



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



MARCIENE AMORIM RODRIGUES

**ESTUDOS MOLECULARES, ANATÔMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA
DE GENÓTIPOS DE BANANEIRA CONTRASTANTES QUANTO AO
DESPENCAMENTO DOS FRUTOS.**

Feira de Santana, BA
2015

MARCIENE AMORIM RODRIGUES

**ESTUDOS MOLECULARES, ANATÔMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA
DE GENÓTIPOS DE BANANEIRA CONTRASTANTES QUANTO AO
DESPENCAMENTO DOS FRUTOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Co-orientadores: Dr. Edson Perito Amorim

Dra. Claudia Fortes Ferreira

Feira de Santana, BA
2015

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

R614e Rodrigues, Marciene Amorim
Estudos moleculares, anatômicos e expressão gênica de genótipos de
bananeira contrastantes quanto ao despencamento dos frutos / Marciene
Amorim Rodrigues. – Feira de Santana, 2015.
72 f. : il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.

Co-orientadores: Edson Perito Amorim e Claudia Fortes Ferreira

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marlon Cristian Toledo Pereira

Unimontes

Dr (a). Eva Maria Rodrigues Costa

UFRB

Prof. Dr . Lenaldo M. de Oliveira

UEFS

Prof. (a). Dr (a). Alessandra Selbach Schnadelbach

UFBA

Prof. Dr. Prof. Dr. José Raniere Ferreira Santana

UEFS

Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo cuidado sempre constante em todos os caminhos percorridos, pelo seu infinito amor e proteção;

Aos meus pais, Valdemar e Eulália e irmãos, Marcelo, Márcio, Marcy e Vânia por todo o amor, cuidado, suporte e incentivo;

Ao meu orientador, José Raniere Ferreira Santana, pela orientação, amizade e confiança;

Aos meus co-orientadores, Edson Perito Amorim e Claudia Fortes Ferreira, pela orientação, ensinamentos e total apoio em todas as etapas do trabalho;

Ao professor Fabiano Martins, por o total suporte nas análises anatômicas;

Ao professor Rogério Mercês, por todo o suporte nas análises de expressão gênica, pelo apoio e amizade;

A todos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, muito obrigada aos técnicos Raimundo Pereira e Vanderson Rodrigues, à analista Andressa Priscila Ramos, a todos os bolsistas e pós-graduandos, em especial à Cíntia Paula, Cátia Dias, Dalma Brito, Patrícia Reis, Gilmara Fachardo, Zanon Yark, Paulo Henrique, Kátia Pestana, Selma Maria, Karinna, Rafaella Roque pela amizade, alegria (muita alegria!), agradável convivência e colaboração;

Aos amigos Luiz Cláudio, Livia Pinto, Lindinalva Castro e Ierla Santos, pelo incentivo e preciosa ajuda;

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pelo apoio institucional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, por ter disponibilizado toda a infra-estrutura necessária na realização do trabalho;

A todos que contribuíram com esse trabalho;

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O despencamento natural dos frutos da bananeira está estreitamente relacionado com o processo de maturação e envolve o amolecimento e enfraquecimento do pedicelo. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética de genótipos de bananeira com níveis contrastantes ao despencamento dos frutos por meio de marcadores moleculares e avaliar a suscetibilidade e resistência ao despencamento a partir de estudos anatômicos e análise de expressão gênica via PCR quantitativo em tempo real. A genotipagem dos dados gerados pelos microssatélites foi realizada com base no número de pares de base de cada fragmento e para o agrupamento no dendrograma, utilizou-se o método UPGMA. Dos 30 iniciadores microssatélites avaliados, obteve-se 139 alelos, com média de 4,66 alelos por loco. Não foi observada relação entre o polimorfismo detectado pelos marcadores microssatélites e o grau de despencamento dos frutos. Para a caracterização anatômica, foram utilizados genótipos nos estádios de maturação 4, 5 e 6, de diferentes ploidias e padrões de resistência ao despencamento. No genótipo suscetível 017041-01 foi observada presença marcante de parênquima aerífero, característica que não foi evidenciada nos genótipos resistentes BB França, Khai Nai On e BRS Preciosa. As mudanças anatômicas, observadas durante o amadurecimento nos estádios de maturação, foram mais evidentes no genótipo suscetível 017041-01. Maiores valores da variável AF e maior deposição de lignina nos feixes vasculares mostraram-se relacionados à resistência ao despencamento. Os valores dos Ct (*cycle threshold*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica relativa dos genes modificadores da parede celular (PEL1, EXP1 e XTH4) entre diferentes estádios de maturação na zona de despencamento (ZD) e na região mediana da casca (zona controle - ZC). Para realizar a análise de expressão relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os resultados finais da análise por RT-qPCR mostraram que houve uma expressão diferencial entre os estádios de maturação nos genótipos estudados. Os genes PEL1 e XTH4 demonstraram perfis de expressão relacionados com o despencamento dos frutos em diferentes genótipos sendo bons candidatos para estudos funcionais em bananeira, podendo ser utilizado para direcionar o programa de melhoramento da cultura visando à produção de frutos com resistência para essa característica.

Palavras-chave: *Musa* spp. Pedicelo. ISSRs. Microssatélites. RT-qPCR.

ABSTRACT

The finger drop of banana is closely related to the maturation process and involves the softening and weakening of the pedicel. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of banana genotypes with contrasting levels of fruit finger drop by means of molecular markers and evaluate the susceptibility and resistance to finger drop from anatomical studies and analysis of gene expression via real-time quantitative PCR. The genotyping data generated by microsatellites was carried out based on the number of base pairs of each fragment and dendrogram cluster calculated by UPGMA method. Of the 30 microsatellite primer evaluated, 139 alleles were obtained, with the average of 4.66 alleles per locus. No relationship was found between the polymorphism detected by microsatellite markers and the degree of finger drop fruit. For the anatomical characterization, genotypes in the maturation stages 4, 5 and 6, and from different ploidy levels and finger drop resistance patterns, were used. In genotype 017041-01, susceptible, the presence of air parenchyma, was observed, a feature which was not evidenced in the resistant genotypes BB France, Khai Nai and BRS On Preciosa. Higher values of variable AF and increased deposition of lignin in the vascular bundles, were related to finger drop resistance. The values of Ct (cycle threshold) were used to determine the gene expression difference on cell wall modifier genes (PEL1, EXP1 and XTH4) between different stages of maturation in the finger drop zone (ZD) and in the middle of the fruit (control zone-ZC). To perform the analysis of relative expression, the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, was used. RT-qPCR analysis showed that there was a differential expression between the stages of maturation. Ploidy levels and resistance patterns, did not show correlation with the results of the expression. Genes XTH4 and PEL1 showed expression profiles related to finger drop in fruits in different genotypes being good candidates for functional studies in bananas, and may be useful in strategies of genetic improvement aiming the production of banana fruits with resistance to finger drop.

Key words: *Musa* spp. Pedicel. ISSRs. Microsatellites. RT-qPCR.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
CAPÍTULO 1 - Variabilidade genética entre diploides de bananeira quanto ao despencamento natural dos frutos.	22
1.1 Introdução	23
1.2 Material e Métodos	24
1.3 Resultados e Discussão	27
1.4 Conclusões	32
Referências	33
CAPÍTULO 2 – Caracterização anatômica de genótipos de bananeira contrastantes para o despencamento natural dos frutos.	36
2.1 Introdução	37
2.2 Material e Métodos	38
2.3 Resultados e Discussão	40
2.4 Conclusões	49
Referências	50
CAPÍTULO 3 - Expressão de genes associados com o despencamento natural de frutos de bananeira em diferentes estádios de maturação.	52
3.1 Introdução	53
3.2 Material e Métodos	54
3.3 Resultados e Discussão	62
3.4 Conclusões	69
Referências	70
CONCLUSÃO GERAL	72

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos botânicos e econômicos

A bananeira é uma monocotiledônea nativa do continente asiático, pertencente à família Musaceae. A maioria das espécies cultivadas pertencem à seção *Eumusa*, que consiste de diploides, triploides ou tetraploides originados a partir de híbridos intraespecíficos de *M. acuminata* Colla com genoma A, ou de hibridação interespecífica entre *M. balbisiana* Colla com genoma B e *M. acuminata*. Durante a domesticação e evolução da bananeira, as hibridações produziram combinações variadas de genomas completos das duas espécies parentais, da seguinte forma: diploides (AA, AB e BB); triploides (AAA, AAB e ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB e ABBB) (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955).

A bananicultura se destaca como uma atividade de grande importância econômica e social em todo o mundo, principalmente na região dos trópicos. Considerada como uma das principais fontes alimentares, seu consumo *in natura* supera a maioria das frutas, perdendo apenas para os citros (SOTO, 2011).

No Brasil, o cultivo da bananeira ocorre de norte a sul do País e a maioria dos bananicultores são pequenos agricultores que utilizam essa fruta como fonte de alimento e renda. A região Sudeste é a maior produtora, com 33,7%, seguida das regiões Nordeste (33,4%), Sul (15,6%), Norte (14,1%) e Centro-Oeste (3,2%) (IBGE, 2015).

Apesar da grande produção da banana no Brasil, o seu cultivo é afetado por vários fatores bióticos e abióticos. Estima-se que cerca de 50% do total produzido seja perdido no período pós-colheita (MEDINA et al., 2004), devido a causas microbiológicas (doenças patogênicas), mecânicas (causas físicas) e fisiológicas (desordens ou distúrbios desencadeados por fatores abióticos) (OLORUNDA, 2000). Dentre os fatores bióticos, as sigatokas, negra e amarela e o mal-do-Panamá, são os agentes patogênicos mais importantes (CORDEIRO et al., 2005).

Os danos mecânicos, que também afetam a qualidade da fruta, são transformações plásticas, rupturas superficiais e destruição do tecido vegetal causadas por fatores externos. Há três causas principais de injúrias mecânicas: impacto, compressão e perfurações, que causam ferimentos, amassamentos e cortes (MORETTI, 2001; DADDZIE e ORCHARD, 1997).

