queridas amigas Lea, Rejane, Derliane, Poliana e Janice pela acolhida e pelo entusiasmo de todos os dias que me ajudou a superar momentos difíceis de saudade. Obrigada por ter compartilhado comigo tantos momentos importantes;
- Aos queridos amigos da UENF Marcela, André, Robson Mendes, Robson Meireles, Renata, Thaís, Alessandra, pelo convívio e amizade;
- Agradeço ainda aos meus queridos avós Arinel de Souza a Maria Oliveira de Souza, tios e primos da minha família, por serem uma grande e forte torcida;
- Às amigas Aline e Alessandra e tantos outros que mesmo longe se solidarizaram com a minha luta cotidiana;
- E por fim, agradeço a todos aqueles que participaram de alguma forma do longo caminho percorrido até a conclusão da presente Tese.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	04
2.1. A bananeira .....	04
2.1.1. Aspectos botânicos e morfológicos .....	05
2.1.2. Importância econômica da banana .....	06
2.1.3. Organização do genoma .....	07
2.1.4. Melhoramento da bananeira .....	08
2.2. Marcadores Moleculares .....	11
2.2.1. Marcadores baseados em PCR .....	11
2.2.2. Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) .	12
2.2.2.1. Vantagens de marcadores RAPD .....	13
2.2.2.2. Limitações dos marcadores RAPD .....	13
2.2.3. Aplicações dos marcadores moleculares na genética e melhoramento de plantas .....	14
2.3. “DNA Fingerprint” .....	15
2.3.1. Aplicação dos marcadores moleculares no estudo do “DNA Fingerprint” .....	17
2.4. Diversidade genética .....	19
2.4.1. Aplicação dos marcadores no estudo da diversidade genética .....	19
2.4.2. Medidas de similaridade .....	20

2.4.3. Análise de agrupamento .....	21
2.4.3.1. Método hierárquico UPGMA.....	21
2.4.3.2. Método de Otimização de Tocher.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1. Material Genético .....	24
3.2. Caracterização molecular via RAPD .....	27
3.2.1. Análise Molecular .....	27
3.2.2. Seleção de iniciadores .....	29
3.2.3. PCR .....	29
3.3. Estudo do “DNA fingerprint” .....	31
3.4. Análise de Divergência Genética via Marcadores RAPD .....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1. “DNA Fingerprint” .....	33
4.2. Diversidade genética .....	47
4.2.1. Ensaio RAPD .....	47
4.2.2. Matrizes de dissimilaridade .....	49
4.2.3. Análise de agrupamento .....	49
4.2.3.1. Método hierárquico UPGMA .....	51
4.2.4. Método de otimização de Tocher .....	57
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## RESUMO

SOUZA, Carolina Maria Palácios de; Eng<sup>a</sup>. Agrônoma; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2006; “DNA Fingerprint” via marcadores RAPD e avaliação da divergência genética em genótipos de bananeira (*Musa* spp.); Prof. Orientador: Alexandre Pio Viana. Conselheiros: Prof. Messias Gonzaga Pereira, Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira, Dr<sup>a</sup> Cláudia Fortes Ferreira.

A bananicultura possui grande importância econômica e social no Brasil. A UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro), por meio do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal iniciou um trabalho de introdução de cultivares de bananeira visando a recomendação para produtores das regiões Norte e Noroeste Fluminense. Foram introduzidas cultivares com procedência da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e Embrapa Amazônia Ocidental. O objetivo deste estudo foi obter um “DNA Fingerprint” capaz de diferenciar os 21 genótipos/cultivares introduzidos na UENF, realizar um estudo de diversidade genética entre esses 21 cultivares e obter a correta identificação de possíveis genótipos introduzidos na UENF. Foram avaliados os seguintes genótipos: Fhia 18, Prata Anã, UENF 1526, Pacovan, Caipira, Maçã, UENF 1527, Nanicão, Thap Maeo, UENF 1528, UENF 1529, Grande Naine, Ambrósia, Bucaneiro, Calipso, PV42-68, PV42-85, PV42-142, ST12-31, Calcutta e BB da França. A análise de “DNA Fingerprint” entre os genótipos e a análise de divergência genética foi feita com base na caracterização molecular, utilizando-se a técnica RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). Foram

utilizados 31 iniciadores para obter bandas RAPD, gerando um total de 94 marcas totais, sendo 19 marcas monomórficas e 75 marcas polimórficas. Das 75 marcas polimórficas, 44 apresentaram a mesma função, sendo capazes de diferenciar os genótipos Calcutta e BB da França. Outras marcas RAPD possibilitaram a diferenciação entre os 21 genótipos, baseando-se na presença ou ausência da marca para determinado genótipo, ou considerando um conjunto de marcas para determinado material vegetal. Alguns genótipos puderam ser diferenciados dos demais pela presença de marcas e/ou pela ausência de marcas. Porém, a maioria das caracterizações só foi possível quando consideradas o conjunto das marcas, ajudando no processo de identificação dos genótipos UENF 1526, UENF 1527, UENF 1528 e UENF 1529. Os marcadores RAPD mostraram-se como uma ferramenta eficiente para a caracterização molecular e conseqüentemente para a obtenção do “DNA Fingerprint” para todos os 21 genótipos de bananeira estudados. Os resultados mostraram também que os marcadores moleculares RAPD foram eficazes em revelar a existência de diversidade genética entre os 21 genótipos de bananeira. Na interpretação das análises moleculares, foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard. Com base nas análises de agrupamento hierárquicas UPGMA e o método de otimização de Tocher, essa diversidade pôde ser observada pela presença de genótipos similares e divergentes.

## ABSTRACT

SOUZA, Carolina Maria Palácios de; Agronomist; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March 2006; "DNA Fingerprint" by RAPD markers and evaluation of the genetic divergence in banana genotypes (*Musa* spp.); Prof. Advisor: Alexandre Pio Viana. Counselors: Prof. Messias Gonzaga Pereira, Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira, Dr<sup>a</sup> Cláudia Fortes Ferreira.

Banana crop represents great economic and social importance in Brazil. UENF (State University of Northern Rio de Janeiro Darcy Ribeiro), through the Plant Genetic Breeding Laboratory, initiated the work of the introduction of banana cultivars aiming the recommendation to banana producers of the North and Northwest Fluminense Regions. Cultivars from the Embrapa Cassava and tropical Fruits and Embrapa Eastern Amazon werw introduced. The objective of the present work was to obtain DNA fingerprints capable of discriminating genotypes/cultivars being introduced at UENF, carry out genetic diversity studies between 21 cultivars and to obtain the correct identification of possible genotypes introduced at UENF. The following genotypes were evaluated: Fhia 18, Prata Anã, UENF 1526, Pacovan, Caipira, Maçã, UENF 1527, Nanicão, Thap Maeo, UENF 1528, UENF 1529, Grande Naine, Ambrósia, Bucaneiro, Calipso, PV42-68, PV42-85, PV42-142, ST12-31, Calcutta and BB da França. The DNA fingerprint analysis between the genotypes and the genetic diversity analysis was carried out based in the molecular characterization, using RAPD technique (Random Amplified Polymorphic DNA). Thirty-one primers were used in order to obtain RAPD bands, generating a total of 94 bands, whereas 19 were

monomorphic and 75 polymorphic. Of the 75 polymorphic bands, 44 presented the same behavior, being able to discriminate the Calcutta and BB da França genotypes. Other RAPD bands enable the discrimination between the 21 genotypes, based in the presence or absence of bands for a determined genotype, or considering a group of bands for a specific genotypic material. Some genotypes were able to be discriminated from the remaining due to the presence of bands and/or absence. However, most of the characterization was only possible when the group of bands was considered, turning easier the process of identification of the UENF 1526, UENF 1527, UENF 1528 and UENF 1529 genotypes. The RAPD technique presented as an efficient tool in the molecular characterization and consequently for the obtainment of the DNA fingerprint for all the 21 banana genotypes studied. In the interpretation of the molecular analysis, the arithmetic complement of the Jaccard index was used. Based on the cluster hierarchic UPGMA analysis and the optimization method of Tocher, this diversity could be observed by the presence of similar and divergent genotypes.

## 1. INTRODUÇÃO

O setor frutícola tem sido sem dúvida, um importante representante do segmento agrícola no cenário internacional. Em 2002 segundo dados do Ministério da Agricultura, foram exportadas 679,71 mil toneladas de frutas frescas, o que correspondeu a um aumento de 15% em relação ao mesmo período do ano anterior (Nachreiner et al., 2004).

Apesar de seu potencial de produção durante o ano todo, poucas são as frutas brasileiras que podem ser exportadas em volume considerável ao longo do ano. Dependendo da competitividade da produção nacional de determinada fruta em relação aos seus concorrentes, a comercialização brasileira fica restrita a determinadas “Janelas de mercado”. Isso limita a ampliação das exportações brasileiras e concentra nosso volume em épocas do ano restritas, favorecendo uma pressão negativa nos preços quando há aumento nos embarques brasileiros (Nachreiner et al., 2004).

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas, segundo as estatísticas da FAO (2001), com uma produção superior a 30 milhões de toneladas. Apesar da expressiva participação no cenário mundial, cerca de 10% do total produzido, o Brasil não tem conseguido se impor no importante mercado de frutas frescas, não passando de 2% para determinadas frutas, estando a sua produção voltada para o mercado interno (Alves, 1999).

Neste contexto, a bananicultura possui grande importância econômica e social, sendo cultivada numa extensa região tropical, geralmente por pequenos agricultores (Neves et al., 2002). O Brasil é o terceiro produtor mundial de

banana, com produção aproximada de 6,6 milhões de toneladas anuais, numa área cultivada de 485 mil hectares (IBGE, 2005).

A produção brasileira de banana é particular no sentido de sua distribuição espacial, estando presente em todos os estados do Brasil e ocupando em alguns, elevada importância social e econômica. À banana cabe o papel fundamental como importante fonte de alimentação, fixadora de mão-de-obra no meio rural e geradora de divisas para o país (Alves, 1999).

As Regiões Sul e Sudeste, com maior nível tecnológico e organização dos produtores, estando mais próximas dos países do extremo sul da América, que também apresentam um expressivo mercado de banana, podem formar uma importante região com potencial de exportação dessa fruta, principalmente para países como: Argentina, Uruguai e Paraguai. Nessas regiões, as variedades tipo Cavendish (Nanica e Nanicão) são as mais expressivas, seguidas da cultivar Prata (Cordeiro, 2000).

Em 2000 a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por meio do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal iniciou um trabalho de introdução de cultivares de bananeira visando a recomendação para produtores das Regiões Norte e Noroeste Fluminense. Foram introduzidas cultivares com procedência da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e Embrapa Amazônia Ocidental. Após cultivo por três ciclos de produção, procedeu-se à caracterização desses genótipos no que se refere a aspectos produtivos e qualitativos. Observou-se ao final das análises e discussão dos dados, que as mesmas cultivares com procedências diferentes, apresentavam comportamento diferente e verificou-se também cultivares muito produtivas, resistentes a Sigatoka-negra com potencial para uso em programas de melhoramento genético.

Pretende-se, por meio da utilização dos marcadores de DNA, desenvolver um sistema de "Fingerprinting" no sentido de assegurar a identidade dos cultivares de bananeira que foram introduzidas na UENF, além de se estudar a diversidade genética entre os genótipos.

Deste modo, o estabelecimento de protocolos cada vez mais rápidos e confiáveis para a obtenção de marcadores de DNA é suma importância para o sucesso da linha de pesquisa de Melhoramento Genético da Bananeira, a qual

se pretende dar continuidade na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

O objetivo deste estudo é obter um “DNA Fingerprint” capaz de diferenciar os 21 genótipos/cultivares introduzidos na UENF e realizar um estudo de diversidade genética entre os 21 genótipos com propósito de obter uma base para o programa de melhoramento genético e, além disso, obter a correta identificação de possíveis genótipos introduzidos na UENF.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A bananeira

A maioria das cultivares de banana originou-se do Continente Asiático, embora existam centros secundários de origem na África Oriental e nas ilhas do Pacífico, além de um importante centro de diversidade na África Ocidental (Alves, 1999).

A bananicultura tem evoluído consideravelmente nas últimas décadas, por ser um dos cultivos perenes de mais rápido retorno do capital investido, apresentando um fluxo contínuo de produção a partir do primeiro ano, o que a torna muito atraente para os agricultores (Alves, 1999).

Contudo, os sistemas de cultivo utilizados precisam buscar, sempre, os avanços tecnológicos disponíveis, para que se obtenham boas produtividades e um produto da melhor qualidade possível, atingindo-se adequadamente a etapa final da cadeia produtiva da banana, ou seja, o consumidor (Alves, 1999).

No Brasil, o uso de cultivares tradicionais, associado ao manejo inadequado dos bananais, tem provocado o aumento da incidência de doenças e pragas. Além de mal-do-Panamá, Sigatoka-amarela, moko, nematóides e broca, que dificultam o cultivo da bananeira. Existe ainda a ameaça de introdução da Sigatoka-negra que pode causar sérios prejuízos à bananicultura nacional. No entanto, existe a possibilidade de obtenção de híbridos que reúnam características de resistência às pragas e doenças, associadas a um porte

adequado e boa aceitação comercial, mediante o melhoramento genético (Alves, 1999).

### 2.1.1. Aspectos botânicos e morfológicos

Reino ----- Vegetal  
Ramo ----- Phanerogamae  
Classe ----- Liliopsida  
Ordem ----- Scitaminales  
Família ----- Musaceae  
Subfamília ---- Musoideae  
Gêneros ----- *Ensete e Musa*

A bananeira, planta típica das regiões tropicais úmidas é um vegetal herbáceo completo, pois apresenta raiz, caule subterrâneo (rizoma), folhas, flores, frutos e sementes (Ruggiero, 2001).

Algumas espécies de bananeira podem alcançar até oito metros de altura, sendo o seu pseudocaule formado pelas bainhas das folhas, e a inflorescência surge no meristema do caule subterrâneo, atravessa o pseudocaule, emerge através da roseta foliar, em até um ano após o plantio, emergindo na forma de um coração fechado, contendo todas as pencas. O desenvolvimento das folhas ocorre a partir do ponto de crescimento do rizoma, sendo que cada uma caminha por todo interior do pseudocaule e emerge enrolada (Ruggiero, 2001).

O eixo da inflorescência é a continuação do pedúnculo floral, formado na região meristemática do ápice do rizoma. Nessa estrutura, as folhas são substituídas por brácteas, das quais as três ou quatro primeiras, que são as maiores, não recobrem as flores. A inflorescência, ao sair do pseudocaule, possui posição horizontal. Cada grupo de flores ou pencas são protegidas por uma bráctea, apresentando duas fileiras de flores, sendo quatro a oito por fila (Silva et al., 2002).

As flores são de natureza irregular e se constituem de três grupos de peças florais: periantro, androceu e gineceu, que estão inseridos no ponto de conexão do estilete com o ovário. O ovário é uma estrutura comprida, estreita e

normalmente curva. O estigma, esferoidal e bem desenvolvido, apresenta seis lóbulos em sua superfície, enquanto o estilete tem a forma cilíndrica. O androceu é constituído por cinco ou seis estames livres. As anteras são bem desenvolvidas, com pólen inviável em grande parte das cultivares, ao contrário do que ocorre com as espécies silvestres. (Silva, 2002).

Os frutos partenocárpicos são bagas alongadas e triloculares. O pericarpo corresponde à casca e o mesocarpo é a polpa comestível. Existe uma grande variação no tamanho, número e formato dos frutos que dependem da cultivar e das condições de vegetação da planta. A casca apresenta coloração que vai do creme-palha a quase preta, passando por verde-clara, amarela e avermelhada. A coloração da polpa pode variar entre branca, creme, amarelada e rósea (Alves, 1999).

#### 2.1.2. Importância econômica da banana

Dentre as frutas, a banana, hoje, é uma das mais produzidas e consumidas no mundo. A produção mundial de bananas, em 2001, foi de aproximadamente 58,69 milhões de toneladas, atingindo, em 1994, o consumo de 12.400.000 t/ano (FAO, 2001). O mercado teve um crescimento médio estimado em 4% ao ano até o ano 2000; a partir de então se elevou para 7% ao ano devido à entrada de compradores do Leste Europeu, o que elevará seu potencial de mercado para mais de 20.000.000 t/ano em 10 anos.

A produção de banana no Brasil em 2004 foi de 6.602.749 toneladas com uma área total plantada de 484.981 hectares e rendimento médio de 13.614 quilogramas por hectare, menor que o ano anterior que foi de 6.774.985 toneladas com uma área plantada de 512.826 hectares. O rendimento médio de 2003 foi de 13.211 quilogramas por hectare, inferior ao de 2004, conferindo uma maior produtividade (IBGE, 2005).

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta típica tropical, exigindo temperaturas entre 20 e 35°C, elevada umidade relativa e precipitações bem distribuídas para a produção e desenvolvimento. Embora tais fatores climáticos limitem a área de produção, o Brasil apresenta condições favoráveis ao cultivo da bananeira em quase toda a sua área territorial, com algumas restrições (Alves, 1999).

