

Genotipagem de cultivares de bananeira do banco de germoplasma da Epagri por RAPD

Cristiane Maria da Silva¹, Eliza Clarindo Paulino², Adriana Pereira³, Robert Harri Hinz⁴, Luiz Alberto Lichtemberg⁵, Fernando Adami Tcacenco⁶ e Marciel João Stadnik⁷

Resumo – A banana (*Musa spp.*) está entre as frutas mais consumidas do mundo. Embora exista um número expressivo de cultivares de bananeira, poucos apresentam importância comercial. Para avanços nos programas de melhoramento genético dessa cultura, existe a necessidade de compreender a estrutura genômica e as relações genéticas existentes entre os acessos depositados nos bancos de germoplasma. Assim, o objetivo deste trabalho foi levantar a variabilidade genética existente entre 15 acessos do Banco de Germoplasma de Bananeira da Epagri por meio da técnica RAPD. Foram utilizados 78 iniciadores de PCR, os quais geraram um total de 855 bandas polimórficas. Os dados de presença/ausência de bandas foram submetidos à análise de conglomerados. Os resultados mostraram que os marcadores RAPD foram eficazes em revelar a existência de diversidade genética entre os cultivares analisados, bem como em separar os grupos genômicos A e B e os cultivares de acordo com seus respectivos subgrupos.

Termos para indexação: banana, variabilidade genética, melhoramento, marcadores.

RAPD genotyping of banana cultivars from Epagri germplasm bank

Abstract - Banana (*Musa spp.*) is one of the most important fruits worldwide, and although there is a large number of cultivars, only a few present desirable agronomic characteristics. In order to facilitate advancements in plant breeding, there is a need for understanding the genomic structure and the genetic relationships among the accesses in germplasm banks. In this work, the use of RAPD in the study of the genetic variability of 15 cultivars of banana from a wide genomic background was validated. A total of 78 primers were used, which generated 855 polymorphic bands. Data on presence/absence of polymorphic bands were subjected to cluster analysis. The results showed that RAPD markers were efficient in revealing the genetic diversity among the cultivars, as well as in separating the A and B genomic groups and the cultivars accordingly to their subgroups.

Index terms: banana, genetic variability, breeding.

Introdução

A bananeira é cultivada em 125 países, e em alguns deles a atividade se destaca como uma das principais fontes de arrecadação e geração de emprego e renda. A bananicultura tem-se expandido bastante na maioria dos países nas três últimas décadas, passando de 35 milhões de toneladas na safra 1978 para 107 milhões de

toneladas na safra 2011. Isso foi possível graças ao uso mais intensivo de tecnologia, proporcionando melhor produtividade (Vieira, 2013). Considerada um alimento energético, é rica em carboidratos (24%), fibras (6% a 7%) e também em elementos minerais, como sódio, magnésio, fósforo e, principalmente, potássio, além de vitaminas A, B e C (Crouch et al., 1999a). Cultivada frequentemente por pequenos agricultores, possui notável

papel socioeconômico em muitos países tropicais em desenvolvimento, sendo de importância tanto como fonte de alimento quanto como fonte de divisas para os mercados local e internacional.

Santa Catarina destaca-se no cenário nacional como o terceiro maior produtor de banana. O Estado é superavitário na produção de banana, e é de fato o maior exportador nacional. O produto destina-se principalmente para os centros consumidores do Uruguai e

Recebido em 21/10/2013. Aceito para publicação em 14/2/2014.

¹ Bióloga, M.Sc., Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Agrárias, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, fone: (48) 3721-5423, email: crisfito@hotmail.com.

² Bióloga, Bolsista CNPq, Epagri/Estação Experimental de Itajaí, Rod. Antônio Heil, 6800, 88318-112 Itajaí, SC, e-mail: eliza_paulino@hotmail.com.

³ Química, M.Sc., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, e-mail: adrianapereira@epagri.sc.gov.br.

⁴ Engenheiro-agrônomo, M.Sc., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, e-mail: robert@epagri.sc.gov.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, M.Sc., Epagri, Estação Experimental de Itajaí, e-mail: licht@epagri.sc.gov.br.