Já os distúrbios fisiológicos, se referem a colapsos da planta ou do tecido da fruta, que não são causados por patógenos ou processos mecânicos (DADDZIE e ORCHARD, 1997), bem como por resposta a uma atmosfera adversa, especialmente a temperatura, ou devido à deficiência nutricional durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos (WILLS et al., 1989).

A maioria dos distúrbios fisiológicos afetam áreas distintas de tecido. Alguns podem afetar a casca do fruto, mas podem deixar o tecido subjacente intacto; outros afetam apenas certas áreas da casca ou da região cortical. Os principais distúrbios fisiológicos encontrados na cultura da bananeira são: divisão da casca, injúria por frio e o despencamento dos frutos (DADDZIE e ORCHARD, 1997).

Tendo em vista que o mercado de frutas exige alta qualidade em produtos alimentícios, definida como uma série de características que, de alguma forma, interferem no seu grau de excelência ou superioridade. Os atributos sabor, vida útil e aparência dos frutos, são os mais importantes na escolha ou compra da banana e, conseqüentemente, da variedade a ser consumida (MATSUURA et al., 2004).

Nesse contexto, o despencamento dos frutos se destaca por ser um distúrbio fisiológico que causa muitos problemas pós-colheita, diminuindo o valor de mercado e a aceitação pelos consumidores, uma vez que as bananas são comercializadas em pencas ou buquês, geralmente com 4 a 9 frutos, o que torna o despencamento dos frutos um dos principais parâmetros externos analisados pelo consumidor (SEMPLE e THOMPSON, 1988).

Como consequência da baixa aceitação do produto, ocorre a diminuição do valor de mercado da fruta, acompanhado da rejeição dos agricultores no momento da escolha do plantio de cultivares mais suscetíveis ao despencamento. Assim, essa característica torna-se de grande interesse para o melhoramento, pois limita o lançamento de novas cultivares de bananeira.

Fisiologia e anatomia do despencamento natural

O despencamento, ou a queda natural dos frutos, foi relatado pela primeira vez por Hicks (1934), em bananas triploides do subgrupo Cavendish (AAA). O despencamento precoce dos frutos ocorre devido ao enfraquecimento e amolecimento do pedicelo, que leva ao fácil desprendimento dos frutos da coroa (NEW e MARRIOT, 1983). Trata-se de uma desordem fisiológica associada com o amadurecimento. Em bananas, esta desordem não é ocasionada pela formação de camada de abscisão, como ocorre na maioria dos frutos, e sim

pelo amolecimento e enfraquecimento da casca na área de junção do fruto com a penca (pedicelo), causando precocemente o desprendimento individual dos frutos e ou a ruptura dos mesmos da almofada (MAIA et al., 2004; IMSABAI et al., 2006; IMSABAI e KETSA, 2007, PUTRA et al., 2010). Um exemplo do local onde ocorre o despencamento encontra-se na Figura 1.

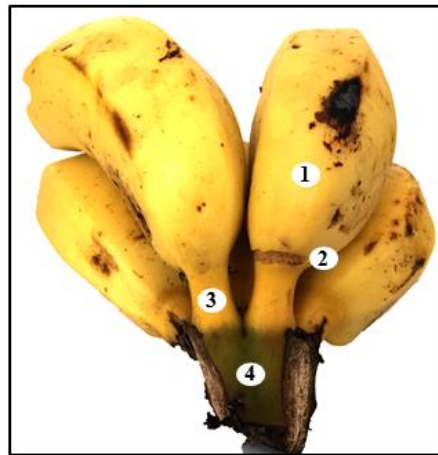


Figura 1. Buquê de banana da cultivar BRS Pioneira demonstrando o local onde ocorre o despencamento. 1) fruto; 2) região onde ocorre o despencamento; 3) pedicelo e 4) almofada.

Durante o amadurecimento de cultivares suscetíveis ao despencamento, quando iniciada a ruptura dos frutos, é observada uma diminuição da espessura do pedicelo, evidenciando a ação de enzimas de degradação dos componentes da parede celular (MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ et al., 2009, IMSABAI e KETSA, 2007). Infere-se que essas alterações sejam consequência das modificações dos polissacarídeos da parede celular, principalmente da pectina e da hemicelulose (MANRIQUE e LAJOLO, 2002).

A banana é um fruto climatérico e seu amadurecimento é caracterizado pelo aumento da produção de etileno e do processo respiratório, juntamente com mudanças físico-químicas e bioquímicas, incluindo a degradação da clorofila (mudança da coloração da casca de verde para amarelo), o aumento da degradação do amido, a síntese de açúcares e o eventual amolecimento dos frutos (MATSUURA e FOLEGATTI, 2001; CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Em frutos maduros de banana, o amolecimento da polpa tem sido associado à atividade de enzimas como poligalacturonase (PG) a pectinametilesterase (PME) (WADE et al., 1992) e a pectato liase (PL) (LOHANI et al., 2004). Em estudos envolvendo o despencamento de frutos de bananas, foram evidenciadas a presença dessas mesmas

hidrolases responsáveis pela degradação da pectina na zona de ruptura na casca (IMSABAI et al., 2006; SAENGPPOOK et al., 2007).

Em estudos conduzidos com a cultivar ‘Hom Thong’ (*Musa acuminata* AAA), foi detectada uma correlação positiva entre a atividade da enzima pectato liase (PL) na casca e a ruptura da mesma, não havendo diferença na concentração das enzimas poligalacturonase (PG) e pectinametilsterase (PME) com relação a cultivar resistente “Kluai Namwa” (IMSABAI et al., 2006). Em estudos posteriores com as mesmas cultivares, foi observado o aumento do despencamento na cultivar suscetível ao longo do processo de maturação, sendo verificado um aumento no conteúdo de pectinas solúveis e da atividade da enzima poligalacturonase (PG) (IMSABAI e KETSA, 2007).

Saengpook et al. (2007) evidenciaram o envolvimento das enzimas PME e PL na hidrólise da pectina, quando o aumento da PL coincidiu exatamente com o início do despencamento dos frutos, sendo acompanhado de uma ação mais tardia da PME.

Observações da estrutura celular da casca da banana possibilitam o estudo das mudanças na textura e firmeza que ocorrem durante o amadurecimento e o despencamento. A anatomia vegetal tem sido adotada como ferramenta para o entendimento biológico de diversas espécies, entre elas a bananeira. Estudos anatômicos de *Musa* são encontrados na literatura na caracterização de cultivares (SUMARDI et al., 2010); entendimento fisiológico durante o crescimento e amadurecimento do fruto (KHENG et al., 2011); (AMNUAYSIN et al., 2012); estudo de microestruturas (KYAMUHANGIRE et al., 2006; RATULE, et al., 2006) e modificações anatômicas de plantas micropropagadas (COSTA et al., 2009).

Quanto ao despencamento, estudos anatômicos têm fornecido dados importantes sobre diferenças das estruturas do corpo da planta (pedicelo) em genótipos resistentes e suscetíveis. Pereira (2002) evidenciou degeneração do tecido parenquimático na região do pedicelo em frutos maduros de banana, com grandes espaços vazios sendo formados nessa região, favorecendo o despencamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Putra et al. (2010). Segundo esses autores, o despencamento em cultivares suscetíveis foi aparentemente causado pela degeneração da parede celular na região onde ocorre o despencamento. Maia et al. (2004) constataram que o aumento da resistência ao despencamento dos frutos no híbrido ‘SH 3640’ foi devido ao aumento da espessura e da maior deposição de lignina nas paredes das fibras perivasculares.

Dessa forma, estudos anatômicos podem contribuir para a compreensão das diferenças existentes nos tecidos celulares da zona de despencamento em genótipos resistentes e suscetíveis.

Métodos utilizados para avaliar o despencamento natural

Os métodos utilizados para avaliar o despencamento são, na maioria das vezes, imprecisos, podendo apresentar resultados um pouco diferentes a depender do avaliador. Deddzie e Orchard (1997) utilizaram o método que consiste em sacudir manualmente os buquês por 3 a 5 segundos e contar os frutos caídos. Por outro lado, o método adotado por Imsabai et al. (2006), para mensurar a porcentagem de despencamento, consistiu em manter a penca 5 cm acima de uma superfície por 10s, sendo os frutos que se desprenderem da coroa, contados e registrados como a porcentagem do total de frutos da penca.

Visando a uma maior confiabilidade dos dados, Cerqueira et al. (2000) utilizaram o “despencador mecanizado”, instrumento desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, para avaliar a resistência ao despencamento do fruto.

O “despencador mecanizado” é composto por um penetrômetro (utilizado para medir a força necessária para romper o pedicelo do fruto da banana) acoplado a um chassi de madeira. O fruto é preso pelo pedicelo com o auxílio de um grampo e submetido a um tracionador de metal preso por um cabo ao motor. Trabalhos que utilizaram esse equipamento para medidas de despencamento em frutos de bananeira são encontrados na literatura (PEREIRA et al., 2004; CERQUEIRA et al., 2000, JESUS et al., 2002) (Figura 2).

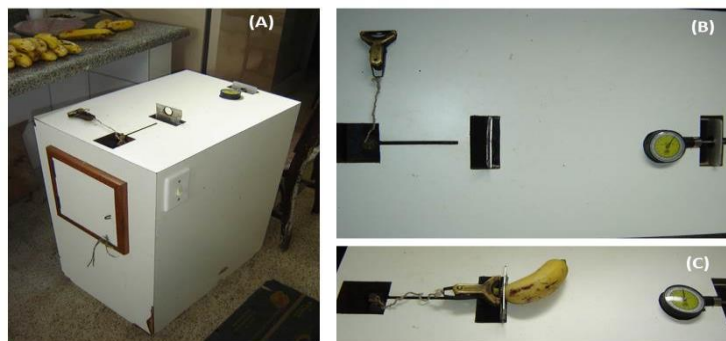


Figura 2. Despencador mecanizado. (A) Vista geral do aparelho, (B) penetrômetro e grampo, (C) fruto preso que será submetido ao tracionador de metal. Laboratório de Práticas Culturais, Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Cerqueira et al. (2000) compararam diferentes métodos de avaliação de resistência ao desprendimento natural dos frutos, sendo que o método do “despencador mecanizado” apresentou coeficiente de variação de 15,64%, enquanto o valor do método de sacudir a

penca foi de 68,80%, o que demonstra uma maior confiabilidade dos dados apresentados pelo uso do “despencador mecanizado”.