Consumida em sua quase totalidade na forma *in natura*, a banana é parte integrante da alimentação das populações de baixa renda, não só por seu alto valor nutritivo como por seu custo relativamente baixo. Cabe-lhe ainda um papel importantíssimo na fixação da mão-de-obra rural (Alves, 1995).

A bananeira é cultivada de Norte a Sul do País, praticamente toda fruta produzida é comercializada no mercado interno. Assim o consumo efetivo de banana está na faixa de quatro milhões de toneladas, uma vez que as perdas pós-colheita chegam a 40% da produção. A maioria dos bananicultores são pequenos produtores, que usam a banana como fonte de recurso adicional. A importância estende-se à fixação do homem no campo, sendo inclusive uma fonte contínua de alimento e de renda, pois é produzida durante todo o ano (Silva et al., 1999).

Dado o seu enorme potencial, a bananicultura é motivo de interesse cada vez maior da parte dos pesquisadores do mundo inteiro. Todavia, o inventário dos conhecimentos científicos e tecnológicos disponíveis sobre essa cultura é ainda relativamente pequeno. Além disso, são muitos os problemas básicos que impedem seu desenvolvimento e aproveitamento em maior escala (Alves, 1995).

### 2.1.3. Organização do genoma

As cultivares encontradas nas regiões dos centros de diversidade genética da bananeira evoluíram de espécies silvestres e apresentam três níveis cromossômicos, existindo diplóides com 22 cromossomos ( $2n=2x$ ), triplóides com 33 ( $2n=3x$ ) e tetraplóides com 44 cromossomos ( $2n=4x$ ), que são múltiplos do genoma básico ( $n=x=11$ ); a origem de triplóides a partir de diplóides e de tetraplóides a partir dos triplóides é facilmente constatada em cruzamentos experimentais (Silva et al., 1999).

O maior avanço em termos de classificação botânica de bananeiras deve-se a Simmonds e Shepherd. Em 1955, esses autores estabeleceram um sistema taxonômico para os diversos tipos de bananeiras do gênero *Musa* baseado no nível de ploidia e na contribuição relativa das duas espécies que os originaram (*M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla). Os genomas das bananeiras são denominados pelas letras A (do diplóide silvestre *M. acuminata*) e B (do diplóide

silvestre *M. balbisiana*), de cujas combinações resultam os grupos AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB. Esse sistema vem sendo amplamente utilizado, sofrendo apenas alguns ajustes. Mas, o que mais impressiona em relação à precisão e atualidade do sistema é que o uso de modernas técnicas moleculares tem confirmado as propostas iniciais, separando clones puros *acuminata* de puros *balbisiana*, bem como seus híbridos (Ruggiero, 2001).

Cruzamentos interespecíficos entre *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla deram origem à maioria das bananeiras atualmente em uso para alimentação, razão pela qual as plantas geradas desses cruzamentos apresentam características das duas espécies (Silva et al., 1999).

Além dos grupos genômicos, foi estabelecido o termo subgrupo para denominar um complexo de cultivares originários de mutações de um único cultivar original, como no caso do grupo AAA, subgrupo Cavendish, e grupo AAB, subgrupos Prata e Terra, no Brasil (Simmonds, 1973).

A divisão em subgrupos está relacionada a ocorrência de pequenas mutações em um clone, porém com efeito importante em seu uso e comercialização (Dantas et al., 1997). Tais mutações refletem principalmente alterações na coloração das folhas e pseudocaule, bem como mudanças no porte e vigor das plantas (Jenny et al., 1999). Porém, variações expressivas em caracteres morfológicos nem sempre refletem o mesmo grau de variações genéticas (Gawel et al., 1992). A variabilidade existente dentro de cada subgrupo é dependente principalmente do genótipo e da intensidade com que cada clone é multiplicado (Jenny et al., 1999).

#### 2.1.4. Melhoramento da bananeira

As bananeiras silvestres são diplóides ( $2n=22$ ), seminíferas, geralmente alógamas e apresentam sementes férteis, das quais dependem para sua dispersão, enquanto as cultivares comerciais são triplóides ou tetraplóides, com  $2n=33$  e  $2n=44$  cromossomos e não produzem sementes. A ausência de sementes pode estar relacionada à intensa seleção, reflexo do processo de domesticação da espécie. Dessa forma, as bananeiras comestíveis são

normalmente propagadas vegetativamente, por meio de mudas desenvolvidas a partir de gemas do seu caule subterrâneo ou rizoma (Silva et al., 2002).

A indução de mutações, o uso da engenharia genética e a hibridação convencional, são técnicas de possível aplicação em bananeira (Silva et al., 2002). No estudo de Bhagwat et al. (1998) explantes de *Musa* crescidas *in vitro* foram expostos a várias doses de radiação gama para avaliar a efetividade da indução de mutações e também com o objetivo de obter variantes tolerantes ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* e muitas destas plantas foram consideradas tolerantes ao fungo. Atualmente, entretanto, a hibridação tem se mostrado mais eficaz que as demais técnicas (Silva et al., 2002).

Em face da esterilidade feminina das bananeiras comestíveis, não basta apenas existir a variabilidade genética básica. Também têm de existir opções de hibridação para o aproveitamento dessa variabilidade na geração de novas cultivares, com características melhoradas. No entanto, a esterilidade feminina das cultivares existentes não é absoluta. A maioria delas, em todos níveis de ploidia, é capaz de produzir sementes em polinizações controladas (Silva et al., 2002). Quanto à esterilidade masculina, com o passar do tempo, a idéia de que os poliplóides naturais surgiram pela união de gametas não reduzidos passou a ser amplamente aceita em *Musa*, sendo, atualmente, consenso entre os pesquisadores (Schifino-Wittmann et al., 2001).

Podem ser consideradas quatro classes de hibridação: triplóides resultantes de cruzamento de diplóides com diplóides, com a recombinação originária apenas do genitor diplóide masculino; tetraplóides resultantes de cruzamentos de triplóides com diplóides, com a recombinação originária apenas do genitor diplóide masculino; tetraplóides resultantes de cruzamentos entre tetraplóides, com segregação nos dois genitores; e triplóides resultantes de cruzamentos entre tetraplóides e diplóides, também com segregação nos dois genitores (Silva et al., 2002).

O pré-requisito básico dos programas de pesquisa objetivando produzir novas cultivares tem sido a formação, caracterização e avaliação de amplas coleções de germoplasma. Na utilização desse germoplasma, o aumento da variabilidade desejada ou a eliminação da variabilidade indesejada são etapas de real importância no esquema de melhoramento genético pretendido. De modo geral, quando essa variabilidade é bem adequada ao trabalho do

melhorista, não há justificativa para proceder à indução de mutações (Silva et al., 1999).

As atividades de melhoramento genético da bananeira no Brasil tiveram início na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical em 1983, com a introdução de germoplasma nacional e coleta em nível internacional formando assim o Banco de Germoplasma de Banana (Silva et al., 1999). Embora prejudicado pelas restrições legais, o intercâmbio de germoplasma tem sido feito por intermédio da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, usando ápices caulinares *in vitro*. Os acessos (400) vêm sendo mantidos em campo em Cruz das Almas (BA), na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (Silva et al., 2003).

Na bananeira, a variabilidade genética importante localiza-se entre as diversas formas silvestres da espécie *M. acuminata* e nas cultivares do grupo AA. Esta espécie abrange sete subespécies, algumas ainda não bem definidas e cada uma com a sua própria distribuição na Ásia e na Oceania. As diferenças morfológicas são tão acentuadas que, se não fosse a facilidade de obter híbridos férteis entre estas subespécies, seria possível classificá-las como espécies distintas. As cultivares AA também apresentam uma grande diversidade morfológica, muitas se mostrando estéreis ou pouco férteis (Alves, 1999).

Embora exista um grande número de variedades de bananeira no Brasil, quando se consideram aspectos como preferência dos consumidores, produtividade, tolerância às doenças, porte adequado e resistência à seca e ao frio, restam poucas com potencial agrônômico para serem usadas comercialmente. As cultivares mais difundidas no Brasil são: Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, utilizadas principalmente na exportação, e Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D'Angola, do grupo AAB (Silva et al., 1999). Todas as cultivares mencionadas apresentam pelo menos uma característica indesejável, como porte inadequado ou susceptibilidade a alguma doença.

Uma das estratégias para a solução do problema da falta de variedades adequadas, é o desenvolvimento de novos genótipos resistentes a doenças, nematóides e pragas, produtivos, que apresentem porte apropriado e que sejam aceitos pelo consumidor, mediante técnicas de melhoramento genético

possibilitando a obtenção de híbridos tetraplóides superiores a partir dos cultivares triplóides tradicionais (a exemplo do programa em desenvolvimento na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical). A etapa final do melhoramento constitui-se na avaliação dos novos genótipos em áreas de produção (Donato et al., 2003). De acordo com Silva et al (1999), o uso de cultivares resistentes é uma das alternativas mais efetivas para o controle de doenças, uma vez que não depende da ação do produtor durante a fase de crescimento das plantas, não é prejudicial ao meio ambiente e, geralmente, é compatível com outras técnicas de manejo. Além de aumentos de produtividade e melhoria na qualidade dos frutos, uma boa cultivar (resistente às doenças, nematóides e pragas) implicará em menor custo de produção em função do reduzido emprego de defensivos agrícolas e redução de gastos com o manejo da cultura, aumentando, conseqüentemente, a renda líquida do produtor.

A tendência geral do melhoramento genético de plantas é a integração das técnicas clássicas com aquelas mais modernas da biotecnologia, levando-se em consideração as vantagens e limitações de cada uma delas. Neste contexto, a tecnologia de marcadores moleculares pode contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado, e para a geração e desenvolvimento de produtos melhorados (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Já foram desenvolvidos sistemas de marcadores de DNA em *Musa* para ajudar na administração do germoplasma, seleção dentro do complexo gênico ou introgressão de espécies silvestres, e para diagnose de doenças (Crouch et al., 1998).

## 2.2. Marcadores Moleculares

### 2.2.1. Marcadores baseados em PCR

Técnicas que fazem uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), têm acelerado o desenvolvimento de novos sistemas para obtenção de marcadores de DNA, tal como microssatélites ou SSRs (Simple Sequence Repeats). Estes marcadores consistem de seqüências curtas de nucleotídeos repetidas na mesma ordem, cujo nível de polimorfismo produzido é devido à variação do número de unidades de repetição em um determinado loco. Marcadores SSR's

são obtidos com o uso de iniciadores que flanqueiam regiões contendo os microssatélites. Os iniciadores para SSR são desenhados a partir do seqüenciamento de fragmentos de DNA, obtidos de bibliotecas genômicas, onde os microssatélites foram previamente localizados (Salla et al., 2002). Dados de microssatélites obtidos para o gênero *Musa* (banana), mostram uma aplicação imediata para análise genética e sugerem que SSR's podem servir de âncora para a construção de um mapa genético básico em banana (Kaemmer et al., 1997). O trabalho de Souza (2002) mostrou que 11 locos microssatélites foram capazes de discriminar a maioria das cultivares de bananeira e em alguns casos, discriminar clones de seus respectivos mutantes somáticos, cultivares erroneamente classificados e identificar duplicatas. Marcadores SSR's podem também ser obtidos, usando oligonucleotídeos de seqüências simples repetidas como iniciadores na amplificação de DNA por PCR ou, ainda, como sondas em experimentos de hibridização envolvendo DNA genômico, para a detecção de polimorfismo em famílias de DNA repetitivo (Salla et al., 2002).

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Muitos métodos tradicionais de clonagem, seqüenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR. Uma destas derivações é a tecnologia RAPD que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando iniciadores de seqüência arbitrária (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

### 2.2.2. Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

Um dos aspectos mais fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos para DNA. Entretanto, a técnica de PCR ainda apresentava uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares anônimos distribuídos pelo genoma. O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar iniciadores mais

curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de seqüência. A técnica de PCR utilizando iniciadores de seqüência arbitrária abriu uma perspectiva inteiramente nova para a análise genômica de indivíduos e populações. Além de facilitar e acelerar os estudos que já ocorriam com as espécies mais tradicionais, a tecnologia RAPD trouxe uma verdadeira “democratização” da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

#### 2.2.2.1. Vantagens dos marcadores RAPD

RAPD reúne, portanto, a simplicidade técnica da visualização direta dos marcadores isoenzimáticos, com o poder de resolução dos marcadores de DNA. O uso da técnica RAPD não requer experiência aprofundada em biologia molecular e nem tampouco instalações sofisticadas de laboratório. É uma tecnologia bastante acessível, que pode ser transferida diretamente para estações experimentais de melhoramento, para laboratórios avançados de pesquisa a ser utilizada cotidianamente pelo geneticista. Neste contexto, a técnica RAPD é uma das poucas ferramentas disponíveis hoje que efetivamente permite a análise genética detalhada para um grande número de marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

#### 2.2.2.2. Limitações dos marcadores RAPD

A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado: o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente com um alelo nulo. Outro aspecto que pode ser uma limitação em alguns casos é o desconhecimento prévio da base genética das bandas RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Outra limitação da técnica de RAPD é a baixa repetibilidade que se pode apresentar (Santos, 1994).

### 2.2.3. Aplicações de marcadores moleculares na genética e melhoramento de plantas

O sucesso de um programa de melhoramento genético depende fundamentalmente de algumas etapas como a escolha de genitores que produzam indivíduos com a melhor combinação de alelos favoráveis e a seleção de genótipos superiores em populações segregantes (Lanza et al., 2000).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, que culminou no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente (Lanza et al., 2000). Os marcadores moleculares são considerados potentes ferramentas no auxílio do melhoramento, pois fornecem um número ilimitado de polimorfismo com base no DNA e são independentes dos efeitos ambientais e do estado fisiológico da planta, permitindo a identificação precoce e precisa de indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis (Ferreira e Grattapalia, 1998)

Nos últimos dez anos, técnicas que permitem fazer distinção diretamente em nível de DNA têm permitido acessar a variabilidade genética dentro do complexo gênico de espécies cultivadas, assim como identificar a diversidade disponível em bancos de germoplasma. Os marcadores de DNA apresentam vantagens em relação aos marcadores isoenzimáticos, uma vez que podem ser obtidos em grande número e não sofrem influência dos efeitos ambientais (Borém, 2001). Wesh e McClelland (1990) e Williams et al (1990) introduziram uma técnica que se baseia na detecção de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), usando oligonucleotídeos de dez bases. Esta técnica tem se mostrado eficiente na identificação da variabilidade genética em diversos grupos de plantas e pode ser usada como uma ferramenta auxiliar em programas de melhoramento, encontrando também aplicação na obtenção de mapas genéticos e identificação de marcadores moleculares úteis na seleção assistida, entre outras. Os distintos tipos de marcadores moleculares disponíveis, atualmente, diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade de DNA (Kaemmer et al., 1997). A técnica DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) é baseada em PCR (“polymerase chain reaction”), usa um único iniciador por vez para amplificar fragmentos pequenos de DNA (Williams et al., 1990). Essa amplificação é simultânea em vários locos aleatórios no genoma

(Ferreira e Grattapaglia, 1998) e é apropriada para revelar polimorfismo entre indivíduos. Uma das vantagens da técnica é não ser necessário o conhecimento prévio da seqüência a ser estudada.

Marcadores RAPD foram usados para acessar a variabilidade genética contida em coleções de milho, rosa, centeio, sorgo e arroz. Poucos exemplos do uso de RAPD têm sido mostrados na literatura em frutíferas (Salla et al., 2002). Em ameixa, por exemplo, os marcadores RAPD foram utilizados na caracterização genético-molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares e resultados significativos foram obtidos com estes marcadores, permitindo estimar a variabilidade genética entre genótipos e a diferenciação das espécies (Bianchi et al., 2003). Em pereiras também houve a caracterização e identificação de cultivares e seleções por meio de marcadores RAPD. Estes podem auxiliar em muito os melhoristas da pereira, seja para identificação de prováveis parentais de híbridos, cuja origem é desconhecida, seja para estruturar a variabilidade genética no sentido de direcionar cruzamentos entre grupos heteróticos de interesse (Sawazaki et al., 2002).

Com os avanços biotecnológicos, tem sido crescente a utilização de técnicas de marcadores de DNA no estudo da diversidade genética em plantas. Técnicas como determinação de padrões isoenzimáticos ou amplificação casualizada de DNA polimórfico (RAPD) têm sido empregadas na busca de verificar variações somaclonais, mutações e polimorfismo, entre outras (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O uso de marcadores RAPD permite a pesquisa de indivíduos dentro de uma população heterogênea e baseia-se na identificação de proporções de polimorfismo e de marcadores compartilhados, permitindo a identificação do parentesco entre cultivares e inferências da diversidade existente entre e dentro de cultivares (Gottardi et al., 2002)

### 2.3. “DNA Fingerprint”

“DNA Fingerprints” têm sido utilizados para descrever o padrão molecular de um genótipo. Eles podem ser obtidos a partir de vários tipos de marcadores moleculares. Resumidamente estes marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, a depender da metodologia utilizada para

identificá-los: 1) hibridização de DNA (RFLP e minissatélites) ou 2) amplificação de DNA (RAPD, SCAR, microsatélite ou SSR, AFLP). Para cada tipo de marcador de DNA existem vantagens e limitações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Desde 1994, uma técnica de marcador molecular nova, chamada amplificação inter repetições de seqüência simples (ISSR - Inter Simple Sequence Repeats) está disponível. ISSRs são marcadores semiarbitrários, ampliados por PCR em presença de um oligonucleotídeo complementar para um microsatélite designado (Zietkiewicz et al., 1994). No trabalho de Godwin (1997) com banana e sorgo, os dados indicam que este não é geneticamente um resultado de maior polimorfismo, porém, normalmente técnica de ISSR demonstra um nível mais alto de polimorfismo que a técnica de RFLP.