⁶ Engenheiro-agrônomo, Ph.D., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, e-mail: tcacenco@epagri.sc.gov.br

⁷ Engenheiro-agrônomo, Ph.D., Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Agrárias, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, fone: (48) 3721-5338, e-mail: marciel.stadnik@ufsc.br.

da Argentina. O volume de exportação nas seis últimas safras (2008-2013) foi de 339.374 toneladas, atingindo a cifra de US\$75.410.000,00 (Vieira, 2013).

A bananicultura tem enfrentado uma série de problemas relacionados a pragas e doenças, com reflexos negativos na produção. Embora exista um número expressivo de variedades cultivadas, quando se consideram aspectos como preferência dos consumidores, produtividade, tolerância a pragas e doenças, porte adequado e resistência a seca e a baixas temperaturas, restam poucas com potencial agrônomico e alta qualidade de frutos, justificando, assim, a necessidade do lançamento de variedades para ser usadas comercialmente (Donato et al., 2006).

O grande número de cultivares originados a partir de cruzamentos entre *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B) caracteriza a alta diversidade genética existente, resultando em um complexo grupo para estudos da estrutura genômica e das relações genéticas existentes entre os acessos depositados nos bancos de germoplasma, proporcionando maiores avanços no melhoramento dessa cultura (Crouch et al., 1999a,b). O recente sequenciamento genômico dos cultivares Pahang (genoma A) e PKW (genoma B) fornece outras informações importantes a esse respeito (D'Hont et al., 2012; Droc et al., 2013).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm utilizado marcadores moleculares do tipo RAPD, SSR e AFLP como auxiliares na avaliação da diversidade genética de suas coleções, bem como na tentativa de encontrar marcadores ligados a genes de interesse e para caracterizar acessos individuais, identificando duplicatas e variantes de clones (Menon et al., 2004). Visser (2000) e Bhat et al. (1995), ao analisar cultivares de bananeira, verificaram que os agrupamentos formados por marcadores RAPD coincidiram com a composição genômica dos materiais. O primeiro autor encontrou, ainda, que um dos iniciadores foi capaz de diferenciar

acessos dos genótipos AAB e ABB. Oriero et al. (2006) analisaram, através de marcadores SSR (microsatélites), 40 acessos do genoma B e identificaram que os acessos triploides de bananeira foram agrupados separadamente daqueles diploides.

Damasco et al. (1996) avaliaram a variação entre cultivares de bananeira do grupo AAA após terem sido submetidos à micropropagação, demonstrando que a técnica de RAPD pode ser utilizada para detectar variação genética entre cultivares. Além disso, Pillay et al. (2000) e Tcacenco et al. (2006), ao analisar plantas dos genomas A e B, encontraram um marcador de genoma específico que pode ser utilizado no escrutínio de coleções de cultivares para identificar os diversos grupos genômicos.

Esses resultados mostram a utilidade potencial de marcadores moleculares como auxiliares nos programas de introdução de plantas e de melhoramento genético da cultura da bananeira. Sendo assim, o presente trabalho foi conduzido para verificar a variabilidade genética entre os acessos do Banco de Germoplasma de Bananeira da Epagri.

Material e métodos

Foram avaliados 15 cultivares do Banco Ativo de Germoplasma de Bananeira da Epagri/Estação Experimental de Itajaí, pertencentes aos seguintes grupos genômicos: AA ('Ouro'), AAA ('Nanicão', 'Grande Naine' e 'Williams'), AAB ('Prata Anã', 'Pacovan', 'Maçã', 'Figue Pome Naine', 'Mysore', 'SCS451 Catarina'), AAAB ('BRS FHIA Maravilha' [FHIA-01'], 'FHIA-18', 'FHIA-21', 'BRS Tropical' ['Maçã Bahia']), e ABB ('Figo Cinza'). Amostras de folhas (300mg) foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, e o DNA foi extraído de acordo com Doyle e Doyle (1990). A avaliação da quantidade e da qualidade do DNA extraído foi efetuada no aparelho BioPhotometer Plus (Eppendorf, Alemanha).