Fatores que afetam o despencamento

Dentre os fatores que afetam o despencamento, podemos citar práticas pós-colheita e causas genéticas. Alguns trabalhos relatam que durante o amadurecimento dos frutos após sua colheita, a umidade relativa, a temperatura e a concentração de etileno, às quais os frutos serão submetidos, afetam o processo de despencamento.

Paul (1996) constatou que a aplicação de etileno durante 24 horas a 25°C, e após o amadurecimento em baixas temperaturas, reduziu o despencamento em bananas. Com relação à umidade relativa (UR), cultivares suscetíveis (*Musa acuminata*, AAA) ao despencamento, submetidas a um período de maturação com baixa UR (armazenadas com temperatura 25°C e 85 a 90% de UR; e após atingirem coloração grau 3 – 4 armazenadas em baixa UR), tiveram a incidência de despencamento dos frutos reduzida ao longo dos dias de maturação (SAENGPOOK et al., 2007). Cabe ressaltar que o grau de maturação dos frutos também influencia o despencamento, pois quanto mais maduras as pencas, maior a suscetibilidade ao desprendimento dos frutos (PAULL, 1996).

A aplicação de cálcio é uma prática pós-colheita muito utilizada em frutos para aumentar a firmeza e o tempo de prateleira em diversas espécies (WERNER et al., 2009, SILVA et al., 2008, BOTELHO et al., 2002). Os íons cálcio se ligam à pectina da parede celular e à lamela média, formando pontes de cálcio entre os ácidos pécticos ou entre estes e outros polissacarídeos. Essas pontes interferem na ativação das enzimas produzidas pelo fruto que causam o amolecimento ou amaciamento (ESGUERRA et al., 2009).

Fatores Genéticos

A ocorrência do despencamento pode também estar relacionada à ploidia e ao tipo de genoma (IMSABAI e KETSA, 2007). O nível de resistência ao despencamento varia entre os grupos genômicos A e B, os quais pertencem às espécies diploides *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, respectivamente. De acordo com Pereira et al. (2004), a presença do genoma B confere maior resistência ao despencamento dos frutos, sendo um indicativo de que os alelos de resistência ao referido caráter podem estar associados à espécie *Musa balbisiana*.

A suscetibilidade ao despencamento já foi relatada em diploides do genoma A (PEREIRA et al., 2004), triploides (SEMPLE e THOMPSON, 1988) e em tetraploides (NEW e MARRIOT, 1983). No entanto, há variabilidade entre os níveis de resistência para todas as ploidias, sendo que os tetraploides são mais propensos ao despencamento dos frutos quando comparados aos triploides e diploides (PEREIRA et al., 2004).

Vários híbridos lançados nos últimos anos pela *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola* (FHIA), como FHIA-01, FHIA-02 e FHIA-18, com alta resistência à Sigatoka-negra e boas características agronômicas, apresentam também alta suscetibilidade ao despencamento (HOLDERNESS et al., 2000). Outro exemplo são as cultivares tetraploides com genoma AAAB (Ouro da Mata e BRS Pioneira), que, embora apresentem boas características agronômicas como resistência à Sigatoka-amarela e frutos com excelente sabor e aroma, também possuem problemas de despencamento dos frutos, o que inviabiliza a sua comercialização (DANTAS et al., 1994).

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. 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 microssatélites ou sequências simples repetidas (SSRs) são trechos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem dentro dos genomas dos organismos procariontes e eucariontes. Por serem altamente informativos, codominantes, polimórficos e multialélicos, são bastante utilizados para estudar a variabilidade genética em diversas culturas, inclusive, em bananeira (CRESTE et al., 2004; AMORIM et al., 2008; 2009; JESUS et al., 2013).

Além dos marcadores SSRs, os do tipo ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*), que amplificam uma sequência de DNA delimitada por duas regiões microssatélites invertidas (ZIETKIEWICZ et al., 1994), também possuem potencial para estudos de diversidade genética em *Musa* (RACHARAK e EIADTHONG, 2007; VENKATACHALAM et al., 2008; LU et al., 2011). Tais marcadores são dominantes e altamente reprodutíveis, com a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo amplamente distribuídos ao longo do genoma de eucariontes (GUPTA et al., 1994). No entanto, estudos visando estimar a variabilidade entre genótipos de *Musa* spp. com diferentes padrões de resistência ao despencamento, ainda são inexistentes na literatura.

Expressão gênica em bananeira e a técnica RT-qPCR

A análise de expressão gênica constitui uma importante ferramenta no entendimento dos processos biológicos e da atuação dos genes nas principais vias metabólicas. O método quantitativo de PCR em tempo real (RT-qPCR), técnica capaz de avaliar o número de moléculas produzidas a cada ciclo, tornou-se o preferido para estudos de expressão gênica devido à sua rapidez, sensibilidade e especificidade (GACHON et al., 2004).

A técnica utiliza a emissão de fluorescência na detecção de produtos de amplificação em tempo real. O fluoróforo utilizado pode ser altamente específico como o baseado em sondas ligadas ao primer (TaqMan), ou se ligar inespecificamente a qualquer fita dupla presente na reação (Sybr Green) (MORRISON et al., 1998).

A amplificação da sequência alvo ocorre em três fases: i) linha basal: os produtos de PCR amplificados não são suficientes para o equipamento detectar fluorescência; ii) fase log: os produtos de PCR dobram e à medida que se acumulam, o sinal aumenta exponencialmente e iii) fase platô, onde não há mais aumento no número de produtos amplificados.

O PCR em tempo real pode ser utilizado para diversas aplicações. Em bananeira, por exemplo, vários trabalhos sobre a expressão gênica na interação planta x patógeno são relatados na literatura (PORTAL et al., 2011; LI et al., 2011; CHEN et al., 2012; MAHDAVI et al., 2012).

Trabalhos que visam a quantificar a expressão de genes relacionados com o amadurecimento e despencamento natural dos frutos foram relatados inicialmente por Mbéguie-A- Mbéguie et al. (2009). No referido trabalho, os autores estudaram a expressão de vários genes relacionados com a degradação da parede celular durante a maturação dos frutos de bananeiras triploides do subgrupo Cavendish (cultivar Grande Naine), em duas regiões distintas: área média (zona de controle) e área da região do pedicelo, onde ocorre o despencamento (zona de despencamento) (Figura 3).

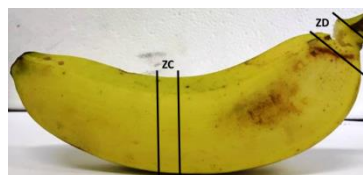


Figura 3. Zona de controle - ZC (região mediana da casca) e zona de despencamento – ZD (região onde ocorre o desprendimento do pedicelo).

De acordo com os autores, os dados da expressão gênica obtidos para todos os genes analisados sugerem que tanto o despencamento, quanto o amadurecimento dos frutos, envolvem mecanismos similares e são mais expressos na região do pedicelo onde ocorre o despencamento. A expressão da maioria dos genes modificadores da parede celular ocorre especificamente na zona de despencamento e envolve a maioria dos componentes da parede celular, incluindo xiloglucanos e pectinas, e também propriedades físicas, nomeadas afrouxamento da parede celular que são mediadas por expansinas.

Hubert e Mbéguie-A-Mbéguie (2012) investigaram a relação entre a biossíntese de etileno durante o amadurecimento e o despencamento. Foi observada expressão diferencial dos genes envolvidos na biossíntese do etileno na zona de controle (ZC) e na zona de despencamento (ZD). Os autores sugeriram que a biossíntese de etileno durante o amadurecimento é um potencial regulador no processo do despencamento; no entanto, sugerem que essa hipótese precisa ser validada com a mensuração da produção de etileno na ZD.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: (1) estudar a diversidade genética de genótipos contrastantes para o despencamento via marcadores microssatélites e avaliar a possibilidade de associação de bandas ISSRs com a característica de interesse via metodologias não paramétricas; (2) caracterizar anatomicamente genótipos com diferentes padrões de resistência ao despencamento dos frutos; (3) analisar, por meio de RT-qPCR, a expressão de genes envolvidos nos processos de maturação e despencamento dos frutos.

REFERÊNCIAS

- AMNUAYSIN, N.; SERAYPHEAP, K e KIDYOO, M. Anatomical Changes in Peel tructure of ‘Hom Thong’ Banana during Fruit Development and Ripening. **Tropical Natural History**, v. 12, n.2, p. 127-136, 2012.
- AMORIM, E. P.; REIS, R.V.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S.O. Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n. 8, p.1045-1052, 2008.
- AMORIM, E.P.; LESSA, L.S.; LEDO, C.A.S. et al. Caracterização agrônômica e molecular de genótipos diploides melhorados de bananeira **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 154-161, 2009.
- BOTELHO, R.V.; SOUZA, N.L.; PERES, N. A. R. Qualidade pós-colheita de goiabas 'Branca de Kumagai', tratadas com cloreto de cálcio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p. 063-067, 2002.
- CERQUEIRA, R. C. **Avaliação de características pós-colheita de genótipos de bananeira (*Musa spp.*)**. 2000. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Bahia, UFBA, Cruz das Almas, 2000.
- CERQUEIRA, R. C. SILVA, S de O.; MEDINA, V. M. Avaliação da resistência à queda de frutos de bananeira (*Musa spp.*) por diferentes métodos. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento de Fruteiras, 2000, Viçosa. Resumos...Viçosa:SBF, p.137, 2000.
- CHEN, J.; CHEN, J.Y.; WANG, J.N.; KUANG, J.F.; SHAN, W.; LU, W.J. Molecular characterization and expression profiles of MaCOL1, a CONSTANS-like gene in banana fruit. **Gene**, v.496, n.2, p. 110-117, 2012.
- CHITARRA, M. I. F. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras:UFLA, 2005. 785p.
- CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. DOENÇAS DA BANANEIRA. IN: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; (Ed.). **Manual de fitopatologia**, v. 2, p. 99-117, 2005.
- COSTA, F. H. S.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S e OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciencia Rural**. v.39, n.2, p. 386-392, 2009.
- CRESTE, S.; TULMAN NETO, A.; SILVA, S.O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa spp.*) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 132, n. 3, p. 259–268, 2003.
- DADDZIE, B. K.; ORCHARD, J. E. **Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos**. IPGRI: Roma, INIBAP: Montpellier, 1997. 63p. (Guias técnicas Inibap, 2).

DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J.; FÉLIX, A. I. L. **Banana Pioneira**. Cruz das Almas: CNPMF – EMBRAPA, 1994. 2 p.

ESGUERRA, E. B.; HILARIO, D. C. R.; ABSULIO, W. L. Control of finger drop in ‘Latundan’ banana (*Musa acuminata* AA group) with postharvest calcium spray. **Acta Horticulturae**, v. 837, p. 167-170. 2009.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMEO-SEVERSON J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, n.7, p. 998 - 1006, 1994.

HICKS, E. W. Finger dropping from bunches of Australian Cavendish Bananas. **Journal of Council Science Ind. Research.**, v.7, p.165-168, 1934.

HOLDERNESS, M.; SHARROCK, S.; FRISON, E.; KAIRO, M. **Organic banana 2000: Towards an organic banana initiative in the Caribbean. Report of the International workshop on the production and marketing of organic bananas by smallholder farmers**. Montpellier: INIBAP, 2000. 174 p.

HUBERT, O.; MBÉGUIE´-A-MBÉGUIE, D. Expression patterns of ethylene biosynthesis genes from bananas during fruit ripening and in relationship with finger drop. **AoB PLANTS**, v.41, p. 1-10, 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA, Levantamento sistemático da Produção Agrícola. 2015. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201212.pdf >. Acesso em 09 de agosto de 2015.

IMSABAI, W e KETSA, S. The structure and biochemical changes during finger drop in ripening bananas. **Thai Journal of Agricultura Science**, v. 40, n. 3-4, p. 127-132, 2007.

IMSABAI, W.; SAICHOL, K.; DOORN, W. Physiological and biochemical changes during banana ripening and finger drop. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, n.2, p. 211-216, 2006.

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

JESUS, O. N. de.; SILVA, S. de O. I.; AMORM, E. P.; Ferreira, C. F.; CAMPOS, J. M. S. de.; SILVA, G. de G.; e FIGUEIRA, F. Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in *ex situ* conservation. **Plant Biology**, v. 13, n. 41, p. 1-22, 2013.

JESUS, O. N.; SILVA, S. de O.; CREDICO, M. D. I.; ROCHA, H. S. Resistência a la caída de los dedos de los genótipos diploides. **Infomusa**, v. 11, n. 2, p.22-24, 2002.

KHENG, T. Y.; DINGA, P.; RAHMANB, N. A. A. Physical and cellular structure changes of Rastali banana (*Musa AAB*) during growth and development. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n.3, p. 382–389, 2011.

KYAMUHANGIRE, W.; KREKLING, T.; REED, E.; PEHRSON, R. The microstructure and tannin content of banana fruit and their likely influence on juice extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 12, p. 908–1915, 2006.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, n.21, p.97-108, 2000.

LI, C.Y.; DENG, G. M.; YANG, J.; VILJOEN, A.; JIN, Y.; KUANG, R. B.; ZUO, C. W.; LV, Z. C.; YANG, Q. S.; SHENG, O.; WEI, Y. R.; HU, C. H.; DONG, T.; YI, G.J. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. **BioMed Central Genomics**, v.13, n. 374, p. 1471-2164, 2012.

LOHANI, S.; TRIVEDI, P. K.; NATH, P. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana. Effect of 1-MCP, ABA and IAA. **Postharvest Biology Technology**, v. 31, n.2, p. 119 - 126, 2004.

LU, Y.; ZHANG, X.; PU, J.; QI, Y.; XIE, Y. Molecular assessment of genetic identity and genetic stability in banana cultivars (*Musa* spp.) from China using ISSR markers. **Australian Journal of Crop Science**. v.5, n.1, p. 25-31, 2011.

MAHDAVI, F.; SARIAH, M.; MAZIAH, M. Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to fusarium wilt. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 4, p.1008-1019, 2012.

MAIA, V. M.; ALEXANDRE, R. S.; SALOMÃO, L. C. C.; SILVA, E. A. M. da. MEIRA, R. M. S. A. Efeitos das condições de amadurecimento sobre a suscetibilidade de bananas ‘SH 3640’ ao despençamento natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 351-353, 2004.

MANRIQUE, G. D. & LAJOLO F. M. FT-IR Spectroscopy as a Tool for Measuring Degree of Methyl Esterification in Pectins Isolated from Ripening Papaya Fruit. **Postharvest Biology and Technology** **Postharvest Biology and Tecnology**, v 25, n. 1, p. 99 - 107, 2002.

MARRIOTT, J. Bananas: physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 41-88, 1980.

MATSUURA, F. C. A U a.; FOLEGATTI, M. I. da S. **Banana: pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2001. Frutas do Brasil.

MATSUURA, F. C. A U.; COSTA, J. I. P da.; FOLEGATTI, M. I. da S. MARKETING DE BANANA: PREFERÊNCIAS DO CONSUMIDOR QUANTO AOS ATRIBUTOS DE QUALIDADE DOS FRUTOS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 48-52, 2004.

MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; HUBERT, O.; BAURENS, F. C.; MATSUMOTO, T.; CHILLET, M.; FILS-LYCAON, B.; SIDIBÉ-BOCS, S. Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 7, p.2021 - 2034, 2009.

MEDINA, V. M.; PEREIRA, M. E. C. Pós-colheita. In: BORGES, A. L. & SOUZA, L. S. da. (Editores). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 2004. Cap. XII, 585p.

MORETTI, C. L. Danos mecânicos. In: MATSUURA, F. C. A. U. FOLEGATTI, M. I. S. (Ed. Tec.) **Banana. Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2001. p. 23-31 (Frutas do Brasil, 16).

MORRISON, T.B.; WEIS, J.J.; WITTEWER, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v.24, n.6. p. 954-958, 1998.

NEW, S.; MARRIOT, J. Factores affecting the development of ‘fingerdrop’ in bananas after ripening. **Internacional Journal of Food Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 241-250, 1983.

OLORUNDA, A. O. Recent advances in postharvest Technologies of banana and plantain in Africa. **Acta Horticulturae**, n.540, p.517-597, 2000.

PAULL, R. E. Ethylene, storage and ripening temperatures affect Dwarf Brazilian banana finger drop. **Postharvest Biology and Tecnology**, v. 8, n.1, p. 65-74, 1996.

PEREIRA, M. C. T. **Caracterização, anatomia do pedicelo, fisiologia e redução do despencamento natural de bananas após a colheita. 2002.** 80f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2002.

PEREIRA, M.C.T.; SALOMÃO, L.C.C.; SILVA, S.O.; CECON, P.R.; PUSCHMANN, R.; JESUS, O.N.; CERQUEIRA, R.C.C. Suscetibilidade à queda natural e caracterização dos frutos de diversos genótipos de bananeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 499-502, 2004.

PORTAL, O.; IZQUIERDO, Y.; VLEESSCHAUWER, D. DE; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; MENDOZA- RODRÍGUEZ, M.; ACOSTA-SUÁREZ, M.; OCAÑA, B; JIMÉNEZ, E.; HOFTE, M. Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*- banana interaction. **Plant Cell Report**, v.30, n.5, p.913-928, 2011.

PUTRA, E.T.S.; ZACARIA, W.; ABDULLAH, N.A.P.; SALEH, G. Cell ultrastructure and peel nutrient content of neck zone in six cultivars of *Musa sp* fruit during ripening. **International Journal of Botany**, v.6, n.1, p. 47 - 52, 2010.

RACHARAK, P e EIADTHONG, W. Genetic relationship among subspecies of *Musa acuminata* Colla and A-genome consisting edible cultivated bananas assayed with ISSR markers. **Songklanakar Journal Science Technology**, v. 29, n 6, p. 1479-1489, 2007.

RATULE, M.T.; OSMAN, A.; SAARI, N.; AHMAD, S. H. Microstructure of peel cell wall and selected physico-chemical characteristics of ‘Berangan’ banana (*Musa cv. Berangan*

[AAA]) ripened at high temperature. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 15, n.1, p. 8-13, 2007.

SAENGPPOOK, C.; KETSA, S.; DOORN van, W. G. Effects of relative humidity on banana fruit drop. **Postharvest Biology and Tecnology**, v. 45, n. 1, p. 151-154, 2007.

SEMPLE, A. J.; THOMPSON, A. K. Influence of the ripening environment on the development of finger drop in bananas. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 46, n.2, p. 139-146, 1988.

SILVA, D. J.; CHOUDHURY, M. M.; DANTAS, B. F. Efeito da aplicação pré-colheita de cálcio na qualidade e teor de nutrientes de manga 'Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, 74 – 78, 2008.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The journal of the Linean Society of London**, v. 55, n. 359, p. 302-12, 1955.

SOTO, M. Situación y avances tecnologicos en la producción bananera mundial. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.33, n.spe., p.13-28, 2011.

SUMARDI, I e WULANDARI, M. Anatomy and morphology character of five Indonesian banana cultivars (*Musa* spp.) of different ploidy level. **Biodiveristas**, v.11, n. 4, p. 167-175, 2010.

VENTAKATACHALAM, L.; SREDHAR, R. V e BHAGYALAKSHIMI, N. The use of genetic markers for detecning DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. **Molecular Phylogenetics Evoluton**. v.47, n.3, p. 974-985, 2008.

WADE, N. L.; KAVANGH, E. E.; HOCKLEY, D. G.; BRADY, C. J. Relationship between softening and the polyuronides in ripening banana fruit. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.60, n.1, p.61-68, 1992.

WAKABAYASHI, K.; HOSON, T e HUBER, D. J. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: A comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. **Journal Plant Physiology**, v, 160, n. 6, p. 667 - 673, 2003.