A técnica IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) detectou níveis altos de polimorfismo sem a necessidade de digerir DNA, ligações ou sondas de hibridação para gerar dados de marcador, aumentando assim a confiança e robustez do ensaio. No estudo de Teo et al. (2005) foi aplicado métodos de IRAP para gerar marcadores moleculares que caracterize a constituição de genoma e a diversidade de espécies do gênero *Musa* que obteve como resultado um alto grau de polimorfismo dos produtos de IRAP. Enquanto no trabalho de Nair et al. (2005), os iniciadores usados (IRAP) foram úteis para identificar a presença do genoma B em cultivares de banana e a intensidade da banda como indicador preliminar do nível de ploidia do genoma B.

O uso do "DNA fingerprinting" para a conservação e o melhoramento do germoplasma de *Musa* permite a identificação de espécies e cultivares e a determinação das relações evolutivas entre os clones. Ajuda na identificação de duplicatas entre os acessos no campo e em bancos de germoplasma de cultura de tecidos. Também pode ser usado no monitorando da estabilidade genética do material da cultura de tecido (e.x. variação somaclonal) e identificação de características dos marcadores para uso em cruzamentos e mutação em programas de melhoramento (Onguso et al., 2004).

### 2.3.1. Aplicação dos marcadores moleculares no estudo do “DNA Fingerprint”

Um dos marcadores mais utilizados para confecção de “DNA fingerprints” é o RAPD. Os marcadores RAPD usam iniciadores curtos e de seqüências arbitrárias para dirigir a reação de amplificação do DNA, eliminando a necessidade de conhecimento prévio da seqüência (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Isto gera fragmentos desconhecidos de DNA que quando submetidos à separação por eletroforese, formam um RAPD “fingerprint” a partir da visualização das bandas de DNA no gel.

As análises de RAPD “fingerprint” estão baseadas no fato de que cada iniciador arbitrário dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos no genoma, resultando assim em várias bandas com pesos moleculares diferentes, a depender do tamanho do segmento do DNA amplificado. Uma vez estabelecido o “fingerprint” do genoma em questão, várias informações podem ser obtidas, o que pode ser comprovado pela ampla utilização da técnica para estudos em microrganismos, plantas e animais. (Sharon et al., 1992; Oakley et al., 1998; Singh e Roy, 2001; Urasaki et al., 2002; Vitória et al., 2004).

A técnica RAPD tem sido usada com sucesso na identificação, na caracterização, na estimativa da divergência genética e na construção de mapas de ligação gênica em diversas culturas, como mamão, maracujá, pimenta e pimentão, quiabo, feijão, batata, morango, melão, abóbora, dentre outras.

Em *Musa*, a técnica RAPD tem sido empregada visando a caracterização no germoplasma, discriminação de cultivar bem como na definição da composição genômica dos clones. Bhat & Jarret (1995), caracterizaram 57 genótipos de *Musa* de constituição genômica AA, AAA, AB, AAB, ABB e BB empregando marcadores RAPD. Apenas 10 iniciadores de RAPD foram suficientes para discriminar todos os genótipos, permitindo ainda diferenciar cultivares que se apresentaram idênticas pelos descritores morfológicos. Damasco et al. (1996) identificaram um marcador RAPD capaz de discriminar variantes somaclonais de ‘Cavendish’ apresentando a característica de nanismo. Kaemmer et al. (1992) empregaram *fingerprinting* de oligonucleotídeos e RAPD na caracterização de 15 genótipos de *Musa*, compreendendo espécies silvestres e cultivares de constituição AA, AAA, AAAA, AAB, ABB e BB, o que possibilitou aos autores identificar bandas associadas aos genomas A e B. Pillay

et al. (2000), determinaram a composição genômica de 29 genótipos de *Musa*, empregando três marcadores RAPD específicos de genoma A e B por eles identificados. Estes mesmos marcadores permitiram aos autores reclassificar genótipos caracterizados erroneamente pelos descritores morfológicos.

Esta ferramenta molecular tornou-se uma importante complementação para os métodos taxonômicos já existentes. Os dados obtidos por Gehrig et al. (1997) para filogenia e ecofisiologia de 30 espécies de *Kalanchoe*, um gênero sabidamente CAM, reafirmaram esta tendência. Os autores comprovaram, com respaldo molecular, três subdivisões no gênero quanto ao seu comportamento fotossintético e caracteres morfológicos já estabelecidos taxonomicamente. Os resultados também corroboram a suposição de que as plantas CAM evoluíram das plantas  $C_3$  e sugerem que o centro de origem de *Kalanchoe* esteja localizado nas regiões úmidas da África.

Apesar de ser uma técnica rápida e simples, a possibilidade de co-migração de fragmentos de DNA com tamanhos muito próximos, mas com diferentes seqüências de nucleotídeos pode levar a uma interpretação errônea dos resultados. Esta possibilidade tem sido discutida para espécies como girassol (Rieseberg, 1996) e uva (Xu et al., 1995) e foi apresentada pela primeira vez para microrganismos em estudos desenvolvidos com *Aeromonas hydrophila* (Oakley et al., 1998), alertando para os cuidados que devem ser tomadas na interpretação dos RAPD "fingerprints".

Na detecção de variabilidade genética entre 22 genótipos de mamoeiros estudados, Cattaneo (2001) mostrou que os marcadores RAPD foram menos eficazes que marcadores AFLP, discriminando os 22 genótipos em apenas dois grupos.

A utilização de outros tipos de marcadores de DNA (SCAR, AFLP, RFLP) vem sendo utilizada com o objetivo de se superar as limitações dos marcadores RAPD. Porém, apesar de uma série de controvérsias em relação à confiabilidade dos resultados obtidos com RAPD, a rapidez e facilidade de execução aliadas à análise criteriosa dos resultados ainda faz destes marcadores uma boa opção.

No trabalho de Loh et al. (2000) a técnica de AFLP se mostrou útil em caracterizar cultivares e estudar as relações entre as cultivares de banana. Há uma necessidade de desenvolver uma biblioteca de DNA para cultivares de

*Musa*. Características morfológicas e nomes locais para cultivares específicos também precisam ser revisados para refletir a uniformidade genética das cultivares. Deve-se estimar novamente a classificação atual dos poliplóides A e B em *M. acuminata* usando perfis de DNA que também devem ser estabelecidos.

## 2.4. Diversidade Genética

A existência de variação é comum a todas as espécies biológicas e ocorre praticamente para todas as características de uma espécie. Desse modo tem sido observado variação para coloração de flor, produtividade de grãos, altura de planta, teor de carboidrato e para muitas outras características. Esses exemplos mostram que é possível realizar seleção e, conseqüentemente, atingir o melhoramento genético de qualquer espécie e, praticamente, qualquer caráter de interesse (Ramalho et al., 2000).

O conhecimento da divergência genética entre os genótipos utilizados em programas de melhoramento permite a organização da variabilidade desses materiais auxiliando a seleção de genitores e potencializando os ganhos genéticos obtidos (Padilha, 2002).

De forma bem simples, pode-se definir a divergência genética como a distância genética entre populações, indivíduos ou organismos, com base numa série de características que podem ser morfoagronômicas, fisiológicas, bioquímicas, polimorfismo de DNA ou outras características que o pesquisador desejar trabalhar (Amaral e Thiébaud, 1999).

Segundo uma conceituação mais clássica, a divergência genética expressa a diferença entre as freqüências alélicas das populações. Portanto, é a diferença entre as contrapartes alélicas que dará origem à divergência genética (Borém, 2001).

### 2.4.1. Aplicação dos marcadores no estudo da diversidade genética

O estudo da diversidade genética, ou das diferenças nas freqüências alélicas das populações, tem importância fundamental na escolha de variedades a serem utilizadas como progenitores, uma vez que a distância genética entre

os genitores é indicativo de expressão heterótica nas progênes (Falconer, 1987).

No estudo da diversidade genética, de acordo com Moreira (1999) citado por Gomes (2004), podem ser usadas características morfo-agronômicas das espécies, assim como características fitoquímicas ou micromoleculares. Entretanto, as variações ambientais podem influir decisivamente na estimativa de tais características.

Os marcadores moleculares evitam muitos dos problemas decorrentes da influência ambiental, pois permitem analisar a variação diretamente no genoma (DNA). Os marcadores moleculares representam uma ferramenta poderosa e rápida para o estudo da diversidade genética, tanto para uso em trabalhos de melhoramento genético, quanto na conservação *in situ* e *ex situ* de germoplasma (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Outro aspecto da diversidade genética, que é abordado por Cruz e Regazzi (1997) e Amaral júnior e Thiébaud (1999), refere-se à possibilidade de recuperação de genótipos superiores nas populações segregantes, quando são identificadas combinações híbridas de maior efeito heterótico.

Um estudo de diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo do programa de melhoramento da UENF determinada por marcadores RAPD mostrou que esses genótipos seguiram um padrão de divergência consistente com o observado nos trabalhos de campo, mostrando a baixa variabilidade existente entre os indivíduos estudados, indicando que, para um programa de melhoramento com bons índices e ganhos satisfatórios, variabilidade adicional deve ser introduzida nas populações de estudo (Viana *et al.*, 2003).

#### 2.4.2. Medidas de similaridade

As medidas de similaridade, ou coeficientes de similaridade, são utilizadas em análises por meio de marcadores de DNA, como o RAPD ou AFLP, que geram variáveis binárias, do tipo ausência (0) e presença (1). São utilizadas, também, as medidas de dissimilaridade, que são obtidas pelo complemento aritmético das medidas ou coeficientes de similaridade (Moreira *et al.*, 1994).

De acordo com Cattaneo (2001), em função de existirem vários coeficientes de similaridade propostos, a escolha desse ou daquele vai depender dos objetivos da pesquisa, do tipo de unidade amostral em estudo e das propriedades inerentes de cada coeficiente.

Dentre os coeficientes, o Índice de Jaccard tem sido bastante utilizado, sendo indicado para comparar populações dentro de uma espécie. O Índice de Jaccard está entre aqueles que não utilizam “d”, que se refere às concordâncias do tipo 0-0, ou seja, ausência de banda nas duas amostras, pois necessariamente as concordâncias 0-0 não indicam similaridade, já que as alterações no genoma, que condicionam a ausência de banda em um genótipo, podem não ser as mesmas que ocasionam a ausência de banda em outro (Amaral e Thiebaut, 1999).

#### 2.4.3. Análise de agrupamento

A análise de agrupamento consiste no uso de técnicas que permitem reunir, por algum critério de classificação, unidades amostrais em grupos, de maneira que as unidades sejam similares dentro do grupo e com heterogeneidade entre os grupos. Os métodos utilizados para se efetuar o agrupamento pressupõem a estimação de uma medida de similaridade ou dissimilaridade para a formação dos grupos (Cruz e Regazzi, 1997).

Os métodos de agrupamento podem ser classificados em hierárquicos ou de otimização. Nos métodos hierárquicos, se obtém um dendrograma, que expressa graficamente a relação entre as observações, enquanto nos métodos de otimização, como o de Tocher, os grupos formados são mutuamente exclusivos, não permitindo a visualização das relações entre grupos, não havendo subjetividade na formação dos grupos (Amaral Júnior, 1994).

##### 2.4.3.1. Método hierárquico UPGMA

Nos métodos hierárquicos, o objetivo final é a obtenção de um dendrograma, onde os agrupamentos são obtidos tomando como base as diferenças abruptas de mudança de nível do mesmo (Amaral Júnior, 1994; Cruz e Regazzi, 1997). Os métodos hierárquicos utilizam um processo de

agrupamento que se repete em vários níveis até que se estabeleça um dendrograma.

O método UPGMA (unweighted pair-group method using an arithmetic average) utiliza a média das distâncias entre todos os pares de genótipos, na formação de cada grupo. A distância intergrupos é obtida pela média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos (Dias, 1998)

No melhoramento genético e em estudos biológicos, o método UPGMA é um dos mais utilizados. O UPGMA é indicado quando os possíveis grupos naturais são de diferentes dimensões e é recomendado quando nos genótipos a serem agrupados, há expectativa de formação de grupos próximos daqueles considerados naturais. O método UPGMA proporciona um agrupamento dos genótipos com muitas propriedades desejáveis, como a alta estabilidade (Cattaneo, 2001).

#### 2.4.3.2. Métodos de Otimização de Tocher

De acordo com Cruz e Regazzi (1997), o agrupamento de genótipos utilizando o método de otimização de Tocher está entre as técnicas mais comumente empregadas no melhoramento vegetal.

O método de Tocher realiza a partição do conjunto de genótipos em subgrupos não-vazios e mutuamente exclusivos, ou seja, independentes, por meio de uma medida de dissimilaridade pré-estabelecida (Amaral Júnior e Thiebaut, 1999).

O critério adotado pelo método de otimização de Tocher é de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos. A obtenção da matriz de dissimilaridade, sobre a qual o par de progenitores mais similar é identificado, é requerida pelo método, e irá constituir o primeiro grupo. A partir daí, avalia-se a possibilidade de inclusão de outros genótipos neste grupo, respeitando o critério da distância média dentro do grupo ser inferior a quaisquer distâncias entre grupos (Cruz e Regazzi, 1997).

Segundo Cattaneo (2001) o valor da distância dentro de um grupo é sempre aumentado com a entrada de um novo genótipo. A decisão de incluir o genótipo em um grupo, geralmente, é feita arbitrariamente. Normalmente, tem-

se comparado o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e um nível máximo permitido, ou seja, o valor máximo da medida de dissimilaridade encontrado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada genótipo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material Genético

Foram avaliados 21 genótipos de bananeira. Esses 21 genótipos foram introduzidos em pesquisas anteriores na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em um experimento que foi instalado na área experimental da Universidade, localizada na Escola Agrícola Estadual Antônio Sarlo. Foram avaliados os seguintes genótipos: FHIA 18, Prata Anã, UENF 1526, Pacovan, Caipira, Maçã, UENF 1527, Nanicão, Thap Maeo, UENF 1528, UENF 1529, Grande Naine, Ambrósia, Bucaneiro, Calipso, PV42-68, PV42-85, PV42-142, ST12-31, Calcutta e BB da França (Quadro 1).

**Quadro 1.** Descrição dos genótipos que foram avaliados para o estudo de “DNA Fingerprint” e na diversidade genética e suas respectivas procedências. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2006.

<b>Genótipo</b>	<b>Grupo genômico</b>	<b>Subgrupo</b>	<b>Procedência</b>	<b>Principais características</b>
<b>FHIA 18</b>	AAAB	Prata	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte médio, perfilhamento bom, produz mais de 10 pencas, cerca de 40 Kg. Resistente à Sigatoka-negra e suscetível ao moco e ao mal-do-Panamá.
<b>Prata Anã</b>	AAB	Prata	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte baixo, frutos semelhantes ao da ‘Prata’ na forma, tamanho, sabor porém maior produtividade que a ‘Prata’. A cultivar é suscetível às sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá, todavia apresenta boa tolerância à broca-do-rizoma e aos nematóides.
<b>UENF 1526</b>	AAAB	Prata	Embrapa Amazônia Ocidental	Superior à ‘Prata Anã’, maior peso das pencas, número e comprimento dos frutos. Resistente à sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá.
<b>Pacovan</b>	AAB	Prata	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Planta vigorosa, porte alto, bom perfilhamento. Supera a produtividade da ‘Prata’. Resistente a nematóides e suscetível às sigatokas amarela e negra e ao moco.
<b>Caipira</b>	AAA	-	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte médio a alto, ótimo perfilhamento, frutos pesando em torno de 123g, com 100 frutos por cacho. Resistente à sigatoka-amarela, à sigatoka-negra e ao Mal-do-Panamá.
<b>Maçã</b>	AAB	-	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte alto, fruto delicado, curtamente pedunculado, roliço, de cascas finas, delicadas e amarelas. Cachos pequenos. Sabor semelhante ao da maçã. É altamente suscetível ao Mal-do-Panamá.
<b>UENF 1527</b>	AAA	-	Embrapa Amazônia Ocidental	-
<b>Nanicão</b>	AAA	Cavendish	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Mutação da ‘Nanica’. Porte de médio a alto, cachos de médio a grande, fruto médio de excelente sabor. É altamente resistente ao mal-do-panamá e suscetível às sigatokas amarela, negra e à broca.

Quadro 1. Cont.