As amostras de DNA obtidas de cada cultivar foram amplificadas pela técnica RAPD, utilizando-se um total de 78 iniciadores das séries OPA, OPB, OPC, OPG, OPAX, OPF, OPP, OPW, OPX, PU1, PU2, R1, R2, R3, 81, 171, 172 e 173 (Tabela 1). As reações de amplificação continham tampão PCR 1X, 2mM de $MgCl_2$, 0,2mM de cada dNTP, 0,4 μ M de iniciadores, e 1,5U de *Taq* DNA polimerase, em um volume final de 30 μ l, e foram conduzidas em termociclador Veriti (Applied Biosystem), sob as seguintes condições: um ciclo a 94°C/5 minutos; 40 ciclos de 92°C/60 segundos, 35°C/60 segundos e 72°C/2 minutos; e ao final um ciclo a 72°C/5 minutos. Os produtos resultantes das ampliações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% a 70V em tampão TBE por duas horas, e corados com brometo de etídeo (5 μ g. ml⁻¹). Os produtos amplificados foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em fotodocumentador (Doc-Print VX2, Vilber Lourmat, França). Todas as reações foram conduzidas em duplicatas.

Para a análise de conglomerados, a presença (1) e ausência (0) de bandas foram codificadas na forma de uma matriz binária, sendo a similaridade entre os acessos calculada pelo coeficiente SM (*Simple Matching*), e a construção do dendrograma foi baseada no Método da Ligação Completa (*Complete Linkage*), utilizando o programa NTSYS-pc versão 2.1 (Rohlf, 2000). A consistência do padrão de agrupamento foi avaliada por meio do coeficiente de correlação cofenética, conforme Dunn e Everitt (1982).

Resultados e discussão

Os 78 iniciadores testados amplificaram ao todo 1.047 fragmentos, dos quais 855 (81,7%) foram polimórficos e 192 (18,3%) foram monomórficos. Em média, cada iniciador gerou 10,96 fragmentos polimórficos (Tabela 1). O iniciador que gerou o maior polimorfismo foi OPA-►

Tabela 1. Iniciadores de marcadores moleculares RAPD utilizados no levantamento da variabilidade genética entre 15 cultivares de bananeira (*Musa sp.*) do Banco Ativo de Germoplasma da Epagri/Estação Experimental de Itajaí e respectivas bandas polimórficas e totais, média de bandas por iniciador e tamanho médio dos fragmentos amplificados

Série	Banda			Tamanho médio
	Polimórfica	Total	Média por iniciador	
				pb ⁽⁷⁾
OPA ⁽¹⁾	257	299	13,5	200 a 2.080
OPB ⁽²⁾	62	76	8,9	250 a 2.500
OPC ⁽³⁾	173	218	10,1	300 a 3.000
OPG ⁽⁴⁾	188	235	9,9	150 a 2.300
Outros "OP" ⁽⁵⁾	71	99	10,1	250 a 2.500
Outros ⁽⁶⁾	104	120	11,6	210 a 2.300
Total	855	1.047	11,0	

⁽¹⁾ OPA – 19 iniciadores: todos, exceto OPA-03.

⁽²⁾ OPB – 7 iniciadores: OPB-01, OPB-02, OPB-03, OPB-04, OPB-07, OPB-14 e OPB-20.

⁽³⁾ OPC – 17 iniciadores: todos, exceto OPC-05, OPC-15 e OPC-18.

⁽⁴⁾ OPG – 19 iniciadores: todos, exceto OPG-20.

⁽⁵⁾ Outros OP – 7 iniciadores: OPAX-10, OPAX-12, OPF-05, OPP-12, OPP-16, OPW-08 e OPX-11.

⁽⁶⁾ Outros: 9 iniciadores: PU1, PU2, R1, R2, R3, 81, 171, 172 e 173.

⁽⁷⁾ Pares de bases.

-18 (21 fragmentos), e os que geraram o menor polimorfismo foram OPA-11, OPC-17 e OPG-07, cada um com quatro fragmentos.

Em um trabalho sobre a diferenciação molecular de cultivares-elite de bananeiras, Jesus et al. (2006) utilizaram 47 iniciadores e encontraram um total de 328 marcas, sendo 246 polimórficas. Já no trabalho conduzido por Souza et al. (2008), foram utilizados 31 iniciadores para a avaliação da similaridade genética em genótipos de bananeira via marcadores RAPD. Foram encontradas 94 marcas ao todo, das quais 75 foram polimórficas. Segundo Araújo et al. (2003), a natureza do polimorfismo do RAPD depende dos iniciadores utilizados e de seus produtos de amplificação. Em geral, quanto maior for o número de iniciadores utilizados, maiores serão as chances de detectar polimorfismo e, conseqüentemente, os

resultados serão mais confiáveis.