WERNER, E. T. W.; OLIVEIRA J. L. F. G.; BONA, A. P. de; CAVATI, B.; GOMES, T. D. U. H. Efeito do cloreto de cálcio na pós-colheita de goiaba Cortibel. **Bragantia**, v.68, n.2,p 511 - 518, 2009.

WILLS, R. B. H.; MCGLASSON, W. B.; GRAHAM, D.; LEE, T. H.; HALL, E. G. **Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables**. Hong Kong: South China Printing Company. 1989. 174 p.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, n.2, p.176-183, 1994.

CAPÍTULO 1

Variabilidade genética entre diploides de bananeira quanto ao despencamento natural dos frutos.

Resumo - O despencamento natural dos frutos é uma desordem fisiológica associada com o amadurecimento em bananas que ocorre devido ao amolecimento e enfraquecimento do pedicelo. O objetivo deste trabalho foi estimar a variabilidade genética entre quinze genótipos diploides de bananeira com diferentes padrões de resistência ao despencamento. A genotipagem dos dados gerados pelos microssatélites foi realizada com base no número de pares de base de cada fragmento e para o agrupamento no dendrograma, utilizou-se o método UPGMA. Dos 30 iniciadores microssatélites avaliados, obteve-se 139 alelos, com média de 4,66 alelos por loco. Para avaliação de associação de bandas com característica de interesse, o perfil eletroforético das bandas ISSRs, juntamente com o resultado da análise para a variável RD (Resistência ao Despencamento), foram submetidos à correlação de Spearman e ao teste de Kruskal Wallis. A maior correlação significativa identificada para variável RD foi a marca ISSR50, com correlação negativa de -0,78, seguido pelas marcas ISSR11D, ISSR71A, ISSR34E, ISSR71D, ISSR34H, ISSR12B, ISSR2A, ISSR56A, ISSR56B as quais obtiveram correlação positiva. Essas marcas mostram-se mais promissoras, pois estão relacionadas a maiores valores de RD, ou seja, genótipos resistentes. Esses dados demonstram haver potencial para futuro sequenciamento das bandas, validação e posterior possibilidade de uso dessas marcas na seleção assistida por marcadores no programa de melhoramento da bananeira.

Palavras-chave: *Musa* spp., microssatélites, ISSR e testes não paramétricos.

Genetic variability among banana diploids how to finger drop fruit.

Abstract – The finger drop fruit is a physiological disorder associated with the ripening of bananas that occurs due to softening and weakening of the pedicel. The aim of this study was to estimate the genetic variability among fifteen banana diploid genotypes with different patterns of finger drop resistance. The genotyping data generated by SSRs was carried out based on the number of base pairs of each fragment and dendrogram clusters calculated by UPGMA method. Of the 30 microsatellite primers evaluated, 139 alleles were obtained, with an average of 4.66 alleles per locus. For the evaluation of bands associated to the trait of interest, the electrophoretic profile of the ISSR bands together with the analysis of FR (Finger Drop Resistance), were submitted to the Spearman correlation and the Kruskal Wallis test. The highest significant correlation was for the band ISSR50, with a negative correlation of -0.78, followed by the marks ISSR11D, ISSR71A, ISSR34E, ISSR71D, ISSR34H, ISSR12B, ISSR2A, ISSR56A, ISSR56B which positive correlation. These marks shown to be most promising, because they are related to higher values RD, ie, resistant genotypes. These data show potential for future sequencing of bands, validation and further possibility of use of the bands in marker assisted selection in the banana breeding program (BBP).

Key words: *Musa* spp., microsatelites, ISSR and nonparametric tests.

1.1 Introdução

A bananeira é considerada uma das mais importantes fruteiras, com relevante papel socioeconômico. O Brasil é o quinto produtor mundial, com uma produção de 6,9 milhões de toneladas em 2012, em uma área aproximada de 481 mil hectares (FAO, 2014).

Entre os problemas que impedem a comercialização e causam perdas pós-colheita substanciais, está o despencamento natural dos frutos; uma desordem fisiológica associada com o amadurecimento que, em bananas, está associada ao amolecimento e enfraquecimento da casca na área de junção do fruto com a penca, chamada de pedicelo (New e Marriot, 1983).

As bananas são comercializadas em buquês que variam de 4 a 9 frutos ou em pencas inteiras. Por essa razão, o destacamento de frutos individuais na área do pedicelo em variedades susceptíveis é uma das principais causas da diminuição do valor de mercado e da aceitação pelos consumidores, gerando impacto econômico significativo para os produtores.

As bananeiras e os plátanos surgiram por meio de cruzamentos intra- e interespecíficos de duas espécies diploides do gênero *Musa*; *Musa acuminata* Colla, com genoma A e *Musa balbisiana* Colla, com genoma B. Durante a domesticação da espécie, as hibridações produziram combinações variadas de genomas completos das duas espécies parentais da seguinte forma: diploides (AA, AB e BB); triploides (AAA, AAB e ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB e ABBB) (Simmonds e Shepherd, 1955).

A suscetibilidade ao despencamento natural dos frutos varia entre as cultivares, tendo sido observada pela primeira vez em triploides do subgrupo Cavendish, com genoma AAA (Hicks, 1934) e principalmente em tetraploides (Marriot, 1980). Entretanto, vários estudos sugerem que além da ploidia, o tipo de genoma também influencia na suscetibilidade. As bananeiras que possuem o genoma B são menos propensas ao despencamento dos frutos em comparação às bananeiras com genoma A (Imsabai e Ketsa, 2007).

Essa constatação indica que os alelos de resistência ao despencamento podem estar associados à espécie *M. balbisiana*. Estudos realizados por Pereira et al. (2004) confirmaram que os diploides de *Musa balbisiana* (BB) e os triploides com parte do genoma dessa espécie (ABB e AAB) apresentaram maior resistência ao despencamento quando comparados aos diploides e triploides de *M. acuminata* (AA e AAA), bem como os tetraploides desse grupo.

Uma das estratégias para reduzir o problema associado com o despencamento dos frutos envolve o desenvolvimento de cultivares a partir da seleção de parentais com boa capacidade de combinação e resistência ao despencamento. O uso de técnicas moleculares tem possibilitado a obtenção de genótipos via seleção indireta com resistência a pragas e

doenças por meio da associação de bandas ou alelos e genes de interesse via métodos não paramétricos (Mace et al., 2006; Singh et al., 2013)

Marcadores microssatélites foram amplamente utilizados nos últimos anos para avaliar a diversidade genética em genótipos diploides de *Musa spp.* (Creste et al., 2003; Amorim et al., 2008; Amorim et al., 2009). Os microssatélites ou sequências simples repetidas (SSRs) são trechos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem dentro dos genomas dos organismos procariontes e eucariontes. As regiões flanqueadoras, que geralmente são altamente conservadas, são adequadas para o desenvolvimento de iniciadores loco-específicos (Iniguez-Luy et al., 2008).

Além dos marcadores SSRs, os do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), que amplificam uma sequência de DNA delimitada por duas regiões microssatélites invertidas (Zietkiewicz et al., 1994), também possuem potencial para estudos de diversidade genética em *Musa* (Racharak e Eiadthong, 2007; Venkatachalam et al., 2008; Lu et al., 2011). Tais marcadores são dominantes e altamente reprodutíveis, com a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo amplamente distribuídos ao longo do genoma de eucariontes (Gupta et al., 1994).

O objetivo deste trabalho foi estimar a variabilidade genética entre quinze genótipos diploides de bananeira com diferentes padrões de resistência ao despencamento dos frutos utilizando marcadores SSR e ISSR e avaliar a possibilidade de associação de bandas ISSRs com a característica de interesse via metodologias não paramétricas.

1.2 Material e Métodos

Material genético

Os genótipos avaliados foram diploides cultivados, selvagens e melhorados com diferentes níveis de resistência ao despencamento pertencentes ao banco de germoplasma de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA (Tabela1).

Tabela 1. Genótipos de bananeira indicando o grupo genômico (GG), genealogia, origem geográfica e resistência ao despencamento (RD).

Nome	GG	Genealogia	Origem	RD ⁴
BB França	BB	Diploide selvagem ¹	França	Resistente
Butuhan	BB	Diploide selvagem	Filipinas	Resistente
028003-01	AA	Diploide melhorado ²	Honduras	Resistente
Khai Nai On	AA	Diploide cultivado ³	Tailândia	Resistente
Híbrido AB	AB	Diploide melhorado	Bahia	Medianamente
Ouro	AA	Diploide cultivado	Brasil	Medianamente
Tjau Lagada	AA	Diploide cultivado	Costa Rica	Medianamente
TH0301	AA	Diploide melhorado	Bahia	Medianamente
Jary Buaya	AA	Diploide cultivado	Honduras	Medianamente
Jaran	AA	Diploide melhorado	Indonésia	Medianamente
Lidi	AA	Diploide cultivado	Costa Rica	Suscetível
M53	AA	Diploide melhorado	Equador	Suscetível
Calcutta 4	AA	Diploide selvagem	Jamaica	Suscetível
013004-04	AA	Diploide melhorado	Bahia	Suscetível
017041-01	AA	Diploide melhorado	Bahia	Suscetível

¹genótipo que produz frutos com sementes; ²genótipo obtido por meio de cruzamentos a partir de diploides selvagens; ³genótipos que produzem frutos sem sementes por meio da partenocarpia; ⁴Pereira et al. (2004).

Extração de DNA e amplificação via PCR

Primers SSR

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens com uso do método CTAB (Doyle & Doyle, 1990). Trinta *primers* microssatélites (SSR) foram utilizados para caracterização molecular, sendo quatro da série Ma (Crouch et al., 1998), cinco da série AGMI desenvolvidos por Lagoda et al. (1998), três da série MaOCEN (Creste et al., 2006), dez da série CNPMF (Amorim et al., 2012), e oito da série MASR (dados não publicados).

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 15 µl, contendo os seguintes reagentes: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (PH 8,3), MgCl₂ 2,5 mM, 100 mM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP, dCTP), 0,2 mM de cada *primer*, 20 ng de DNA genômico e uma unidade de Taq DNA polimerase (Pharmacia Biotech, EUA).