<b>Thap Maeo</b>	AAB	Mysore	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Variante da Mysore, porém possui maior vigor e cachos maiores. Porte alto, perfilhamento bom. Resistente às sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá. Suscetível ao moco.
<b>UENF 1528</b>	AAB	-	Embrapa Amazônia Ocidental	-
<b>UENF 1529</b>	AAB	Prata	Embrapa Amazônia Ocidental	Alta capacidade produtiva, frutos de pedúnculo rígido. Porte alto, perfilhamento bom. Altamente resistente às sigatokas amarela e negra e suscetível ao moco, mal-do-Panamá, broca-do-rizoma e ao nematóide cavernícola.
<b>Grande Naine</b>	AAA	Cavendish	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte médio a baixo. Resistente ao mal-do-Panamá e suscetível às sigatokas amarela e negra.
<b>Ambrósia</b>	AAAA	Gros Michel	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte médio. Resistente ao mal-do-Panamá e à sigatoka-negra.
<b>Bucaneiro</b>	AAAA	Gros Michel	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte médio. Resistente ao mal-do-Panamá e à sigatoka-negra.
<b>Calipso</b>	AAAA	Gros Michel	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte médio. Resistente ao mal-do-Panamá e à sigatoka-negra.
<b>PV42-68</b>	AAAB	Prata	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Também chamada de Pacovan Ken, possui porte alto. Resistente às sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá.
<b>PV42-85</b>	AAAB	Prata	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Também chamada de Preciosa. Porte alto, frutos grandes. Resistente às sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá.
<b>PV42-142</b>	AAAB	Prata	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Possui porte alto. Resistente às sigatokas amarela e negra.
<b>ST12-31</b>	AAAB	Prata	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Porte alto. Resistente à sigatoka-amarela.
<b>Calcutta</b>	AA	-	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Espécie silvestre, diplóide.
<b>BB da França</b>	BB	-	Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical	Espécie silvestre, diplóide.

### 3.2. Caracterização molecular via RAPD

A análise de “DNA fingerprint” entre os acessos foi feita com base na caracterização molecular, utilizando-se a técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMGV/CCTA/UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ.

#### 3.2.1. Isolamento do DNA Genômico

DNA genômico foi isolado de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990) com algumas modificações. Foram utilizadas amostras de folhas jovens de cada acesso. As lâminas foliares sem a nervura central foram coletadas e mantidas em gelo no campo e armazenadas a  $-70^{\circ}$  C em ultrafreezer. As amostras foram maceradas em almofariz de porcelana, contendo nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Aproximadamente 300 mg de material macerado foi transferido e congelado para microtubos Eppendorf de 2,0 ml. Posteriormente, foi adicionado 1000  $\mu$ l de tampão de extração (Quadro 2). Foi dado o vórtex e incubou-se os tubos em banho-maria a  $65^{\circ}$ C por 40 minutos.

**Quadro 2.** Tampão de extração utilizado para ressuspender o tecido vegetal visando a solubilização de membranas lipoprotéicas e desnaturação de proteínas enquanto o DNA é protegido da ação de enzimas de degradação.

<b>Estoque</b>	<b>Concentração inicial</b>	<b>Concentração final</b>	<b>Para 24 ml</b>
<b>CTAB</b>	5%	1%	4,8 ml
<b>NaCl</b>	2,5M	1,4M	13,44 ml
<b>EDTA</b>	0,25M	20mM	1,92 ml
<b>Tris-HCl (pH8)</b>	1,0M	100mM	2,4 ml
<b>PVP* sólido</b>		1%	0,24 g
<b>B-Mercaptoetanol</b>		0,1%	24 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>			Completar volume

\* PVP - polivinilpirrolidona

Os tubos foram retirados do banho-maria e centrifugados aproximadamente por cinco minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf e foram transferido 900 µl do sobrenadante para novos tubos de 2,0ml. Foi adicionado ao sobrenadante 900 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e novamente foram centrifugados. A fase superior (800 µl) foi transferida com micropipeta de 1000 µl para novo tubo de 2,0ml que recebeu 800 µl de clorofórmio-álcool isoamílico e centrifugados novamente. A fase superior foi transferida para um novo tubo (1,5ml) e foram adicionados 2/3 do volume de isopropanol gelado. Os tubos foram incubados a 4°C durante a noite.

As amostras foram centrifugadas ainda geladas por dez minutos a 14.000 rpm no dia seguinte. Um precipitado branco se formou no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado duas vezes com 100 µL de etanol 70% e uma vez com 100 µL de etanol 95 %. As amostras de DNA foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos para secagem e então ressuspensas em 200 µL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase na concentração final de 4,0 µL/ml. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, adicionou-se 40 µL de NaCl

(2,5M) na proporção de 1:10 (NaCl : DNA ressuspensão) e 2/3 de isopropanol gelado aos tubos (160 µL), que foram mantidos em geladeira a 4°C durante a noite. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, lavadas com etanol como já mencionado anteriormente, desidratadas e ressuspensas em volume final de 100 µL de água mili Q.

A determinação da concentração de DNA foi baseada na quantificação obtida por meio da análise comparativa em gel de agarose, na presença de brometo de etídio. Como padrão de referência para quantificação, foi utilizado o plasmídeo pGEM<sub>112</sub> adicionado ao gel nas concentrações 25ng, 50ng, 80ng e 100ng. As amostras foram padronizadas em 25 ng/µl para serem utilizadas nas análises de RAPD.

### 3.2.2. Seleção de iniciadores

Uma triagem de iniciadores foi feita de forma prévia, tendo como critérios de escolha, em ordem decrescente de prioridade, um grande número de bandas totais e um grande número de bandas polimórficas. Foram escolhidos, aleatoriamente, um genótipo diplóide, dois genótipos triplóides e um tetraplóide. Foram testados 96 iniciadores, escolhidos aleatoriamente, e selecionados os 40 melhores.

Em um estudo de caracterização genética de cultivares de banana realizado no Quênia utilizando para tal marcadores RAPD, foram selecionados 19 iniciadores que produziram polimorfismo (Onguso, 2004). Desses 19 iniciadores somente dois foram utilizados no presente trabalho, pois não se obteve bons resultados com os demais iniciadores.

### 3.2.3. PCR

As reações de amplificação foram realizadas conforme Williams *et al.* (1990), com modificações (volume final de 20 µL) e contendo os reagentes nas seguintes concentrações: 12,68 µL de água; 2,0 µL de tampão 10X; 1,6 µL de MgCl<sub>2</sub>; 1,0 µL de dNTP's; 1,6 µL de iniciador e 0,12 unidade de Taq DNA polimerase produzida na UENF (Quadro 3). Foram utilizados microtubos para PCR nos quais foram colocados 1 µL de DNA e, paralelamente, preparado um

*mix* contendo um iniciador diferente. Desta solução, foram retirados 19  $\mu\text{L}$  e adicionados aos microtubos, totalizando os 20  $\mu\text{L}$  da reação.

**Quadro 3.** Componentes básicos da reação para a preparação do coquetel para realização do PCR

REAGENTES	CONC. FINAL	UMA REAÇÃO	25 REAÇÕES
Água (q. s. p.)	20 $\mu\text{L}$	12,68 $\mu\text{L}$	317,00 $\mu\text{L}$
Tampão 10X	1X	2,0 $\mu\text{L}$	50,00 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,0 mM	1,6 $\mu\text{L}$	40,00 $\mu\text{L}$
dNTP's (2mM cada)	100 $\mu\text{M}$	1,0 $\mu\text{L}$	25,00 $\mu\text{L}$
Primer	0,4 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{L}$	40,00 $\mu\text{L}$
Taq	0,12 U	0,12 $\mu\text{L}$	3,00 $\mu\text{L}$
DNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ )	10 ng	1,0 $\mu\text{L}$	

Foi utilizado o termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700) programado para 95 °C por 1 minuto, seguido de 45 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 36 °C e 2 minutos a 72 °C, e uma etapa final para extensão de 7 minutos a 72 °C, utilizando o modo de transição de temperatura mais rápida, 1°C/s.

Os produtos amplificados (bandas) foram obtidos por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% e visualizados após coloração por brometo de etídio (fotodocumentação via *Eagle Eye*). Os perfis de RAPD de cada genótipo foram obtidos somente pela presença (1) e ausência (0) de bandas de alta densidade.

### 3.3. Estudo do “DNA fingerprint”

Para a obtenção do “DNA fingerprint” foram obtidos inicialmente marcadores RAPD. A escolha por estes marcadores deve-se ao fato de não ser necessário nenhum conhecimento prévio da seqüência alvo do DNA em estudo, já que se trata de um marcador de seqüência arbitrária.

### 3.4. Análise de Divergência Genética via Marcadores RAPD

Na interpretação das análises moleculares, foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard, representado por:

$$C_{ij} = 1 - \frac{a}{a+b+c} ,$$

em que:

a = número de casos em que a característica está presente nos dois genótipos, simultaneamente;

b = número de casos em que a característica está presente somente no genótipo i;

c = número de casos em que a característica está presente somente no genótipo j.

Posteriormente foi adotado o método hierárquico UPGMA para o agrupamento. No procedimento analítico, partindo-se da matriz de distâncias genéticas, procedeu-se a sucessivas identificações dos genótipos mais próximos, a partir do par mais semelhante, até que se estabeleceu um diagrama de árvore.

Para a aglomeração dos acessos também foi utilizado o método de Tocher, da seguinte forma: a partir da matriz de distâncias genéticas identificou-se o par mais próximo que constitui o primeiro grupo; concomitantemente, obteve-se  $\theta$ , que é o maior valor do conjunto de menores distâncias entre os acessos. A partir de então, foi avaliado a possibilidade de inclusão de outros

acessos neste grupo, respeitando o critério da distância média intragrupo ser inferior a quaisquer distâncias intergrupos. Para tanto, procedeu-se a comparação entre o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e o máximo permitido, comumente denominado  $\theta$ . A inclusão de um acesso em um grupo foi possível quando:

$$\frac{D^2_{(ij)k}}{n} < \theta,$$

em que:

$D^2_{(ij)k}$  = distância entre o grupo **ij** e o acesso **k**, obtida pela expressão:

$D^2_{(ij)k} = D^2_{ik} + D^2_{jk}$ , sendo:

$D^2_{ik}$  = distância entre os acessos **i** e **k**;

$D^2_{jk}$  = distância entre os acessos **j** e **k**; e

n = número de acessos que constitui o grupo original.

Os dados obtidos foram analisados pelo Programa Genes (Cruz, 2001).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. “DNA Fingerprint”

Para serem obtidas marcas moleculares tipo RAPD, foram utilizados 31 iniciadores, gerando um total de 94 marcas totais, sendo 19 marcas monomórficas e 75 marcas polimórficas. Estas 75 marcas polimórficas foram capazes de distinguir e identificar os 21 genótipos em estudo (Tabela 1).

Deu-se ênfase à discriminação dos genótipos UENF 1526 (FHIA 18), UENF 1527 (Caipira), UENF 1528 (Thap Maeo) e UENF 1529 (Prata Zulu). Tais variedades foram introduzidas na coleção da UENF, mas em trabalhos de campo, onde se procedeu a caracterização agrônômica de onze variedades elites, onde já existiam as mesmas variedades descritas acima, observou-se o desempenho diferenciado de genótipos com o mesmo nome. O “DNA Fingerprint” nos auxiliou na correta identificação dos referidos genótipos e possíveis ocorrências de falha de identificação dos materiais vegetais introduzidos na coleção da UENF.

Tabela 1 – Lista dos iniciadores polimórficos e das marcas monomórficas, polimórficas e totais geradas por cada um deles. Caracterização quanto ao tamanho dos fragmentos das marcas polimórficas (pb).

<b>Primer</b>	<b>Marca monomórfica</b>	<b>Marca polimórfica</b>	<b>Marcas totais</b>	<b>Tamanho marca polimórfica (pb)</b>
OPA 05	0	3	3	2450/a-2500/b-1250
OPA 10	0	1	1	1250
OPA 17	1	1	2	1350
OPA 18	0	3	3	1000/a-2850/b-2800
OPA 19	0	4	4	2200/a-2450/b-1100
OPA 20	0	3	3	2100/a-1200/b-1000
OPB 05	0	3	3	1500/a-1500/b-1200
OPB 06	1	1	2	1200
OPB 07	0	3	4	1200/a-1050/b-1300
OPB 08	0	4	4	2500/a-2000/b-1100/c-2100
OPB 09	0	2	2	2000/a-900
OPB 11	1	2	3	1000/a-900
OPB 12	2	4	6	1550/a-1050/b-1000
OPB 13	1	2	3	1000/a-1350
OPB 14	1	1	2	2550
OPB17	1	1	2	1000
OPB 19	0	2	2	2500/a-2000
OPC 01	0	1	1	2000
OPC 02	0	2	2	1050/a-900
OPC 04	0	3	3	2200/a-1250/b-900
OPC 11	1	2	3	1200/a-1050
OPC 12	2	3	5	1250/a-1050/b-900
OPD 02	1	2	3	1450/a-1200
OPD 03	0	3	3	1200/a-1000/b-900
OPD 04	4	3	7	2100/a-2100/b-2100
OPD 05	1	3	4	2500/a-2000/b-1100
OPAA 03	0	3	3	2000/a-2500/b-2200
OPAA 11	0	3	3	2200/a-2100/b-2000
OPAA 16	2	1	3	1000
OPAA 17	0	3	3	1200/a-3500/b-1000
OPAB 18	0	3	3	1100/a-1000/b-900
<b>TOTAL</b>	<b>19</b>	<b>75</b>	<b>94</b>	

bp: pares de base

a, b, c, d – utilizado para diferenciar marcas geradas pelo mesmo iniciador.

Das 75 marcas polimórficas, 46 apresentaram a mesma função, sendo capazes de diferenciar os genótipos Calcutta (AA) e BB da França (BB). Vinte e quatro destas marcas são exclusivas do genótipo Calcutta e 22 do genótipo BB da França (Tabela 2).

A inclusão das cultivares Calcutta e BB da França nesse estudo deve-se ao fato de serem diplóides, e com base nisso, pôde-se proceder ao correto posicionamento e identificação dos demais genótipos, além de correlacioná-los com seus respectivos grupos genômicos, com maior ou menor contribuição dos complementos genômicos 'A' e 'B', uma vez que todos os genótipos comerciais de banana possuem ascendência de tais genomas, cada um com diferentes contribuições em suas respectivas constituições.

O acesso UENF 1527 obteve o mesmo padrão de bandas que a cultivar Caipira (Figura 1). Isso pôde ser observado em quase todos os iniciadores utilizados, podendo então, se tratar da mesma cultivar. Quanto aos acessos UENF 1526 e UENF 1528, estes não apresentaram padrões de bandas semelhantes aos das marcas das cultivares FHIA 18 e Thap Maeo, respectivamente. O acesso UENF 1529 mostrou um padrão de bandas semelhante ao da Prata Anã em muitos iniciadores, indicando, dessa forma, ser a Prata Zulu, variedade originada da mesma cultivar e possivelmente pertencente ao mesmo subgrupo, mas, de acordo com os padrões de bandas apresentadas, mostrou-se uma variedade corretamente introduzida e pertencente a material genético distinto.

Tabela 2 – Conjunto de marcas RAPD capazes de diferenciar os genótipos Calcutta e BB da França.

<b>Calcutta</b>	<b>BB da França</b>
	OPAA03
OPAA03a	OPAA16
	OPAA17
OPAA17a	OPD04
	OPD04a
	OPAA11
OPAA11a	
OPB05	OPB05a
	OPB09
OPD03	
	OPD03a
OPB12	
OPB12a	
	OPB19
OPB19a	
	OPB14
OPA05	
OPB06	
OPB07	
	OPB07a
OPB07b	
OPB08	
	OPB08a
	OPB08b
OPB17	
OPC02	
OPC02a	
	OPA19
OPA19a	
	OPA19b
OPA20	
	OPA20a
	OPC04
	OPA10
	OPC12
OPC12a	
OPC12b	
OPAB18	
	OPAB18a
OPAB18b	
	OPC11
OPB13	
OPD02	

a, b, c – utilizado para diferenciar marcas geradas pelo mesmo iniciador.

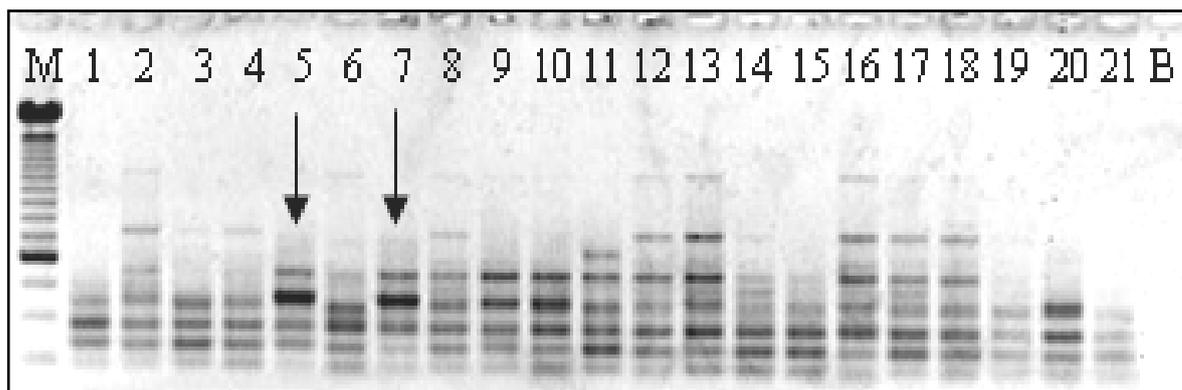


Figura 1 - Marcas OPB 12 (setas), exclusivas para os genótipos Caipira e UENF 1527. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I), 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco.