No dendrograma da similaridade genética dos 15 cultivares de bananeira (Figura 1), observou-se a formação de três grupos distintos a uma similaridade de 55%. O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,85, indicando um bom ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma.

O **grupo 1** foi formado pelos cultivares portadores exclusivamente do genoma A: Nanicão, Grande Naine, Williams (grupo genômico AAA, subgrupo Cavendish) e Ouro (grupo genômico AA).

O **grupo 2** foi formado pelos cultivares portadores de uma única cópia do genoma B e inclui representantes dos subgrupos Prata, Maçã e Bluggoe. Cabe ressaltar que os cultivares SCS451 Catarina, Prata Anã, Pacovan, BRS FHIA Maravilha e FHIA-18 são do subgrupo Prata, enquanto o

cv. BRS Tropical pertence ao subgrupo Maçã. O cultivar BRS Tropical é resultado de um cruzamento do cultivar Yangambi nº 2 (grupo genômico AAB, subgrupo Maçã) com o cultivar M53 (grupo genômico AA). Suas características são muito semelhantes às do cultivar Maçã, no entanto, molecularmente, este cultivar apresenta características mais semelhantes às dos cultivares do subgrupo Prata. Resultados semelhantes foram obtidos por Jesus et al. (2006), que descobriram que o cultivar BRS Tropical foi agrupado com o cultivar FHIA-18.

Em um trabalho realizado anteriormente, Tcacenco et al. (2006) encontraram maior similaridade entre os cvs. FHIA-21 e SCS451 Catarina. Isso pode ter acontecido devido ao baixo número de marcadores utilizados (quatro iniciadores RAPD, 30 bandas polimórficas), em contraste com os 78 iniciadores e as 855 bandas polimórficas obtidas no presente trabalho, o que confere alta confiabilidade a este agrupamento. Além disso, a divisão dos cultivares de *Musa* em subgrupos está diretamente relacionada à ocorrência de pequenas mutações em um clone (Dantas et al., 1997). 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). Altos níveis de similaridade genética são esperados entre indivíduos de um mesmo subgrupo, pois partilham uma origem comum.

O **grupo 3** foi formado por um único cultivar (Figo Cinza), portador de duas cópias do genoma B, além de uma cópia do genoma A.

No dendrograma, ficou evidenciada a separação entre cultivares exclusivamente com o genoma A (AA ou AAA) dos cultivares portadores de pelo menos uma cópia do genoma B (AAB, AAAB ou ABB). Outros trabalhos