As amplificações foram conduzidas em termociclador Applied Bisystems, utilizando-se temperatura de anelamento (Ta) específica para cada *primer*. As condições de amplificação incluíram um ciclo de desnaturação de 3 min. a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação de 40 s a 94 °C, 40 s de anelamento com a temperatura específica de cada *primer*, 1 min de extensão a 72 °C, finalizando com uma extensão final de 4 min a 72 °C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose ultrapura-1000 (Invitrogen, Carlsbad, CA,

EUA) a 4 %, sob condições padrão, coradas com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e foto-documentados utilizando o equipamento UVITEC.

Primers ISSR

Foram utilizados um total de 10 primers ISSR (Tabela 2). As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 15 µl, contendo os seguintes reagentes: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (PH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, 100 µM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP, dCTP), 0,4 µM de cada *primer*, 20 ng de DNA genômico e uma Unidade de Taq DNA polimerase (Pharmacia Biotech, EUA).

As amplificações foram conduzidas em termociclador Perkin Elmer modelo 9700 e constaram de uma etapa a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos com 94 °C por 40 s, temperatura de anelamento de 48 °C por 40s, 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 2 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0 %.

Tabela 2. *Primers* ISSR utilizados nesse estudo e suas respectivas sequências e número total de bandas obtidas.

Primer	Sequência (5'-3')	Nº total de bandas
DiCA3'G	CACACACACACACAG	7
DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAC	11
DiGA3'RC	GAGAGAGAGAGAGARC	5
TriCAG3'RC	CAGCAGCAGCAGCAGRC	9
TriTGT5'CR	CRTGTTGTTGTTGTTGT	5
TriAAT 3'RC	AATAATAATAAATRC	5
TriAAG 3'RC	AAGAAGAAGAAGRC	5
TriACA 3'RC	ACAACAACAACARC	5
TriACT 3'RC	ACTACTACTACTRC	6
TriTCT 3'RC	TCTTCTTCTTCTRC	5

Análise dos dados

A genotipagem dos dados gerados pelos marcadores SSR foi realizada com base no número de pares de base de cada fragmento. A estimativa do tamanho em pares de bases (pb) para cada alelo foi obtida pelo método da mobilidade inversa, baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido do marcador molecular de 50 pb da Fermentas (EUA) aplicado em um poço extra do gel.

A distância genética entre todos os 15 genótipos foi calculada a partir do coeficiente de Nei e Li (1973), que gera uma matriz de distâncias utilizando-se o software GENES (Cruz et al., 2006).

A matriz de distância foi calculada utilizando-se o índice de Nei e Li (1973). Os agrupamentos foram gerados a partir do método do UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method of Arithmetic Mean*) utilizando o programa GENES (Cruz et al., 2006), o dendrograma construído utilizando-se o software STATISTICA (Statistica, 2002) e o ponto de corte seguiu os critérios sugeridos por Mingoti et al. (2005). Os valores de PIC – *Polymorphism Information Content* – e as frequências alélicas foram obtidos utilizando-se o software POWERMARKER versão 3.25 (Liu e Muse, 2005).

O perfil eletroforético das bandas dos marcadores ISSRs, (1) presença e (0) ausência, juntamente com os resultados da análise para a variável RD, foram submetidos à correlação de Spearman e ao teste de Kruskal Wallis (Kruskal-Wallis, 1964) - teste não paramétrico - com a finalidade de averiguar a correlação entre as bandas geradas pelos marcadores ISSR e a variável RD, utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS, 2004).

A variável RD (Resistência ao Despencamento), característica de interesse do presente estudo, refere-se à média dos valores da resistência ao despencamento dos frutos, expresso em Newtons, de acordo com Pereira et al. (2004).

1.3 Resultados e Discussão

Dos 30 iniciadores microssatélites avaliados, obteve-se 139 alelos, com média de 4,66 alelos por loco. O menor número de alelos foi observado para os *primers* AGMI 103/104, MARS 148, MARS 154, MARS 153 e CNPMF 3 (2 alelos) e o maior para o *primer* Ma 3/103 (11 alelos) (Tabela 3). Considerando outros estudos com diploides, a média de alelos por loco foi próxima à encontrada por Amorim et al. (2008) (7,53 alelos) e Amorim et al. (2009) (7,51 alelos), enquanto Miller et al. (2010) obteve valor inferior, com média de 2,8 alelos por loco.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), que fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador, variou de 0,16 a 0,86 para os *primers* AGMI 103/104 e Ma 3/103, com média de 0,52 (Tabela 3). De acordo com Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados altamente informativos. Segundo essa classificação, o iniciador Ma 3/103 foi considerado altamente polimórfico.

Tabela 3. Locos microssatélites, sequência, número de alelos, conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

Loco SSR	Sequência (5' - 3')	Alelos	PIC
AGMI 105/108	F: tcccaaccctgcaaccact R: atgacctgtcgaacatccttt	3	0.46
AGMI 127/128	F: aagttaggrcaagatagtgaggatt R: cttttgcaccagttgttagg	4	0.33
AGMI 129/130	F: ggaggccaacataggaagaggaat R: cataaacgacagtagaaatagcaac	6	0.61
AGMI 103/104	F: acagaatcgtaaccctaactctca R: ccctttgcgtgccctaa	2	0.16
AGMI 187/188	F: gcaactttggcagcatttt R: tgatggactcatgttacctactat	3	0.39
CNPMF 10	F: cacatcacacgctctgcttc R: tttttcggtgatccaattc	3	0.48
CNPMF 2	F: tgatctcgacgctgcac R: tgacagggcttccacttacag	3	0.23
CNPMF 63	F: ggtgggcaacctgtaatctg R: caccatttgggtttccaac	5	0.73
CNPMF 14	F: catcgaggatgcacatcaag R: caaaagagccacgattcag	7	0.59
CNPMF 37	F: gagccgtggctgtcactaag R: tatactctcgatcaccgggc	8	0.77
CNPMF 60	F: tgaaatctgaaccctggtgg R: acgcacacacacacaatg	7	0.75
CNPMF 20	F: cctcgacatcaacccttac R: catgatcaccatttctccc	6	0.51
CNPMF 19	F: gtgttcgagagctttcagcc R: agaacaatcaagccagcagc	4	0.63
CNPMF 32	F: aggcttcgaccacaaactcc R: agcgttctcgttccaatcac	4	0.53
CNPMF 3	F: gggccaaccacatgatctac R: actcgagcacaatggaacc	2	0.24
Ma 1/17	F: aggcggggaatcggtaga R: ggcgggagacagatggagt	7	0.73
Ma 3/103	F: tcgctctcttttagctctg R: tgttgaggatctgagattg	11	0.86
Ma 1/24	F: gagccattaagctgaaca R: ccgacagtcaacatacataca	6	0.65
Ma 1/27	F: tgaatcccaagtttggtcaag R: caaaactgtccccatctc	6	0.75
MaOCEN 3	F: ggaggaaatggaggtaaca R: ttcgggataggaggaggag	3	0.35
MaOCEN 1	F: tctcaggaagggaacaatc R: ggaccaaagggaagaaacc	6	0.74
MaOCEN 10	F: ggaagaaagaagtggagaatgaa R: tgaaatggataaggcagaagaa	3	0.29

Continua...

TABELA 3. CONTINUAÇÃO.

MASR 189	F: gatggttcgtccgtcagatt R: cacagtcaccaaaccatcg	7	0.78
MASR 166	F: cgagtccgaagtcgetteta R: ttgagcttggtcctctttt	4	0.67
MASR 185	F: gacactgctccacaaacct R: gcttcttcgggtgtctgttc	5	0.69
MASR 148	F: gcaagtgtggcaactgagaa R: cagcctgcccgaattatta	2	0.37
MASR 165	F: ggttggtgtacgtgaagagt R: cgctgttgccaacgtagata	4	0.49
MARS 154	F: gagaggatcgaggaaaaggg R: acggtgctgaaatatccagg	2	0.20
MARS 153	F: ccgcccctcctcgattacat R: gaataaacatacaccgaggtaaa	2	0.36
MASR 149	F: tcgtcaggtctgtatcgag R: ctgcaagaggacatcaacaag	4	0.39
Total		139	-
Média		4.7	0.52

Série Ma desenvolvida por crouch et al. (1998), AGMI por Lagoda et al. (1998), MaOCEN por Creste et al.,(2006),CNPMF por Amorim et al. (2012) e MASR (dados não publicados).

Foi possível observar a formação de cinco grupos: G1- BB França (BB) e Butuhan (BB); G2-Lidi (AA); G3-Jary Buaya (AA), Jaran (AA) e Ouro (AA); G4- 0280031 (AA), M53 (AA), TH0301 (AA), 013004-04 (AA), Calcutta 4 (AA); G5- 017041-01(AA), Khai Nai On (AA), Híbrido AB (AB), Tjau Lagada (AA) (Figura 1).

A análise da maioria dos grupos formados não apresentou concordância entre os genótipos e os seus respectivos padrões de resistência ao despencamento (resistente, medianamente e suscetível), exceto para os grupos: G1, que agrupou os genótipos selvagens, resistentes ao despencamento, BB França e Butuhan – ambos do grupo genômico BB – e o G3, formado por três diploides medianamente resistentes ao despencamento dos frutos: Jary Buaya, Ouro e Jaran. O genótipo Lidi, suscetível ao despencamento, agrupou-se isoladamente (G2). Os grupos G4 e G5 foram heterogêneos quanto ao padrão de despencamento. No G4, observou-se o maior agrupamento de genótipos suscetíveis (Calcutta 4, 013004-04 e M53). Nesse mesmo grupo, há a presença de um genótipo medianamente resistente (TH301) e um resistente (028003-1). Este agrupamento pode ser justificado pela genealogia dos genótipos, tendo em vista que dos cinco genótipos que formaram o G4, quatro são diploides melhorados (013004-04, M53, TH301 e 028003-1), sendo que o diploide selvagem Calcutta 4 é um dos genitores dos diploides melhorados TH301 e 028003-1.

O G5 agrupou dois híbridos: 017041-01(suscetível), Híbrido-AB (moderado) e dois diploides selvagens: Khai Nai On (resistente) e Tjau Lagada (moderado) (Figura 1).