Outras marcas RAPD possibilitaram a diferenciação entre os 21 genótipos, baseando-se na presença ou ausência da marca para determinado genótipo, ou considerando um conjunto de marcas para determinado material vegetal.

O genótipo UENF 1529 pôde ser diferenciado dos demais pela presença das marcas OPD 05, OPD 03 e OPC 11 como indicado pela Figura 2, evidenciando que se trata do material com identificação correta, sendo o mesmo a variedade conhecida como Prata Zulu.

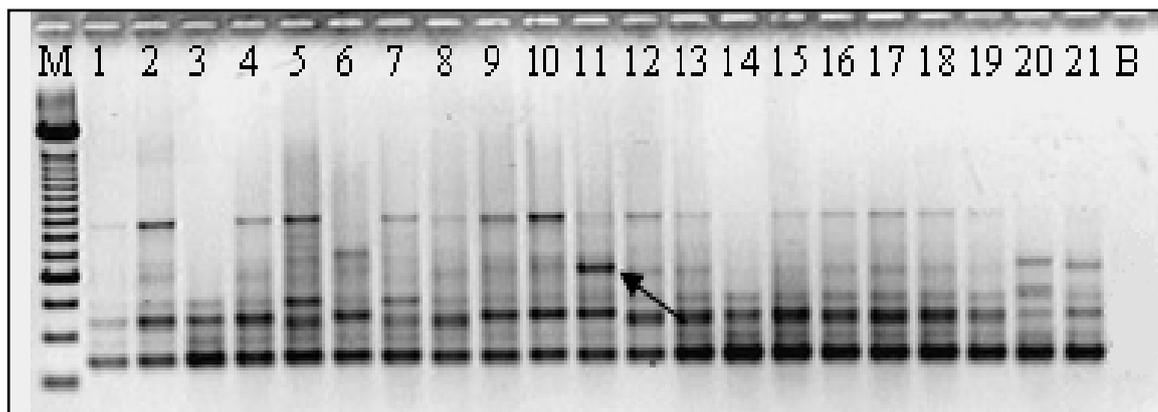


Figura 2 – Marca OPD 05 (seta), exclusiva para o genótipo UENF 1529. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I), 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco.

O genótipo Calcutta pôde ser diferenciado dos demais pela presença das marcas OPAA 03b, OPAA 17b, OPB 07 e OPB 08 e pela ausência da marca OPC 12 como indicado pela Figura 3 e pela Figura 4.

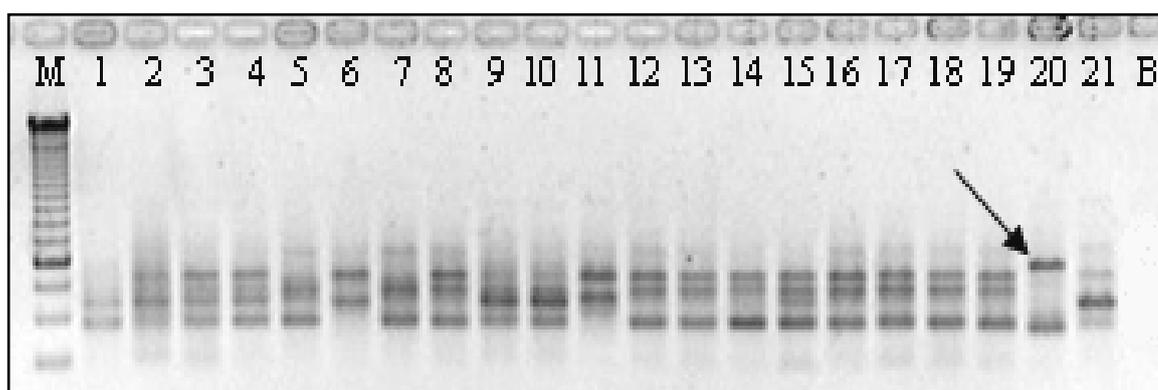


Figura 3 – Marca OPB 07 (seta), exclusiva para o genótipo Calcutta. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I), 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco.

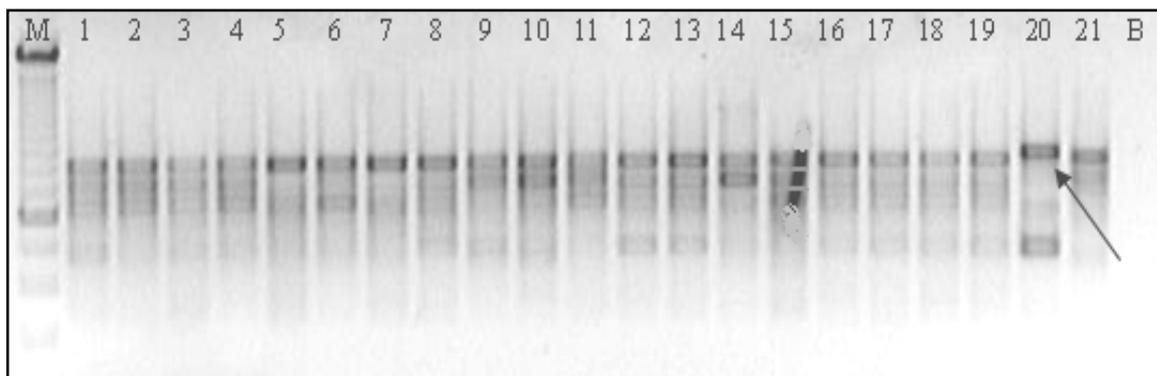


Figura 4 – Ausência da marca OPC 12 (seta), exclusiva para o genótipo Calcutta. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I), 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco.

Algumas marcas foram capazes de diferenciar os genótipos Calcutta e BB da França, como por exemplo, a marca OPA 20 que foi exclusiva do genótipo BB da França como evidenciado na Figura 5.

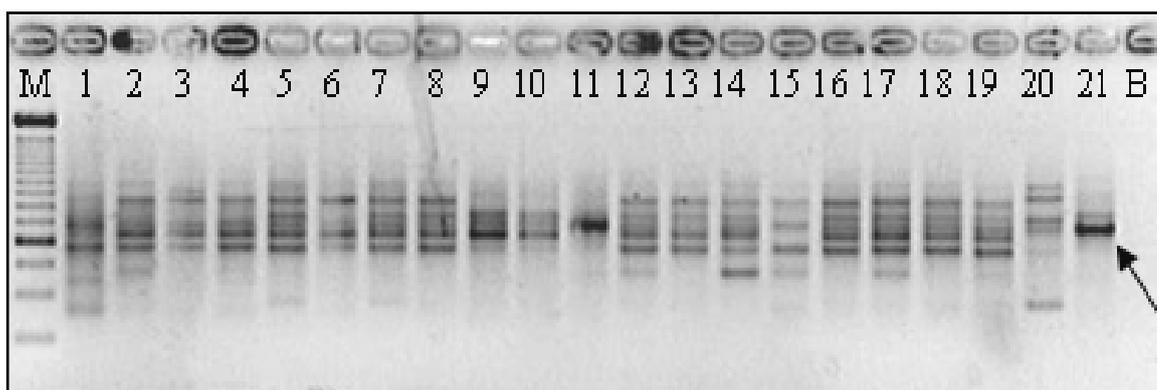


Figura 5 – Marca OPA 20 (seta), exclusiva para o genótipo BB da França quando comparado ao genótipo Calcutta. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I), 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco.

A ausência de marca também diferenciou alguns genótipos, como o caso das marcas OPB 07, OPC 12 e OPAA 11 (Figura 6).

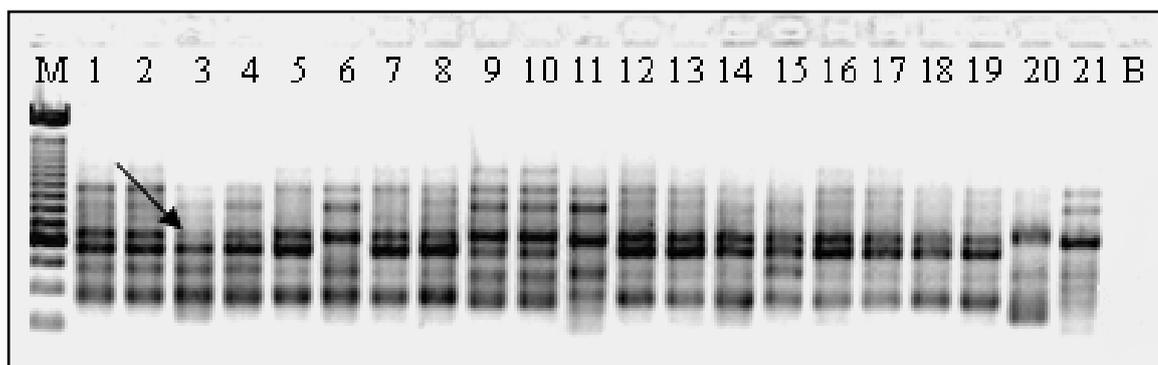


Figura 6 – Marca OPAA 11 (seta), ausente somente no genótipo UENF 1526. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I), 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco.

Algumas marcas foram exclusivas para os genótipos UENF 1529 e BB da França, as marcas OPB 14, OPB 08a, OPA 20a e OPC 04 (Figura 7) e também esteve ausente a marca OPB 17 (Figura 8), mostrando assim uma relação entre os dois genótipos.

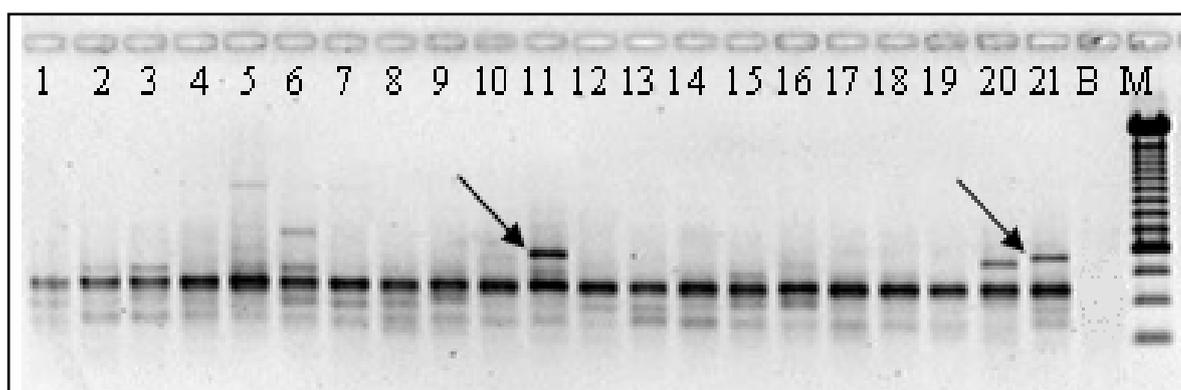


Figura 7 – Marcas OPB 14 (setas), presentes nos genótipos UENF 1529 e BB da França. 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco, M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I).

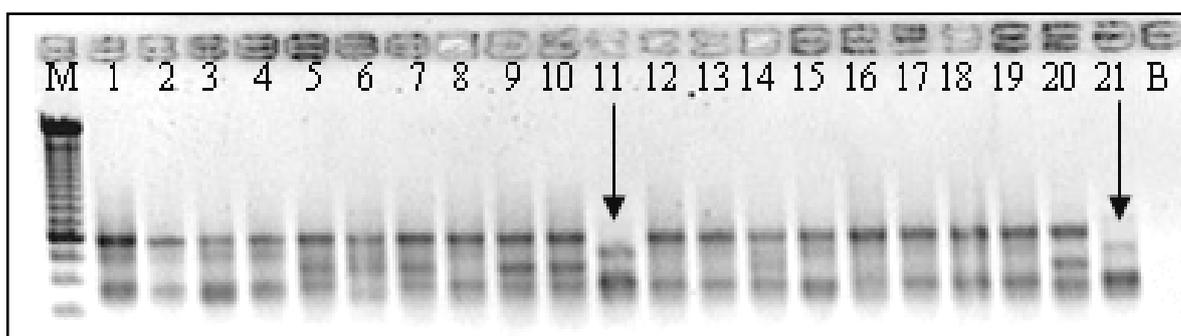


Figura 8 – Marcas OPB 17 (setas), ausentes nos genótipos UENF 1529 e BB da França. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I), 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco.

Porém, a maioria das caracterizações só foi possível quando consideradas o conjunto das marcas, possibilitando a identificação dos genótipos.

Os marcadores RAPD como ferramenta molecular são úteis na identificação e caracterização molecular como pôde ser visto em uma série de trabalhos com fruteiras como uva (Vidal *et al.*, 2000), morango (Congiu *et al.*, 2000) e pereira (Sawazaki *et al.*, 2002).

Segundo Loh *et al.* (2000) a técnica de AFLP baseado em PCR para “DNA Fingerprint” em bananeira foi capaz de revelar níveis significantes de polimorfismo.

Os marcadores RAPD também se mostraram como uma ferramenta eficiente para a caracterização molecular e conseqüentemente para a obtenção do “DNA Fingerprint” para todos os 21 genótipos de bananeira (*Musa* spp.) estudados como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – “DNA Fingerprints” de RAPD para genótipos de *Musa* spp. 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França.

GENÓTIPOS																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
				OPAA 03		OPAA 03		OPAA 03												
				OPAA 03 <sup>a</sup>		OPAA 03a														
OPAA 16	OPAA 16	OPAA 16	OPAA 16		OPAA 16			OPAA 16	OPAA 16	OPAA 16	OPAA 16	OPAA 16		OPAA 16						
				OPAA 17	OPAA 17	OPAA 17			OPAA 17		OPAA 17	OPAA 17	OPAA 17	OPAA 17	OPAA 17	OPAA 17		OPAA 17		OPAA 17
OPAA 17a	OPAA 17a	OPAA 17a	OPAA 17a	OPAA 17 <sup>a</sup>	OPAA 17a	OPAA 17a	OPAA 17a				OPAA 17a	OPAA 17a	OPAA 17a	OPAA 17a	OPAA 17a	OPAA 17a		OPAA 17a		OPAA 17a
				OPD 04	OPD 04	OPD 04	OPD 04	OPD 04	OPD 04	OPD 04	OPD 04	OPD 04		OPD 04		OPD 04		OPD 04		OPD 04
					OPD 04a	OPD 04a			OPD 04a					OPD 04a		OPD 04a		OPD 04a		OPD 04a
		OPD 04b			OPD 04b	OPD 04b	OPD 04b							OPD 04b		OPD 04b		OPD 04b		OPD 04b
OPAA 11	OPAA 11			OPAA 11	OPAA 11			OPAA 11	OPAA 11	OPAA 11	OPAA 11	OPAA 11	OPAA 11		OPAA 11					OPAA 11
OPAA 11a	OPAA 11a		OPAA 11a	OPAA 11 <sup>a</sup>		OPAA 11a	OPAA 11a				OPAA 11a	OPAA 11a			OPAA 11a					OPAA 11a
OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b		OPAA 11b				OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b	OPAA 11b
	OPB 05		OPB 05	OPB 05	OPB 05	OPB 05	OPB 05	OPB 05	OPB 05	OPB 05					OPB 05	OPB 05	OPB 05	OPB 05	OPB 05	OPB 05
	OPB 05a		OPB 05a		OPB 05a	OPB 05a														OPB 05a
	OPB 05b		OPB 05b				OPB 05b				OPB 05b				OPB 05b				OPB 05b	OPB 05b
OPB 09	OPB 09	OPB 09	OPB 09	OPB 09		OPB 09	OPB 09				OPB 09	OPB 09			OPB 09	OPB 09	OPB 09	OPB 09		OPB 09

Tabela 3. Cont.

GENÓTIPOS																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	OPB 09a	OPB 09a	OPB 09a					OPB 09a	OPB 09a	OPB 09a										OPB 09a
	OPD 05			OPD 05					OPD 05											
	OPD 05b	OPD 05b	OPD 05b	OPD 05b	OPD 05b			OPD 05b	OPD 05b	OPD 05b	OPD 05b	OPD 05b		OPD 05b	OPD 05b	OPD 05b	OPD 05b			
OPD 03a	OPD 03a	OPD 03a	OPD 03a				OPD 03a			OPD 05a										
OPD 03b	OPD 03b	OPD 03b	OPD 03b	OPD 03b		OPD 03b		OPD 03b	OPD 03b	OPD 03b	OPD 03b	OPD 03a	OPD 03a	OPD 03b						
	OPB 12																			
				OPB 12 <sup>a</sup>		OPB 12a		OPB 12a	OPB 12a	OPB 12a	OPB 12a					OPB 12a	OPB 12a	OPB 12a		
				OPB 12b	OPB 12b	OPB 12b		OPB 12b	OPB 12b	OPB 12b										OPB 12b
					OPB 12c				OPB 12c			OPB 12c	OPB 12c	OPB 12c	OPB 12c	OPB 12c	OPB 12c			OPB 12c
		OPB 19					OPB 19	OPB 19	OPB 19		OPB 19	OPB 19	OPB 19						OPB 19	OPB 19
		OPB 19a			OPB 19a	OPB 19a													OPB 19a	OPB 19a
	OPA 05					OPA 05	OPA 05a			OPA 14										OPA 14
								OPA 05b	OPA 05b			OPA 05a	OPA 05a		OPA 05a	OPA 05a	OPA 05a			OPA 05b
				OPB 06	OPB 06	OPB 06				OPB 06										OPB 06
OPA 17	OPA 17	OPA 17	OPA 17				OPA 17			OPA 17	OPA 17	OPA 17				OPA 17	OPA 17	OPA 17	OPA 17	
					OPA 18	OPA 18	OPA 18									OPA 18				

Tabela 3. Cont.