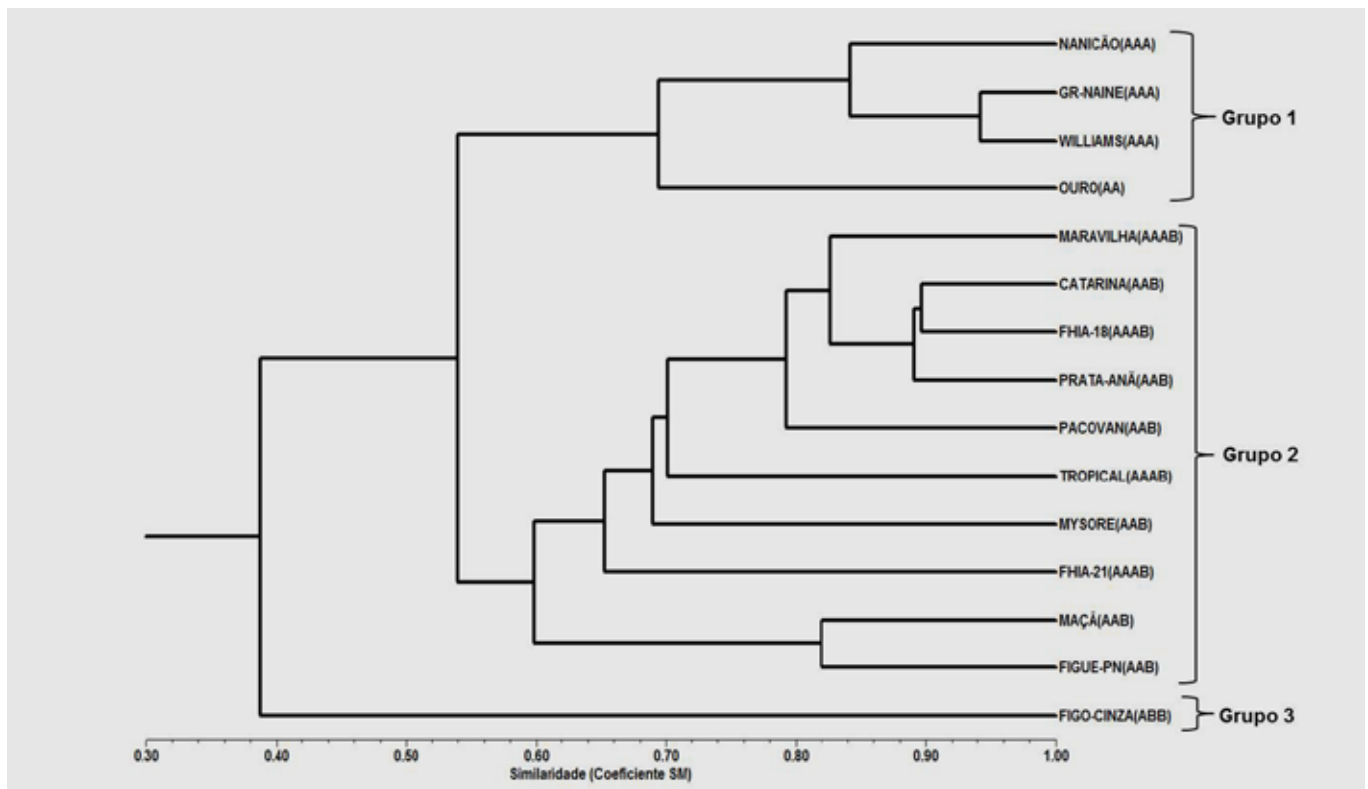


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética entre 15 cultivares de bananeira (*Musa* sp.) do Banco Ativo de Germoplasma da Epagri/ Estação Experimental de Itajaí. O coeficiente de correlação cofenética foi 0,85

(Jesus et al., 2009; Creste et al., 2003; Pillay et al., 2000; Tcacenco et al., 2006) também relataram a eficiência da técnica RAPD na separação de cultivares portadores do genoma A daqueles portadores do genoma B. Ademais, analisando-se a frequência de bandas para cada grupo genômico (A ou B), pôde-se constatar que doze bandas ocorrem exclusivamente em cultivares portadores do genoma B. Essas bandas, geradas pelos iniciadores OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPA-09, OPA-18 (duas bandas), OPC-12, OPG-05, OPG-13 (duas bandas), OPG-18 e PU2 poderiam servir como bandas diagnósticas para a presença do genoma B em trabalhos de genotipagem. Resultados semelhantes foram obtidos por Tcacenco et al. (2006), que também obtiveram uma banda exclusiva do grupo genômico B, e por Pillay et al. (2000), que observaram igualmente bandas diagnósticas para o

genoma B, além de bandas exclusivas para o genoma A.

No presente trabalho, quatro outras bandas, geradas pelos iniciadores OPA-02, OPA-08, OPA-14 e 81, ocorreram apenas nos cvs. Nanicão, Grande Naine, Williams e Ouro, portadores exclusivamente do genoma A. No entanto, como neste trabalho não foi avaliado nenhum cultivar que não contivesse nenhuma cópia do genoma A, é impossível determinar se essas bandas poderiam servir como diagnóstico para a presença do genoma A.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, fica evidenciada a utilidade de técnicas moleculares para a caracterização de germoplasma, o que pode auxiliar os melhoristas no estabelecimento de critérios para cruzamentos entre os genótipos com boas perspectivas de explorar a diversidade encontrada. Também é

possível rever a correta identificação dos vários acessos introduzidos na coleção de germoplasma, particularmente no tocante a grupos genômicos, no caso de *Musa*, e na verificação da ocorrência de duplicatas.