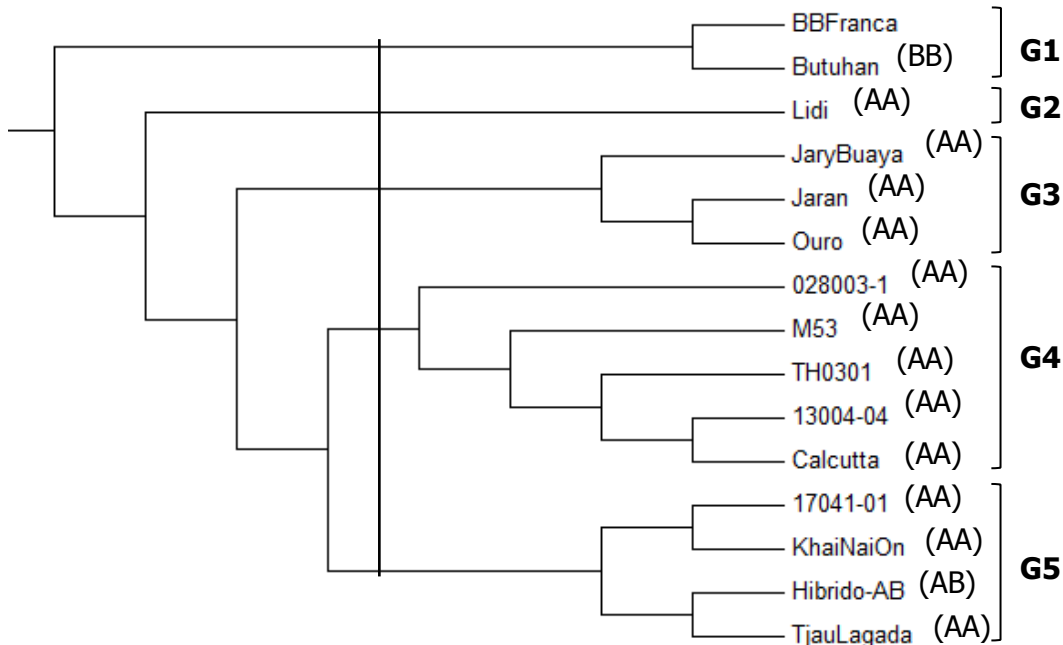


Figura 1. Dendrograma com 15 genótipos de bananeira gerados a partir de 139 bandas polimórficas provenientes de marcadores SSR.

Assim, a análise dos grupos não evidenciou correlação com o grau de resistência ao despencamento, sendo que os diploides não se agruparam de acordo com o padrão de resistência ao despencamento, principalmente para os diploides resistentes (028003-01 e Khai Nai On), os quais formaram grupos com genótipos com resistência moderada e suscetível ao desprendimento precoce dos frutos de banana da penca.

Resultados semelhantes foram obtidos por Creste et al. (2003), cujo trabalho de agrupamento baseado pelos iniciadores microssatélites não evidenciou uma perfeita separação entre diploides cultivados, selvagens e híbridos melhorados. Neste trabalho, os autores observaram que alguns genótipos agruparam-se de acordo com as origens geográficas, enquanto outros, não estabeleceram nenhuma relação.

Amorim et al. (2008), utilizando marcadores SSR em genótipos diploides, também não encontraram separação completa entre híbridos melhorados, cultivados e selvagens, sendo que alguns diploides se agruparam com base em sua origem geográfica.

No presente trabalho, não houve agrupamentos baseados em origem geografia, mas observou-se no G4, agrupamento baseado na genealogia, em que a maioria dos híbridos agrupou-se.

Não foi possível obter uma correlação entre os genótipos resistentes, moderados e suscetíveis ao despencamento e o agrupamento a partir do padrão alélico obtido por meio dos marcadores microsatélites. Tal fato pode ser decorrente da característica ser quantitativa, governada por vários genes e, por isso, não estando relacionada apenas com os SSRs utilizados.

Embora o despencamento seja considerado uma característica quantitativa, foi feito um teste não paramétrico para averiguar a possibilidade de associação entre 63 marcas ISSRs e o despencamento dos frutos das quais 13 apresentaram correlação com a variável RD (Tabela 4).

Tabela 4. Marcas potencialmente ligadas à variável RD, coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e teste de Kruskal-Wallis (KW).

Marca ISSR	RD1	
	r_s	kw
ISSR11D	0.67*	0.034*
ISSR71A	0.67*	0.034*
ISSR34E	0.67*	0.034*
ISSR50D	- 0.78**	0.019**
ISSR71D	0.67*	0.034*
ISSR34F	- 0.67*	0.034*
ISSR34H	0.64*	0.041*
ISSR12B	0.67*	0.034*
ISSR2A	0.64*	0.041*
ISSR56A	0.67*	0.034*
ISSR2F	- 0.67*	0.034*
ISSR56B	0.67*	0.034*

RD: Média dos valores da resistência ao despencamento expresso em Newtons de acordo com Pereira et al. (2004).

A marca que apresentou maior correlação com a variável RD foi o ISSR50, com a correlação negativa de -0,78. Isso significa que a marca está associada a baixos valores de RD, os quais são observados em genótipos suscetíveis ao despencamento. As marcas ISSR11D, ISSR71A, ISSR34E, ISSR71D, ISSR34H, ISSR12B, ISSR2A, ISSR56A, ISSR56B mostram-se mais promissoras, pois estão relacionadas a maiores valores de RD, ou seja, genótipos resistentes.

Testes não paramétricos com o procedimento de correlação de Spearman e Kruskal-Wallis, foram utilizados para identificar marcadores potencialmente ligados a doenças em amendoim (Mace et al., 2006) e feijão Guandu (Singh et al., 2013).

O sequenciamento das marcas associadas com o despencamento será o próximo passo visando à validação dos dados e possível uso na seleção assistida por marcadores para essa característica no programa de melhoramento de bananeira da Embrapa.

1.4 Conclusões

Não foi observada correlação entre os grupos formados pelo método UPGMA e o grau de despencamento dos frutos;

As bandas SSR11D, ISSR71A, ISSR34E, ISSR50D, ISSR71D, ISSR34F, ISSR34H, ISSR12B, ISSR2A, ISSR56A, ISSR2F, ISSR56B, ISSR12A possuem potencial para utilização como marcadores relacionados ao despencamento natural dos frutos da bananeira em programas de seleção assistida.

Referências

- AMORIM, E. P.; REIS, R.V.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S.O. Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p.1045-1052, 2008.
- AMORIM, E. P.; LESSA, L.S.; LEDO, C. A. S. et al. Caracterização agrônômica e molecular de genótipos diplóides melhorados de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 154-161, 2009.
- AMORIM, E.P.; SILVA, P.H.; FERREIRA, C.F. New microsatellite markers for bananas (*Musa* spp). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n.2, p. 1093-1098, 2012.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, n.3, p.314-331, 1980.
- CRESTE, S.; BENATTI, T.; ORSI, M.R.; RISTERUCCI, A.M.; FIGUEIRA, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, n.2, p.303 - 306, 2006.
- CRESTE, S.; TULMAN NETO, A.; SILVA, S.O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 132, n. 3, p. 259–268, 2003.
- CROUCH, H.K.; CROUCH, J.H.; JARRET, R.L. et al. Segregation at microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. **Crop Science**, Madison, v.38, n.1, p.211-217, 1998.
- CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R. VNTR- based diversity analysis of 2x and 4x full-sib *Musa* hybrids. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.2, n. 3, p. 99 – 108. 1999.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2006. 442 p.
- DOYLE, J. J e DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **FAO statistical databases**. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 de setembro de 2014.
- GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMEO-SEVERSON J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, n.7, p. 998-1006, 1994.
- HICKS, E. W. Finger dropping from bunches of Australian Cavendish Bananas. **Journal of Council Science Ind. Research.**, v.7, p.165-168, 1934.

- IMSABAI, W.; SAICHOL, K.; DOORN, W. Physiological and biochemical changes during banana ripening and finger drop. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, n.2, p. 211-216. 2006.
- IMSABAI, W e KETSA, S. The structure and biochemical changes during finger drop in ripening bananas. **Thai Journal of Agricultura Scense**, v. 40, n. 3-4, p. 127 – 132, 2007.
- INIGUEZ-LUY, F. L., VOORT, A. V., OSBORN, T. C. Development of a set of public SSR markers derived from genomic sequence of a rapid cycling *Brassica oleracea* L. genotype. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 117, n. 6, p. 977 - 985, 2008.
- KRUSKAL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, v.29, n.1, p.1-27, 1964.
- LAGODA, P.J.L. Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellite sites. **Electrophoresis**, v.19, n. 8-9, p.1374-1380, 1998.
- LIU, K.; MUSE, S. V. Power Marker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, v.21, p. 2128 – 2129, 2005.
- LU, Y., ZHANG, X., PU, J., QI, Y., XIE, Y. Molecular assessment of genetic identity and genetic stability in banana cultivars (*Musa* spp.) from China using ISSR markers. **Australian Journal of Crop Science**. v. 5, n. 1, p. 25-31, 2011.
- MACE, E.S.; PHONG, E.D.T.; UPADHYAYA. E.S. et al. SSR analysis of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to rust and late leaf spot diseases. **Euphytica**, v. 152, n.3, p. 317-330, 2006.
- MARRIOTT, J. Bananas: physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 13, n.3, p. 41-88, 1980.
- MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; HUBERT, O.; BAURENS, F. C.; MATSUMOTO, T.; CHILLET, M.; FILS-LYCAON, B.; SIDIBÉ-BOCS, S. Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 7, p.2021 -2034, 2009.
- MILLER, R. N.G.; PASSOS, M. A. N.; MENEZES, N. N. P.; SOUZA, M. L. T. JR.; COSTA, M. M. do C.; AZEVEDO, V. C. R.; AMORIM, E. P.; PAPPAS, G.J. JR E CIAMPI, A. Y. Characterization of novel microsatellite markers in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4. **BMC Research Notes**, v.3, n. 148, p. 1- 6, 2010.
- MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 295p.
- PEREIRA, M.C.T.; SALOMÃO, L.C.C.; SILVA, S.O.; CECON,P.R.; PUSCHMANN, R.; JESUS, O.N.; CERQUEIRA, R.C.C. Suscetibilidade à queda natural e caracterização dos frutos de diversos genótipos de bananeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 499-502, 2004.