GENÓTIPOS																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
					OPA 18a	OPA 18a	OPA 18a				OPA 18a	OPA 18a	OPA 18a		OPA 18a	OPA 18a	OPA 18a	OPA 18a		
OPA 18b	OPA 18b	OPA 18b	OPA 18b					OPA 18b	OPA 18b	OPA 18b				OPA 18b						OPA 18b
					OPB 07a			OPB 07a	OPB 07a	OPB 07a									OPB 07	OPB 07a
OPB 07b	OPB 07b	OPB 07b	OPB 07b	OPB 07b		OPB 07b	OPB 07b	OPB 07b	OPB 07b		OPB 07b									
										OPB 08a										OPB 08a
	OPB 08b	OPB 08b	OPB 08b		OPB 08b			OPB 08b	OPB 08b	OPB 08b										OPB 08b
	OPB 08c																			
OPB 17		OPB 17																		
				OPC 01		OPC 01	OPC 01			OPC 01	OPC 01	OPC 01		OPC 01	OPC 01	OPC 01	OPC 01	OPC 01		OPC 01
OPC 02a	OPC 02a	OPC 02a	OPC 02a				OPC 02a	OPC 02a	OPC 02a		OPC 02a	OPC 02a		OPC 02a	OPC 02a			OPC 02a	OPC 02a	OPC 02a
				OPA 19		OPA 19				OPA 19										OPA 19
OPA 19a	OPA 19a	OPA 19a	OPA 19a		OPA 19a		OPA 19a				OPA 19a									
				OPA 19b		OPA 19b														OPA 19b
OPA 19c		OPA 19c	OPA 19c				OPA 19c	OPA 19c						OPA 19c						
		OPA 20	OPA 20	OPA 20	OPA 20	OPA 20	OPA 20				OPA 20	OPA 20	OPA 20						OPA 20	OPA 20a
										OPA 20a										OPA 20a
OPA 2b	OPA 2b		OPA 2b	OPA 2b		OPA 2b	OPA 2b				OPA 2b									

Tabela 3. Cont.

GENÓTIPOS																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
										OPC 04										OPC 04
OPC 04a	OPC 04a	OPC 04a	OPC 04a	OPC 04 <sup>a</sup>		OPC 04a	OPC 04a	OPC 04a	OPC 04a		OPC 04a		OPC 04a	OPC 04a	OPC 04a	OPC 04a	OPC 04a	OPC 04a		
OPC 04b	OPC 04b	OPC 04b	OPC 04b		OPC 04b									OPC 04b						
OPB 11	OPB 11	OPB 11	OPB 11		OPB 11			OPB 11	OPB 11	OPB 11				OPB 11					OPB 11	OPB 11
	OPB 11a	OPB 11a	OPB 11a	OPB 11 <sup>a</sup>		OPB 11a	OPB 11a				OPB 11a	OPB 11a	OPB 11a	OPB 11a	OPB 11a	OPB 11a	OPB 11a	OPB 11a		
OPA 10	OPA 10	OPA 10	OPA 10	OPA 10		OPA 10	OPA 10	OPA 10	OPA 10		OPA 10	OPA 10	OPA 10	OPA 10	OPA 10	OPA 10	OPA 10	OPA 10		OPA 10
OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12	OPC 12		OPC 12
																				OPC 12a
OPC 12b	OPC 12b			OPC 12b	OPC 12b	OPC 12b	OPC 12b	OPC 12b	OPC 12b		OPC 12b	OPC 12b			OPC 12b				OPC 12b	
				OPAB 18		OPAB 18									OPAB 18	OPAB 18			OPAB 18	
OPAB 18a	OPAB 18a	OPAB 18a	OPAB 18a		OPAB 18a			OPAB 18a	OPAB 18a	OPAB 18a					OPAB 18a	OPAB 18a				OPAB 18a
				OPAB 18b		OPAB 18a													OPAB 18a	
										OPC 11										
OPC 11a	OPC 11a	OPC 11a	OPC 11a					OPC 11a	OPC 11a					OPC 11a						OPC 11a
	OPB 13		OPB 13	OPB 13		OPB 13		OPB 13	OPB 13						OPB 13	OPB 13	OPB 13		OPB 13	
	OPB 13a				OPB 13a				OPB 13a						OPB 13a	OPB 13a				
OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02		OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02	OPD 02
OPD 02a	OPD 02a			OPD 02a		OPD 02a			OPD 02a	OPD 02a				OPD 02a					OPD 02a	OPD 02a

a- segunda banda obtida pelo iniciador, b- terceira banda obtida pelo iniciador, c- quarta banda obtida pelo iniciador

## 4.2. Diversidade Genética

### 4.2.1. Ensaio RAPD

Na Tabela 4 estão os iniciadores RAPD utilizados, as seqüências de nucleotídeos dos mesmos e os números de marcas monomórficas e polimórficas geradas por cada iniciador. Verifica-se que, nas condições em que as reações foram realizadas, os 31 iniciadores utilizados geraram 94 marcas ao todo, sendo 75 marcas polimórficas e 19 marcas monomórficas, ou seja, em média, cada iniciador gerou 2,42 marcas polimórficas e 0,61 marcas monomórficas. Verifica-se que o número de marcas totais variou entre 1 e 4 marcas por iniciador, e que 79,79% das marcas apresentaram polimorfismo.

Ferreira et al. (2004) no trabalho de caracterização molecular de banana encontrou um total de 150 marcas polimórficas que foram obtidas pela amplificação de 21 iniciadores, utilizando a técnica de RAPD.

[Howell](#), et al. (1994) usando a técnica de RAPD identificou 116 produtos de amplificação em germoplasma de *Musa* usando nove iniciadores. Nesse caso a técnica foi utilizada para identificar e classificar o germoplasma de *Musa*. Damasco et al. (1996) utilizou 66 iniciadores ao acaso na triagem, dos 66 iniciadores, 19 (28.8%) revelaram polimorfismo entre as plantas do gênero *Musa* usando a técnica de RAPD.

Pillay et al. (2000) utilizou 80 iniciadores na amplificação do DNA usando a técnica RAPD em *M. acuminata* subsp. *burmannicoides* clone 'Calcutta 4' (AA genomes) e *M. balbisiana* clone 'Honduras' (BB genomes). Três iniciadores (A17, A18, e D10) produziram um único fragmento específico do genoma e duas espécies foram identificadas.

No trabalho de Cattaneo (2001) utilizando RAPD em mamão observou-se um maior número de marcas por iniciador. Porém quanto às marcas que apresentaram polimorfismo, esse número foi bem menor. Isso indica a existência de alta diversidade em *Musa*.

Tabela 4 – iniciadores RAPD utilizados, seqüências de bases e número de marcas monomórficas e polimórficas geradas.

iniciadores	Seqüência nucleotídeos (5' – 3')	Marcas		
		Monomórficas	Polimórficas	Totais
OPA 05	AGGGGTCTTG	0	3	3
OPA 10	GTGATCGCAG	0	1	1
OPA 17	GACCGCTTGT	1	1	2
OPA 18	AGGTGACCGT	0	3	3
OPA 19	CAAACGTCCG	0	4	4
OPA 20	GTTGCGATCC	0	3	3
OPB 05	TGCGCCCTTC	0	3	3
OPB 06	TGCTCTGCCC	1	1	2
OPB 07	GGTGACGCAG	0	3	4
OPB 08	GTCCACACGG	0	4	4
OPB 09	TGGGGGACTC	0	2	2
OPB 11	GTAGACCCGT	1	2	3
OPB 12	CCTTGACGCA	2	4	6
OPB 13	TTCCCCCGCT	1	2	3
OPB 14	TCCGCTCTGG	1	1	2
OPB17	AGGGAACGAG	1	1	2
OPB 19	ACCCCCGAAG	0	2	2
OPC 01	TTCGAGCCAG	0	1	1
OPC 02	GTGAGGCGTC	0	2	2
OPC 04	CCGCATCTAC	0	3	3
OPC 11	AAAGCTGCGG	1	2	3
OPC 12	TGTCATCCCC	2	3	5
OPD 02	GGACCCAACC	1	2	3
OPD 03	GTCGCCGTCA	0	3	3
OPD 04	TCTGGTGAGG	4	3	7
OPD 05	TGAGCGGACA	1	3	4
OPAA 03	TTAGCGCCCC	0	3	3
OPAA 11	ACCCGACCTG	0	3	3
OPAA 16	GGAACCCACA	2	1	3
OPAA 17	GAGCCCGACT	0	3	3
OPAB 18	CTGGCGTGTC	0	3	3
TOTAL		19	75	94

#### 4.2.2. Matrizes de dissimilaridade

Para identificar a ocorrência de divergência genética entre os 21 genótipos, foram realizadas análises estatísticas multivariadas. Para tanto, foram utilizadas 75 marcas polimórficas de RAPD para a confecção de uma matriz de dados binários, a qual compôs uma matriz de distâncias com base no Complemento Aritmético do Índice de Jaccard (Tabela 5).

Os coeficientes de dissimilaridade, apresentados na Tabela 5, revelam valores variando desde 0,362, ou seja, o valor de menor dissimilaridade, que se refere à dissimilaridade genética entre os genótipos Pacovan e PV42-142 que fazem parte do subgrupo Prata e possuem o complemento genômico B em suas constituições, até o valor de 0,827, que se refere à dissimilaridade genética entre os genótipos Thap Maeo e PV42-85, o que não está de acordo com a expectativa inicial pois as cultivares possuem um padrão semelhante como por exemplo o porte alto, e resistência às sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá, além de ambas apresentarem o complemento genômico B. Porém, outros valores relativamente altos de dissimilaridade como o entre a Prata Anã e ST12-31 (0,786) e Nanicão e PV42-85 (0,702) demonstram que há coerência nos valores das dissimilaridades.

Quanto aos acessos UENF 1526, UENF 1527, UENF 1528 e UENF 1529 que se deseja identificar, houve valores baixos como entre os genótipos Caipira e UENF 1527 (0,589) e entre o genótipo UENF 1529 que pode ser a Prata Zulu e os genótipos Prata Anã (0,587) e PV-42-142 (0,563) que são do subgrupo Prata. Os genótipos UENF 1526 e UENF 1528 apresentaram valores de dissimilaridade relativamente altos quando comparados aos genótipos FHIA 18 e Thap Maeo respectivamente, mostrando, então, que não se tratam dos mesmos genótipos.

Os genótipos Calcutta e BB da França apresentaram alta dissimilaridade (0,727) como era esperado.

Tabela 5 – Coeficientes de dissimilaridade genética de 21 genótipos de bananeira, obtidos pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, baseados na análise com marcadores RAPD.

Gen.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	0,000																				
2	0,586	0,000																			
3	0,531	0,574	0,000																		
4	0,485	0,656	0,545	0,000																	
5	0,667	0,640	0,769	0,603	0,000																
6	0,813	0,717	0,654	0,678	0,708	0,000															
7	0,540	0,529	0,619	0,582	0,589	0,745	0,000														
8	0,525	0,768	0,627	0,587	0,673	0,660	0,689	0,000													
9	0,704	0,667	0,673	0,767	0,739	0,737	0,745	0,659	0,000												
10	0,655	0,622	0,615	0,694	0,725	0,698	0,635	0,617	0,692	0,000											
11	0,721	0,587	0,672	0,627	0,667	0,628	0,643	0,745	0,659	0,660	0,000										
12	0,754	0,617	0,712	0,645	0,553	0,651	0,529	0,768	0,773	0,735	0,568	0,000									
13	0,662	0,733	0,565	0,530	0,672	0,551	0,603	0,586	0,778	0,611	0,585	0,625	0,000								
14	0,556	0,746	0,542	0,576	0,705	0,698	0,692	0,545	0,667	0,660	0,767	0,806	0,597	0,000							
15	0,491	0,673	0,603	0,609	0,623	0,765	0,621	0,746	0,792	0,706	0,717	0,673	0,633	0,596	0,000						
16	0,613	0,772	0,694	0,652	0,673	0,714	0,710	0,630	0,585	0,700	0,583	0,722	0,633	0,589	0,655	0,000					
17	0,464	0,660	0,639	0,541	0,655	0,755	0,536	0,702	0,827	0,717	0,685	0,685	0,600	0,650	0,574	0,733	0,000				
18	0,507	0,632	0,581	0,362	0,574	0,619	0,493	0,620	0,779	0,676	0,563	0,547	0,548	0,529	0,600	0,580	0,469	0,000			
19	0,703	0,786	0,661	0,619	0,551	0,729	0,632	0,615	0,733	0,688	0,686	0,686	0,571	0,574	0,667	0,531	0,623	0,567	0,000		
20	0,750	0,711	0,620	0,649	0,644	0,543	0,717	0,681	0,821	0,714	0,761	0,705	0,627	0,717	0,681	0,735	0,694	0,735	0,723	0,000	
21	0,563	0,574	0,631	0,460	0,579	0,685	0,603	0,698	0,712	0,684	0,538	0,490	0,571	0,701	0,633	0,633	0,623	0,418	0,689	0,727	0,000

Gen. – genótipos, 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França

#### 4.2.3. Análise de agrupamento

Os resultados mostram que os marcadores moleculares RAPD foram eficazes em revelar a existência de diversidade genética entre os 21 genótipos de bananeira. A Figura 9 mostra o padrão eletroforético obtido pela amplificação do DNA em 21 genótipos de *Musa* spp. utilizando o iniciador OPD 03.

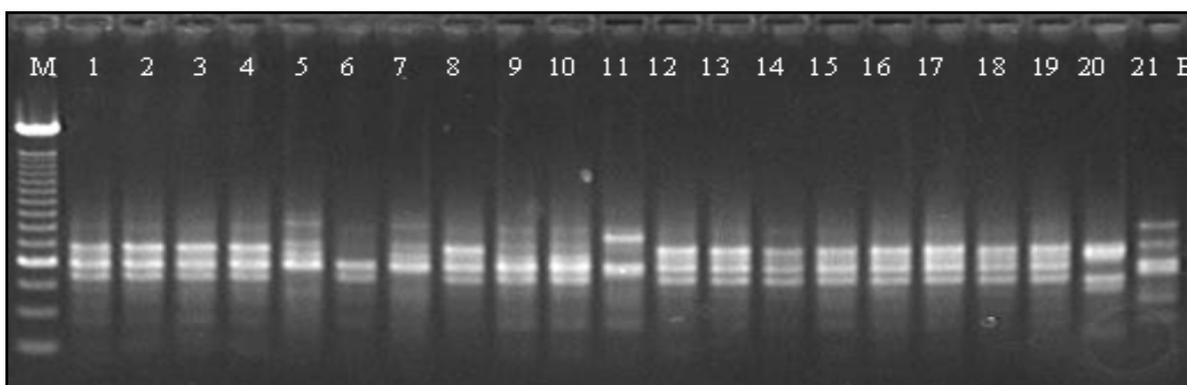


Figura 9. Amplificação com o iniciador OPD 03. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I), 1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França, B- Branco.

Com base nas análises de agrupamento hierárquicas UPGMA, essa diversidade pôde ser observada pela presença de genótipos similares e divergentes (Figura 10).

A classificação baseada em características morfológicas e genótipos deduzidos baseados em certas características agrônômicas não é segura. Características fenotípicas, como teor de açúcar do fruto, podem não estar envolvidas a simples diferença de ploidia (AAA, AAB, ou ABB). Diferentes fenótipos poderiam resultar de diferenças alélicas em únicos ou múltiplos genes. A dificuldade envolvida na identificação de cultivares de bananeira, como a

esterilidade dá ênfase na necessidade de um sistema de classificação baseado em marcadores de DNA (Loh, 2000).

#### 4.2.3.1. Método hierárquico UPGMA

Na Figura 10, está apresentado o dendrograma da distância genética dos 21 genótipos de bananeira com base em marcadores RAPD, obtido pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizando-se o método hierárquico UPGMA. Observa-se que houve a formação de oito grupos.