Conclusão

Marcadores moleculares RAPD são eficazes em revelar a existência de diversidade genética entre os 15 cultivares de bananeira analisados, bem como em separar os grupos genômicos A e B.

Referências

1. ARAUJO, E.S.; SANTOS, A.M.; AREIAS, R.G.B.M. et al. Uso de RAPD para análise de diversidade genética em arroz. **Agronomia**, v.37, n.1, p.33-37, 2003. ▶

2. BHAT, K.V.; JARRET, R.L.; RANA, R.S. DNA profiling of banana and plantain cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. **Electrophoresis**, v.16, n.9, p.1736-1745, 1995.
3. CRESTE, S.; TULMSNN NETO, A.; SILVA, S.O. et al. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, n.132, p.259-268, 2003.
4. CROUCH, J.H.; CROUCH, H.K.; TENKOUANO, A. et al. VNTR-based diversity analysis of 2x and 4x full-sib *Musa* hybrids. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.2, p.99-108, 1999a.
5. CROUCH, J.H.; CROUCH, H.K.; CONSTANDT, H. et al. Comparison of PCR-based molecular marker analyses of *Musa* breeding populations. **Molecular Breeding**, v.5, p.233-244, 1999b.
6. DAMASCO, O.P.; GRAHAM, G.C.; HENRY, R.J. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. **Plant Cell Reports**, v.16, p.118-123, 1996.
7. DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S.O. et al. 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.
8. D'HONT, A.; DENOEUDE, F.; AURY, J.-M. et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v.488, p.213-217, 2012.
9. DONATO, S.L.R.; SILVA, S.O.; LUCCA FILHO, O.A. et al. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.), em dois ciclos de produção no sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.1, p.139-144, 2006.
10. DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **BRL Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
11. DROC, G.; LARIVIERE, D.; GUIGNON, V. et al. **The Banana Genome Hub Database (2013)** doi:10.1093/database/bat035, 2013.
12. DUNN, G.; EVERITT, B.S. **An introduction to mathematical taxonomy**. Cambridge Studies in Mathematical Biology, 5. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.
13. JENNY, C.; CARRELI, F.; TOMEKPE, K. et al. Les bananiers. In: CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT. **Diversité génétique de plantes tropicales**. Montpellier: Cirad, 1999. p.113-129.
14. JESUS, O.N.; CÂMARA T.R.; FERREIRA, C.F. et al. Diferenciação molecular de cultivares elites de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1739-1748, 2006.
15. JESUS, O.N.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O. et al. Characterization of recommended banana cultivars using morphological and molecular descriptors. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p.164-173, 2009.
16. MENON, R.; SUNNY, K.M.; BABUT, D. et al. Genetic diversity of cultivars from southern India using RAPD markers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON *MUSA*: HARNESSING RESEARCH TO IMPROVE LIVELIHOODS, 1., 2004, Penang, Malaysia. **Abstracts guide...** [Montpellier]: Inibap, 2004. p.6-7.
17. ORIERO, C.E.; ODUNOLA, O.A.; LOKKO, Y. et al. Analysis of B-genome derived simple sequence repeat (SSR) markers in *Musa* spp. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.2, p.126-128, 2006.
18. PILLAY, M.; NWAKANMA, D.C.; TENKOUANO, A. Identification of RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa* L. **Genome**, v.43, n.5, p.763-767, 2000.
19. RHOLF, F.J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**, version 2.0. Exeter Software Setauket, New York, 1993.
20. SOUZA, C.M.P.; VIANA, A.P.; FERREIRA, C.F. et al. Avaliação da dissimilaridade genética em genótipos de bananeira (*Musa* spp.) via marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.30, n.2, p.419-424, 2008.
21. TCACENCO, F.A.; PAULI, K.S.; NICOLETTI, M.E. et al. Diversidade genética de germoplasma de *Musa* da Epagri usando marcadores RAPD. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville, SC. **Anais...** Itajaí, SC: Acorbat/Acafruta, 2006, v.2, p.464-467.
22. VIEIRA, I.M. Banana. **Síntese Anual da agricultura de Santa Catarina 2012-2013**, Florianópolis, p.18-25, 2013.
23. VISSER, A.A. Characterization of banana and plantain using random amplified polymorphic DNA markers. **Acta Horticulturae**, v.540, p.113-123, 2000. ■