O primeiro grupo foi formado pelos genótipos FHIA 18, PV 42-85 e Calipso que apesar de se tratar de cultivares tetraplóides apresentam características diferentes. A PV42-85 é um híbrido da Pacovan, que é uma mutação da Prata Comum, produz frutos do tipo Prata, porte alto, resistente à Sigatoka-amarela. A cultivar tetraplóide 'FHIA 18', introduzida de Honduras, produz frutos tipo Prata. Apresenta porte médio, ciclo vegetativo de 353 dias, perfilhamento bom, sendo que os cachos podem atingir até 40 Kg, com mais de dez pencas (Fancelli, 2003).

Segundo Gomes (2004), os híbridos da cultivar 'Prata Anã' ('FHIA 18' e 'UENF 1526') são superiores em relação aos progenitores, possuindo potencial para serem lançados como cultivares. Eles superaram a genitora nos caracteres peso das três maiores pencas, número de dedos das três maiores pencas e comprimento dos dedos. Além disso, possuem maior resistência à Sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá, o que maximiza sua produtividade, porém, não diferiram estatisticamente de sua genitora no caráter número de pencas.

A FHIA 18 é um híbrido da Prata Anã cujas plantas são completamente diferentes das plantas do subgrupo Prata (Prata Comum e Pacovan), embora a Prata Anã produza um fruto semelhante ao da Pacovan. Teoricamente a presença do B na FHIA 18 e PV 42-85 podem diferenciá-las da Calipso. Por outro lado, estes genótipos possuem 3X complementos cromossômicos de *Musa acuminata*, o que poderia explicar tal ligação. A cultivar Calipso é um híbrido do tipo Gros Michel, porte médio, resistente ao mal-do-Panamá e à Sigatoka-negra (Cereja, 2005).

O segundo grupo foi formado pelos genótipos Pacovan, PV 42-142 e BB da França, um triploíde, um tetraploíde e um diplóide. Pacovan e PV 42-142 são

respectivamente uma variedade e um híbrido desta variedade. A presença da contribuição genômica B nos três genótipos deve ter levado a agrupá-los juntos. A bananeira 'Pacovan' é uma cultivar do grupo AAB, subgrupo prata, sendo uma planta vigorosa, de porte alto, contendo um bom perfilhamento, apresentando cerca de 85 frutos por cacho, com um comprimento médio de 13cm. Tem superado em quase 100% a produtividade da 'Prata' apresentando frutos mais compridos (Alves, 1999). A cultivar PV42-142 é um híbrido do tipo Prata, porte alto, resistente à sigatoka-amarela e à sigatoka-negra. O genótipo 'BB da França' é uma espécie silvestre diplóide (BB).

O terceiro grupo foi formado pelos genótipos Prata Anã, UENF 1527, Caipira, Grande Naine e UENF 1529. Os genótipos Caipira, UENF 1527 e Grande Naine são do mesmo grupo genômico (AAA). Os dois complementos genômicos AA da Prata Anã e da UENF 1529 podem ser semelhantes aos das cultivares anteriores.

A bananeira 'Prata Anã' apresenta menor altura e maior produtividade que a Prata. Seu baixo porte (menos de 3,0 metros de altura) facilita a realização de tratamentos culturais e o controle da sigatoka, bem como a própria colheita. Apresenta frutos semelhantes aos da 'Prata', na forma, no tamanho, no sabor, na resistência ao transporte, com boa duração na prateleira e aceitabilidade comercial (Alves, 1995). A bananeira 'Caipira' pertence ao grupo AAA, com porte médio a alto com ótimo perfilhamento, frutos pesando em torno de 123g, com 100 frutos por cacho com comprimento médio de 15cm. Resistente à Sigatoka-amarela, à Sigatoka-negra e ao mal-do-Panamá (Cordeiro, 2004). A cultivar 'Grande Naine' é do tipo Cavendish, porte médio a baixo, resistente ao mal-do-Panamá e suscetível às sigatokas (Cereja, 2005).

O acesso 'UENF 1529' possui alta capacidade produtiva. Os frutos apresentam o pedúnculo rígido, o que lhes confere resistência ao despencamento, característica esta que permite transporte a longas distâncias. Pertence ao grupo genômico AAB, porte alto, ciclo vegetativo de 401 dias, perfilhamento bom, cacho com peso de 20 a 25 Kg e com mais de dez pencas (Fancelli, 2003). No trabalho de Gomes (2004), a cultivar 'UENF 1529' apresentou uma boa produtividade. A cultivar apresentou média para o caráter peso do cacho superior ao encontrado pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical em 1998

(19,7 Kg), sendo promissora em produção antevendo resultados satisfatórios para os agricultores do Norte e Noroeste Fluminense.

Na identificação de possíveis genótipos introduzidos na UENF, o acesso UENF 1527 pode corresponder à cultivar Caipira. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para dizer se se trata de uma duplicata. O acesso UENF 1529 trata-se da Prata Zulu e foi classificada junto à Prata Anã.

O quarto grupo foi formado pelos genótipos UENF 1526 e Ambrósia. A cultivar Ambrósia, híbrido de Gros Michel, deveria ser classificada junto com Buccaner e Calipso. Essa classificação deve-se ao fato das cultivares serem tetraplóides. Possui porte médio, resistente ao mal-do-Panamá e à Sigatoka-negra. O acesso UENF 1526 é superior à 'Prata Anã', maior peso das pencas, número e comprimento dos frutos, resistente à sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá. A cultivar UENF 1526 não se trata de uma duplicata da cultivar FHIA 18. Esta foi classificada no primeiro grupo apresentando, então, uma grande distância entre ambas.

O quinto grupo foi formado pelos genótipos Nanicão e Bucaneiro. A cultivar Nanicão por ser do mesmo subgrupo da Grande Naine deveria ser classificadas juntos. Da mesma forma que a cultivar Bucaneiro deveria estar junta com a Calipso. Por outro lado, a presença de apenas complementos genômicos de *Musa acuminata* pode levar à classificação observada.

A cultivar 'Nanicão', uma mutação da Nanica, assemelha-se a ela, porém, é de porte mais alto atingindo 2,20 a 3,20m de altura. Produz cachos de porte médio a grande, de forma cilíndrica, pesando de 15 a 45 Kg e medindo de 0,50 a 1,20m de comprimento. Apresenta fruto médio a grande, de 18 a 24cm, de excelente sabor (Medina, 1990). Segundo Gomes (2004), essa cultivar apresenta potencial agrônomico para ser recomendada para os agricultores das Regiões Norte e Noroeste Fluminense. A cultivar Bucaneiro é um híbridos do tipo Gros Michel, porte médio, resistente ao mal-do-Panamá e à Sigatoka-negra.

O sexto grupo foi formado pelos genótipos PV 42-68, ST 12-31 e UENF 1528. A cultivar PV 42-68 deveria se enquadrar melhor no grupo 2 por ser um híbrido da Pacovan. Considerando que a Pacovan é uma mutação da Prata e ST12-31 é a Prata 'São Tomé', a semelhança entre PV 42-68 e ST 12-31 pode

ser justificada devido a esse fato. A cultivar PV42-68 é um híbrido do tipo Prata, porte alto, resistente à Sigatoka-amarela e à Sigatoka-negra. A cultivar ST12-31 também é um híbrido do tipo Prata, porte alto, resistente à Sigatoka-amarela. A presença de B pode ter levado a agrupar a cultivar UENF 1528 nesse grupo. Esta, por sua vez, não se trata de uma duplicata da cultivar Thap Maeo.

O sétimo grupo foi formado pelos genótipos Maçã e Calcutta. A cultivar Maçã possui dois terços de seus cromossomos semelhantes aos da Calcutta que é uma espécie silvestre, diplóide (AA) vinda de Honduras. A banana 'Maçã' é uma cultivar triplóide AAB, híbrido com dominância *acuminata*. É uma bananeira de fruto delicado, sendo comercializada em quase todo País. Apresenta pseudocaule de 3,5 a 4m de altura, verde-amarelado brilhante. Os frutos são curtamente pedunculados, roliços, de cascas finas, delicadas e amarelas; endocarpo de cor branca, macio, delicado, doce, perfumado, de sabor semelhante ao da maçã. Os cachos são relativamente pequenos, pesando em média 15 Kg, contendo entre 60 a 150 bananas, com 10 a 16cm de comprimento e pesando em torno de 100 a 200 gramas. É altamente suscetível ao mal-do-Panamá (Medina, 1990).

No oitavo e último grupo ficou o genótipo Thap Maeo. Essa cultivar, selecionada na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical - Cruz das Almas - BA, é uma variante da 'Mysore'. Apresenta pseudocaule menos manchado, mais vigor e cachos maiores. Sua capacidade produtiva é de 30 t/ha a 35 t/ha, quando é cultivada em solos de boa fertilidade, usando as práticas culturais recomendadas para a cultura. Pertence ao grupo genômico AAB, apresenta porte alto, ciclo vegetativo de 394 dias, perfilhamento bom, o peso dos cachos pode atingir 30 a 35 Kg, cachos com mais de dez pencas com até 250 frutos/cacho. É resistente à Sigatoka-negra, Sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá, porém, moderadamente resistente à broca-do-rizoma, ao nematóide cavernícola e suscetível ao moco (Cordeiro, 2004). Segundo Gomes (2004), a cultivar apresenta potencial para ser recomendada para os agricultores do Norte e Noroeste Fluminense, embora não tenha sido avaliada fisiologicamente.

Com base nestes resultados pode-se estabelecer critérios para cruzamento entre os referidos genótipos com boas perspectivas de explorar a diversidade encontrada em tal grupo de genótipos, antevendo bons resultados para o programa de melhoramento que se pretende implantar na UENF.

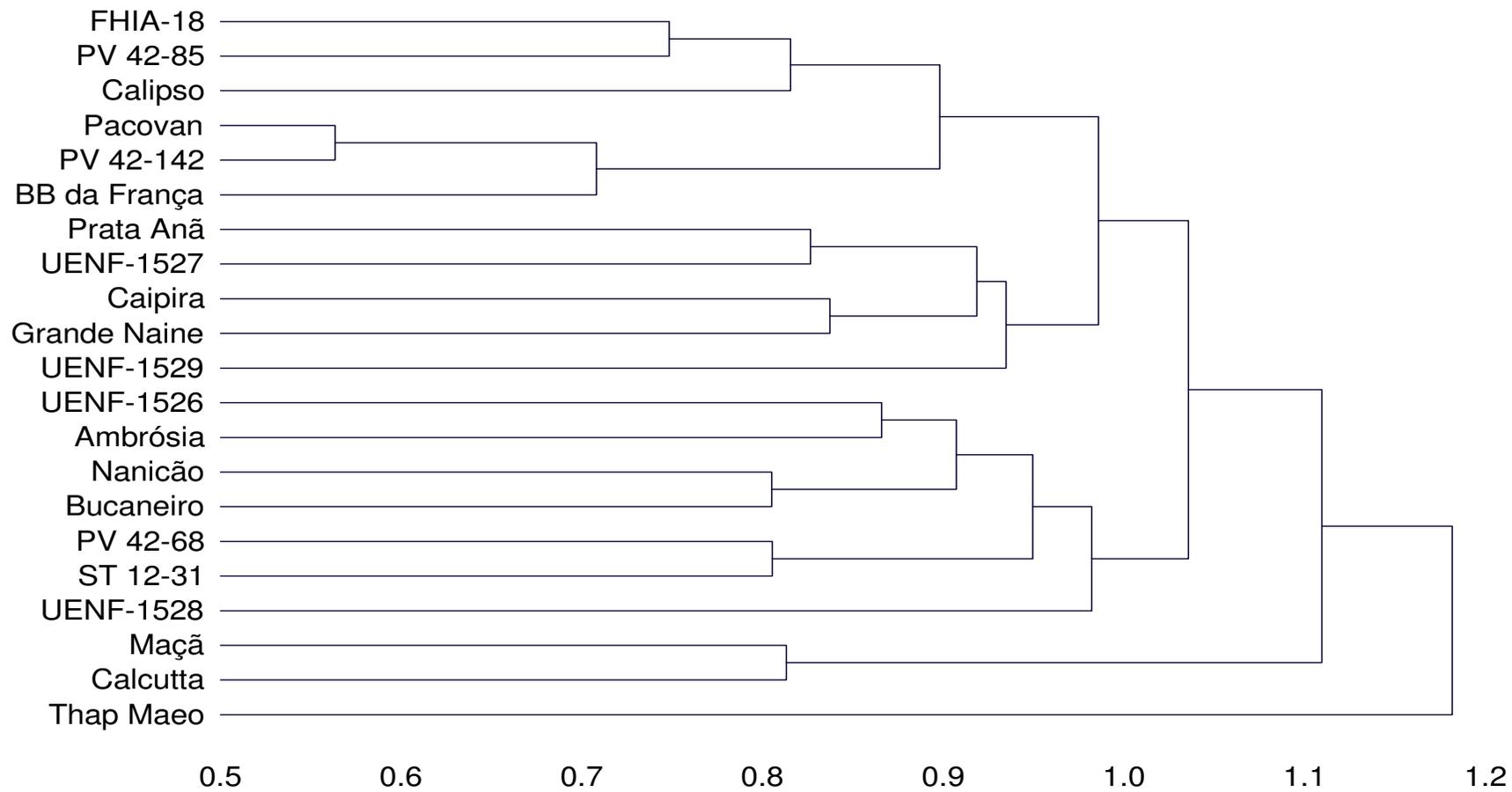


Figura 10 – Dendrograma da dissimilaridade genética de 21 genótipos de bananeira, com base em marcadores RAPD, obtido pelo método UPGMA, utilizando a distância do complemento aritmético do índice de Jaccard.

#### 4.2.4. Método de otimização de Tocher

Na Tabela 6, estão apresentados os agrupamentos dos 21 genótipos de bananeira pelo método de otimização de Tocher, utilizando-se marcadores RAPD. Esse método permitiu agrupar os 21 genótipos de bananeira em oito grupos.

Tabela 6 – Agrupamento de 21 genótipos de bananeira baseado na dissimilaridade genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, e no agrupamento pelo método de Tocher, utilizando marcadores RAPD.

Grupo	Indivíduos						
I	4	18	21	1	17	7	15
II	6	20	13				
III	16	19	14	8			
IV	5	12					
V	2	11					
VI	10						
VII	3						
VIII	9						

1-FHIA 18, 2- Prata Anã, 3- UENF 1526, 4- Pacovan, 5- Caipira, 6- Maçã, 7- UENF 1527, 8- Nanicão, 9- Thap Maeo, 10- UENF 1528, 11- UENF 1529, 12- Grande Naine, 13- Ambrósia, 14- Bucaneiro, 15- Calipso, 16- PV42-68, 17- PV42-85, 18- PV42-142, 19- ST12-31, 20- Calcutta, 21- BB da França

No grupo I foram agrupados os genótipos Pacovan, PV42-142, BB da França, FHIA 18, PV42-85, UENF 1527 e Calipso. Esses genótipos correspondem aos dois primeiros grupos formados pelo método hierárquico UPGMA, exceto o acesso UENF 1527 que aqui nesse método foi separada da cultivar Caipira, sua correspondente. No estudo realizado por Cereja (2005) as cultivares Pacovan, PV42-142 e PV42-85 apresentaram boas características de qualidade dos frutos. Por exemplo, no que concerne aos sólidos solúveis totais (SST) a cultivar Pacovan foi a que obteve a maior média (27,7 °Brix) e as cultivares PV42-142 e PV42-85 tiveram as médias de 24,1 °Brix e 23,9 °Brix, respectivamente. Porém, o

porte alto desses genótipos (médias de 3,93 m, 4,06 m e 4,00 m, respectivamente) pôde se constituir numa barreira no desenvolvimento da bananicultura na região. No entanto, na cultivar Calipso que apresentou excelentes características de desenvolvimento (média de 171 frutos/cacho) e produção ( $57,1\text{t ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ ), observou-se uma baixa qualidade sensorial dos seus frutos (aceitação global de 6,86) e suscetibilidade ao despencamento natural dos frutos. Segundo Gomes (2004) no trabalho de avaliação de germoplasma elite de bananeira, a cultivar Pacovan não se mostrou promissora para a região, pois teve uma das menores médias para peso total do cacho (14,172 Kg), menor média para número de pencas por cacho (7 Un.) e menor média para número de frutos das três maiores pencas (40 Un.). Da mesma forma, o acesso UENF 1527 apresentou uma das menores médias para peso total do cacho (13,575 Kg), menor média para comprimento dos frutos (13,66 cm) e menor média para a característica de sólidos solúveis totais (20,0 °Brix). Contudo, esse acesso, se destacou obtendo a maior média dos números de frutos das três maiores pencas (63 Un.).

No grupo II os genótipos agrupados foram Maçã, Calcutta e Ambrósia. Maçã e Calcutta já foram classificadas juntas pelo método UPGMA. O fato da cultivar Ambrósia ter se classificado nesse grupo deve-se ao fato de sua constituição genética, ou seja, somente contribuição de *Musa acuminata*. Segundo Cereja (2005) a cultivar Ambrósia apresentou excelentes características de desenvolvimento (9,72 pencas/cacho, em média) e produção ( $54,6\text{t ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ ), porém, observou-se uma baixa qualidade sensorial dos seus frutos (aceitação global de 6,41) e suscetibilidade ao despencamento natural dos frutos. No trabalho de Gomes (2004) a cultivar Maçã não obteve uma boa expressão das suas características mais importantes (peso total do cacho de 13,239 Kg, em média).

No grupo III foram agrupados os genótipos PV42-68, ST12-31, Buccaner e Nanicão. O fato de ambas possuírem em sua constituição genética 3X pode ter levado a agrupá-las juntas. PV42-68 e ST12-31, segundo Cereja (2005), essas cultivares também obtiveram boas características de qualidade dos frutos (PV42-68 – 23,3 °Brix e ST12-31 – 23,6 °Brix), porém, o porte alto (médias de 4,58 m e 3,68 m, respectivamente) é uma barreira ao desenvolvimento desses genótipos na região. A cultivar Buccaner apresentou excelentes características de

desenvolvimento (média de 191 frutos/cacho) e produção (59,8t ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup>). Todavia, observou-se uma baixa qualidade sensorial dos seus frutos (aceitação global de 6,53) e suscetibilidade ao despencamento natural dos frutos. A cultivar Nanicão apresentou excelentes características de desenvolvimento (média de 180 frutos/cacho), produção (56,6t ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup>) e boas características de qualidade dos frutos, a cultivar apresentou uma média de 23,3 °Brix (Cereja, 2005). No estudo de Gomes (2004), essa cultivar apresentou a maior média de peso total do cacho (30,695 Kg), maior média do peso das três maiores pencas (13,005 Kg) e maior média do comprimento dos frutos (23,02 cm).

No grupo IV estão os genótipos Caipira e Grande Naine, que são do mesmo grupo genômico (AAA). No estudo de Gomes (2004) a cultivar Caipira apresentou uma maior média do número de frutos das três maiores pencas (66 Un.). A cultivar Grande Naine apresentou excelentes características de desenvolvimento (média de 181 frutos/cacho), produção (59,3t ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup>) e boas características de qualidade dos frutos, com uma média de 23,6 °Brix (Cereja, 2005).

No grupo V estão os genótipos Prata Anã e UENF 1529. Esse grupo mostra que o acesso UENF1529 trata-se da Prata Zulu. A cultivar Prata Anã apresentou ótimas características de desenvolvimento (9,95 pencas/cacho, em média) e qualidade sensorial dos frutos (aceitação global de 6,85), porém, as características de produção apresentaram valores indesejáveis (34,1t ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup>) (Cereja, 2005). Isso é confirmado no trabalho de Gomes (2004), no qual a cultivar apresentou menor média para peso total do cacho (11,510 Kg), uma das menores médias para número de pencas por cacho (9 Un.) e das menores médias para número de frutos das três maiores pencas (46 Un.). Segundo o mesmo autor a cultivar Prata Zulu apresentou uma maior média para firmeza do fruto (12,77 N) e maior média para teor de sólidos solúveis totais (29,6 °Brix), ou seja, frutos de alta qualidade.

No grupo VI, VII e VIII estão os genótipos UENF 1528, UENF 1526 e Thap Maeo, respectivamente. Esses genótipos não se destacaram no trabalho de Gomes (2004). O acesso UENF 1528 e a cultivar Thap Maeo apresentaram as menores médias para comprimento dos frutos (14,88 cm e 14,36 cm, respectivamente). No entanto, a cultivar Thap Maeo apresentou a maior média para número de pencas (87,71% mais pencas por cacho que a menor –

Pacovan). O acesso UENF 1526 apresentou uma das menores médias para peso total do cacho (15,820 Kg) e a menor média para firmeza do fruto (5,04 N).

Entre o grupo de genótipos estudados observa-se boa variabilidade genética, variabilidade esta, tanto em características agronômicas, como por meio dos marcadores moleculares tipo RAPD. O acesso a essas informações e a formação dos grupos estabelecidos, poderá orientar futuras estratégias para o programa de melhoramento, uma vez, que existe a minimização da variabilidade dentro de grupos e maximização entre os grupos, possibilitando assim explorar a heterose por meio do cruzamento de genótipos pertencentes a grupos distintos.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

A bananicultura possui grande importância econômica e social no Brasil. Existe uma grande variabilidade genética, porém, não basta apenas existir a variabilidade genética básica, têm de existir também opções de hibridação para o aproveitamento dessa variabilidade na geração de novas cultivares com características melhoradas. No entanto, a esterilidade feminina das cultivares existentes não é absoluta. A maioria delas, em todos os níveis de ploidia, é capaz de produzir sementes em polinizações controladas. Todavia, a classificação taxonômica ainda é bastante confusa. O fato de algumas cultivares possuírem o mesmo nome em regiões diferentes não sugere que há uniformidade genética entre elas. Em razão disso, deve-se fazer uma análise de genótipos utilizando métodos moleculares para atualizar a nomenclatura em função da natureza clonal e a esterilidade.

Em relação aos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- Na avaliação do “DNA Fingerprint” as marcas moleculares obtidas foram satisfatórias no que tange às perspectivas iniciais.
- Houve discriminação dos acessos UENF 1526, UENF 1527, UENF 1528 e UENF 1529 por meio do “DNA Fingerprint”.

- A análise molecular de RAPD mostrou-se útil na caracterização de cultivares e no estudo das relações entre as cultivares de bananeira.
- As técnicas multivariadas empregadas (métodos de agrupamento hierárquicos – UPGMA e de otimização – Tocher) foram paralelamente concordantes entre si.
- No agrupamento dos genótipos, o método hierárquico UPGMA mostrou-se mais eficiente em posicionar os genótipos de acordo com suas relações genômicas, quando comparado com o método de otimização de Tocher.
- Por meio do método hierárquico UPGMA, pôde-se observar uma grande semelhança entre o acesso UENF 1527 e a cultivar Caipira, porém, estudos mais detalhados são necessários para dizer se trata-se de uma duplicata.
- Ainda por meio do método hierárquico UPGMA, o acesso UENF 1529 também demonstrou grande semelhança à cultivar Prata, portanto, deve-se tratar da cultivar Prata Zulu.
- Quanto aos acessos UENF 1526 e UENF 1528, estes não correspondem às cultivares FHIA 18 e Thap Maeo, respectivamente.
- Estas análises poderão contribuir para um melhor entendimento das melhores combinações de cruzamentos a serem feitas no programa de melhoramento da bananeira da UENF tornando este mais eficiente em atingir os objetivos principais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, E.J. (1995) *Banana para exportação: aspectos técnicos da produção*. Brasília: Embrapa-SPI. 106p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX; 18).
- Alves, E.J. (1999) *A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais*. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI/Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 585p.
- Amaral Júnior, A.T. (1994) *Análise multivariada e isoenzimática da divergência genética entre acessos de moranga (Cucúrbita máxima Duchesne)*. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 95p.
- Amaral Júnior, A.T., Thiebaut, J.T.L. (1999) *Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos*. Campos dos Goytacazes. RJ: UENF, 53p.
- Bhagwat, B., Duncan, E.J. (1998) Mutation breeding of Highgate (*Musa acuminata*, AAA) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using gamma irradiation. *Euphytica.*, 101(2):143-150.

- Bhat, K.V., Jarret, R.L. (1995) Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42:107-118.
- Bianchi, V.J., Fachinello, J.C., Schuch, M.W. (2003) RAPDs na caracterização genético-molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25(2):272-274.
- Borém, A. (2001) *Melhoramento de Plantas*. 2. ed. Universidade Federal de Viçosa, 453p.
- Cattaneo, L.F. (2001) *Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 93p.
- Cereja, B.S. (2005) *Caracterização agrônômica, qualidade físico-química e composição mineral de genótipos de bananeira no norte fluminense*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 96p.
- Congiu, L., Chicca, M., Cella, R., Rossi, R., Bernacchia, G. (2000) The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Molecular Ecology*, 9:229-232.
- Cordeiro, Z.J.M. (2000) *Banana. Produção: aspectos técnicos*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 143p; (Frutas do Brasil; 1).
- Cordeiro, Z.J.M. Cultivo da banana para o estado de Rondônia. EMBRAPACNPNTIA. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaRondonia/plantasdaninhas.htm>. Acesso em 10/10/2004.

- Crouch, J.H., Vuylsteke, D., Ortiz, R. (1998) Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(1):11-22.
- Cruz, C.D., Regazi, A.J. (1997) *Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético*. Viçosa: UFV, 390p.
- Cruz, C.D. (2001) *Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV, 648p.
- Damasco, O.P., Graham, G.C., Henry, R.J., Adkins, S.W., Smith, M.K., Godwin, I.D. (1996) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Reports*, 16:118-123.
- Dantas, J.L.L., Shepherd, K., Silva, S.O., Soares-Filho, W.S. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: Alves, E.J. (Ed.). *A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais*. Brasília: Embrapa, 1997. cap.1, p.27-34.
- Dias, L.S.A. (1998) Análises multidimensionais. In: Alfenas, A.C. (ed.) *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa, MG: UFV, p.405-475.
- Donato, S.L.R., Silva, S.O., Passos, A.D., Lima Neto, F.P., Lima, M.B. (2003) Avaliação de variedades e híbridos de bananeira sob irrigação. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25(2):348-351.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Falconer, D.S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*. Viçosa - MG: UFV, Impr. Univ., 279p.

Fancelli, M. *Cultivo da banana para o Estado do Amazonas*. EMBRAPACNPTIA. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaAmazonas/index.htm>. Acesso em 10/10/2004.

FAO. (2001) Disponível: site. FAO. URL: <http://apps.fao.org>. Acesso em 08/12/2001.

Ferreira, C.F., Silva, S.O., Sobrinho, N.P.D., Damascena, S.C.S., Assis, F.S., Alves, A.O., Paz, O.P. (2004) Molecular characterization of banana (AA) diploids with contrasting levels of black and yellow sigatoka resistance. *American Journal of Applied Sciences*, 1(4):276-278.

Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, p. 220.

Gawel, N.J., Jarret, R.L., Whittemore, A.P. (1992) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) – based phylogenetic analysis of *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 84:286-290.

Gehrig, H.H., Rosicke H., Kluge M. (1997a) Detection of DNA polymorphisms in the genus *Kalanchoe* by RAPD-PCR fingerprint and its relationships to infrageneric taxonomic position and ecophysiological photosynthetic behaviour of the species Source. *Plant Science*, 125(1):41-51.

Godwin, I.D., Aitken, E.A., Smith, L.W. (1997) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18(9):1524-1528.

Gomes, M.C. (2004) *Avaliação de germoplasma elite de bananeira*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Campos dos Goytacazes - Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 31p.

- Gottardi, M.V.C., Lemos, E.G.M., Ruggiero, C. (2002) Avaliação por RAPD de plantas de abacaxizeiro cultivar *Smooth Cayenne* derivadas do seccionamento do talo e cultura de tecidos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 24(1):001-005.
- Howell, E.C., Newbury, H.J., Swennen, R.L., Withers, L.A., Ford-Lloyd, B.V. (1994) The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. *Genome*, 37(2):328-32.
- IBGE. (2005) <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/>. Acesso em 20/01/2005.
- Jenny, C., Carrel, F., Tomekpe, K., Perrier, X., Dubois, C., Horry, J.P., Montcel, H.T. Les bananiers. In: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le développement. *Diversité génétique des plantes tropicales*. Montpellier: CIRAD, 1999. p.113-129.
- Kaemmer, D., Afza, R., Weising, K., Kahl, G., Novak, F.J. (1992) Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Bio/Technology*, 10:1030-1035.
- 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. (1997) Molecular breeding in the genus *Musa*: a strong case for STMS marker technology. *Euphytica*, 96:49-63.
- Lanza, M.A., Guimarães, C.T., Schuster, I. (2000) Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, 21(204):97-108.
- Loh, J.P., Kiew, R., Set, O., Gan, L.H., Gan Y. (2000) Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting of 16 banana cultivars (*Musa* cvs.). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17(3):360-366.
- Medina, J.C. (1990) *Cultura da Banana*, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, 302p.

- Moreira, J.A.N., Santos, J.W., Oliveira, S.R.M. (1994) Abordagens e metodologias para avaliação de germoplasma. Campina Grande: Embrapa-CNPA. 115 p.
- Moreira, R.S. (1999) *Banana, Teoria e Prática de Cultivo*. São Paulo: Fundação CARGILL. 2ª edição.
- Nachreiner, M.L.; Santos, R.R.P.; Boteon, M. (2004) *Janelas de Mercado: A Fruticultura Brasileira no Mercado Internacional*; <http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/janelas.pdf>. Acesso: 18/12/2004.
- Nair, A., Teo, C., Schwarzacher, T., Harrison, P. (2005) Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers. *Euphytica*, 144(3):285-290.
- Neves, T.S., Silva, S.O., Oliveira, R.P. (2002) Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de diplóides de bananeira obtidas a partir de cultura de embriões. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 24(1):006-009.
- Oakley, H.J., Gibson, L.F., George, A.M. (1998) Co-migration of RAPD-PCD amplicons from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 164:35-38.
- Onguso, J.M., Kahangi, E.M., Ndiritu, D.W., Mizutani, F. (2004) Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 99:9-20.
- Padilha, L. (2002) Marcadores moleculares semi-automatizados e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Tese (Doutorado) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 85p.
- Pillay, M., Nwakanma, D.C., Tenkouano, A. (2000) Identification of RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa* L. *Genome*, 43:763-767.

- Ramalho, M.P., Bosco, J., Pinto, C.A. (2000) *Genética na Agropecuária*. Lavras: UFLA, 2000. 472p.
- Rieseberg, L. H. (1996) Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol Ecol*, 5:99-105.
- Ruggiero, C. (2001) *Bananicultura*. Simpósio Brasileiro sobre bananicultura, 4, 8-10 dez 1998, Jaboticabal: Funep, 552p.
- Salla, M.F.S., Ruas, C.F., Ruas, P.M., Carpentieri-Pípulo, V. (2002) Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 24(1):015-022.
- Santos, J.B. (1994) Emprego de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 12(2):282-286.
- Sawazaki, H.E., Barbosa, W., Colombo, C.A. (2002) Caracterização e identificação de cultivares e seleções de pereiras através de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 24(2): 447-452.
- Schifino-Wittmann, M.T. Agnol, M.D. (2001) Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, 31(1):169-175.
- Sharon, D., Hillel, J., Vainstein, A., Lavi, U. (1992) Application of DNA fingerprints for identification and genetic-analysis of *Carica papaya* and other *Carica* species. *Euphytica*, 62(2):119-126.
- Silva, S.O., Shepherd, K., Alves, E.J., Dantas, J.L.L. Cultivares de banana. In: Alves, E.J. (1999) *A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais*. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.85-105.
- Silva, S.O., Alves, E.J., Lima, M.B., Silveira, J.R.S. (2002) *Melhoramento de fruteiras tropicais*. In: Bruckner, C.H. Viçosa: UFV. 422P.

- Silva, S.O., Santos-Serejo, J.A. (2003) Melhoramento da bananeira para resistência / resultados obtidos pelo melhoramento comercial. In: V Simpósio Brasileiro sobre a Bananicultura e I Workshop do Genoma Musa. p.147-155.
- Simmonds, N.W., Shepherd, K. (1955) The taxonomy and origins of the cultivated bananas. Linnean Society. *Botanical Journal*, 55:302-312.
- Simmonds, N.W. *Los plátanos*. Barcelona: Blume, 1973. 539p.
- Singh, K.P. and Roy, D. (2001) Identification of novel breast tumor-specific mutation (s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. *Gene*, 269:33-43.
- Souza, S.A.C.D. (2002) *Avaliação da variabilidade genética em Musa spp. utilizando marcadores microssatélites*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ – USP, 86p.
- Teo, C.H., Tan, S.H., Ho, C.L., Faridah, Q.Z., Othman, Y.R., Heslop-Harrison, J.S., Kalendar, R., Schulman, A.H. (2005) Genome Constitution and Classification Using Retrotransposon-Based Markers in the Orphan Crop Banana. *Journal of Plant Biology*, 48(1):96-105.
- Urasaki, N., Tokumoto, M., Torora, K.; Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I., Terauchi, R. (2002) A male and hermaphrodite specific RAPD markers for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2-3):281-285.
- Viana, A.P., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Souza, M.M., Maldonado, J.F.M., Amaral Júnior, A.T. (2003) Diversidade Genética entre Genótipos Comerciais de Maracujazeiro-Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre Espécies de Passifloras Nativas Determinadas por Marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25(3):489-493.

- Vidal, J.R., Delavault, P., Coarer, M., Defontaine, A. (2000) Design of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar-specific SCAR primers for PCR fingerprinting. *Theor Appl Genet*, 101:1194–1201.
- Vitória, A.P., Souza Filho, G.A., Bressan-Smith, R., Pinto, F.O., Paiva, L.B., Guimaraes, P.S., Oliveira, M.P.A., Pereira, M.G., Daher, R.F. (2004) DNA fingerprint of *Carica papaya* L. genotypes by RAPD markers. *Journal Of News Seeds*, 6(1):1-10.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18:6531-6535.
- Xu, H., Wilson, D.J., Arulsekhar, S., Bakalinsky, A.T. (1995) Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprints grape (*Vitis*) rootstocks. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, 120(5):714-720.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. (1994) Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, San Diego, 20:176-183.