RACHARAK, P e EIADTHONG, W. Genetic relationship among subspecies of *Musa acuminata* Colla and A-genome consisting edible cultivated bananas assayed with ISSR markers. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 29, n 6, p. 1479-1489, 2007.

SAS Institute Inc., Cary, NC: **SAS Institute Inc.**, 2002-2004.

Statistica for Windows. 2002. Computer program manual. Version 6. Tulsa: Statsoft, 1CD-ROM.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The journal of the Linnean Society of London**, v. 55, n.359, p. 302-12, 1955.

SINGH A. K., RAI V. P., CHAND R., SINGH R. P. AND SINGH M. N. Genetic diversity studies and identification of SSR markers associated with *Fusarium* wilt (*Fusarium udum*) resistance in cultivated pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Journal of Genetics**. v.92, n.2, p. 273–280. 2013.

VENTAKATACHALAM, L.; SREDHAR, R. V e BHAGYALAKSHIMI, N. The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. **Molecular Phylogenetics. Evoluton**. v.47, n.3, p 974-985, 2008.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, n.2, p.176-183, 1994.

CAPÍTULO 2

Caracterização Anatômica de Genótipos de Bananeira Contrastantes para o Despencamento Natural dos Frutos.

Resumo - O despencamento natural de frutos de bananeira é um distúrbio fisiológico causado pelo enfraquecimento e amolecimento do pedicelo, o que faz com que os frutos se separem da almofada precocemente durante o processo de maturação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a região do pedicelo de bananas provenientes de genótipos suscetíveis e resistentes ao despencamento natural, visando detectar as possíveis alterações anatômicas relacionadas a esse fenômeno. Foram utilizados genótipos nos estádios de maturação 4, 5 e 6, de diferentes ploidias e padrões de resistência ao despencamento. Foram feitas medições das seguintes características anatômicas: comprimento do córtex (CC), comprimento das fibras (CF), diâmetro das fibras (DF), frequência de fibras (FF), frequência de laticíferos (FL), e área do conjunto de fibras (AF). No genótipo 017041-01, suscetível, foi observada presença marcante de parênquima aerífero, característica que não foi evidenciada nos genótipos resistentes BB França, Khai Nai On e BRS Preciosa. As mudanças anatômicas, observadas durante o amadurecimento nos estádios de maturação, foram mais evidentes no genótipo suscetível 017041-01. Maiores valores da variável AF e maior deposição de lignina nos feixes vasculares mostraram-se relacionados à resistência ao despencamento. Analisando apenas os diploides do genoma A, o diploide selvagem Khai Nai On, resistente ao despencamento, mostrou-se superior e poderá ser usado em programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes ao despencamento natural dos frutos.

Palavras - chave: *Musa* spp. Alteração estrutural. Pedicelo.

Anatomical Characterization of Banana Genotypes Contrasting to Natural Fruit Finger Drop.

Abstract - The finger drop is a physiological disorder caused by weakening and softening of the pedicel, which causes the fruit to separate from the cushion early during the maturation process. The objective of the present work is to describe the pedicel region of bananas from susceptible and resistant genotypes as to the natural fruit finger drop, in order to detect the possible anatomical causes to explain this phenomenon. Genotypes were used in maturation stages 4, 5 and 6, of different ploidy levels and finger drop resistance patterns. Measurements were made of the following anatomical parameters (variables): length of the cortex (CC), fibre length (CF), fibre diameter (DF), fiber frequency (FF), laticifer frequency and fibre area (AF). In the genotype 017041-01, susceptible, the presence of aerenchyma was observed, however, this feature was not evidenced in the resistant genotypes, BB France, Khai NaiOn and BRS Precious. Anatomical changes observed during ripening in the stages of maturation, were most evident in the 017041-01 genotype (susceptible). Higher values of variable AF and increased deposition of lignin in the vascular bundles, were related to finger drop resistance. Analyzing only the diploids of the genome, the wild diploid Khai NaiOn (resistant to finger drop), proved superior, and this genotypes can be used in breeding programs aiming at the development of cultivars resistant to natural fruit finger drop.

Key words: *Musa* spp structural alteration. Pedicel.

2.1 Introdução

A bananicultura se destaca como uma atividade de grande importância econômica e social em todo o mundo, principalmente na região dos trópicos e subtropicais, representado em sua maioria por pequenos produtores. Considerada como uma das principais fontes alimentares, seu consumo *in natura* supera a maioria das frutas, perdendo apenas para os citros (SOTO, 2011).

Segundo Matsuura et al. (2004), além dos atributos de sabor, vida útil e aparência serem os mais importantes na escolha ou na compra dos frutos de banana, a fruta deve apresentar-se em penca contendo de 10 a 12 frutos.

Em virtude do fruto da bananeira ser comercializado em pencas ou buquês, as cultivares que apresentam sensibilidade ao despencamento natural ou desprendimento dos frutos são rejeitadas pelos agricultores e principalmente, pelos consumidores, que a cada dia estão mais exigentes. O despencamento é um distúrbio fisiológico causado pelo enfraquecimento e amolecimento do pedicelo, o que faz com que os frutos se separem da almofada precocemente durante o processo de maturação (SEMPLE e THOMPSON, 1988, IMBASAI, 2006).

Em bananas, esta desordem não é ocasionada pela formação de camada de abscisão, como ocorre na maioria dos frutos carnosos. A camada de abscisão resulta de processos fisiológicos de separação que desencadeiam mudanças nas paredes celulares durante a abscisão do fruto que normalmente está restrita a uma camada de células finas (WEBSTER e BAIRD, 1979; ADDICOTT, 1982; PAUL e CHEN, 1983; CONWAY et al., 1992).

Imbasai e Ketsa (2007) não encontraram camada de abscisão em estudo anatômico realizado no pedicelo da banana, na área de ruptura, em estádios precoces e tardios de amadurecimento dos genótipos 'Kluai Hom Thong' e 'Kluai Namwa', suscetível e resistente ao despencamento, respectivamente. Isto sugere que a ocorrência do despencamento natural do fruto não requer uma zona de abscisão. Os mesmos autores também observaram diminuição da espessura do pedicelo, evidenciando a ação de enzimas de degradação dos componentes da parede celular, durante o amadurecimento de cultivares suscetíveis. Acredita-se que tal alteração seja provocada por modificações dos polissacarídeos da parede celular, principalmente da pectina e da hemicelulose (MANRIQUE e LAJOLO, 2002).

Além desse, outros estudos anatômicos da região do pedicelo onde ocorre o despencamento demonstraram que a degeneração da parede celular e do tecido parenquimático, com a formação de grandes espaços vazios, favorece o despencamento em frutos maduros de cultivares suscetíveis (PEREIRA, 2002; PUTRA et al., 2010). Por outro

lado, Maia et al. (2004), estudando o despencamento do híbrido ‘SH 3640’, constataram que o aumento da resistência deste foi devido ao aumento da espessura e da maior deposição de lignina nas paredes das fibras perivasculares.

De acordo com Pereira et al. (2004), a resistência ao despencamento parece estar associada à presença do genoma B (*Musa balbisiana*), embora exista variabilidade para a característica dentro do genoma A (*Musa acuminata*). Em virtude disso, a análise da estrutura anatômica da região onde ocorre o desprendimento do fruto em diploides de *Musa acuminata* (AA) é de fundamental importância, já que a fonte de resistência para esse distúrbio fisiológico encontra-se no genoma B.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a região do pedicelo de bananas provenientes de genótipos suscetíveis e resistentes ao despencamento natural, visando detectar as possíveis alterações anatômicas relacionadas a esse fenômeno.

2.2 Material e Métodos

Material genético

As amostras foram coletadas de sete genótipos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas, BA. Foram utilizados genótipos nos estádios de maturação 4, 5 e 6, de diferentes ploidias e padrões de resistência ao despencamento (Tabela 1).

Tabela 1. Genótipos de bananeira, grupo genômico (GG), genealogia e resistência ao despencamento (RD).

Genótipo	GG	Genealogia	RD
BB França	BB	Diploide selvagem	Resistente
Híbrido AB	AB	Diploide melhorado	Moderado
TH 0301	AA	Diploide melhorado	Moderado
017041-01	AA	Diploide melhorado	Suscetível
BRS Pioneira	AAAB	Híbrido melhorado	Suscetível
BRS Preciosa	AAAB	Híbrido melhorado	Resistente

A classificação dos estádios de maturação dos frutos foi baseada na escala de Von Loesecke (1949), sendo selecionados para o estágio 4, frutos mais amarelos do que verdes; amarelo com a ponta verde para o estágio 5 e totalmente amarelo para o estágio 6. Os valores de RD (Resistência ao despencamento) foram dados fornecidos por Pereira et al. (2004).

Estudo anatômico

Os estudos anatômicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal e histoquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

O estudo anatômico foi realizado com amostras do pedicelo. Os tecidos vegetais foram fixados em FAA₅₀ (formamida, ácido acético, álcool etílico 50%, 0,5: 0,5: 9 v/v) por 24 horas e estocados em álcool etílico a 70 %. Amostras dos materiais foram desidratadas em série butílica e incluídas em blocos de parafina histológica (JOHANSEN, 1940) a partir dos quais secções seriadas transversais e longitudinais com espessura de aproximadamente 14 µm, foram obtidas em micrótomo rotativo (modelo Leica 2245).

Os cortes foram corados com safranina alcoólica 1,5% e azul de astra aquoso 1 % (GERLARCH, 1969) e as lâminas permanentes montadas em resina sintética (Permout). A documentação foi realizada em fotomicroscópio Olympus BX51 equipado com câmara fotográfica digital Olympus A330.

As características avaliadas foram a distribuição e a coloração dos componentes dos tecidos da região em que ocorre o desprendimento natural dos frutos. Os tecidos foram digeridos em solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético (1:1) v/v, recém-preparada. Após a digestão, o material foi lavado em água destilada e conservado em álcool 50%. As fibras foram coradas com solução de safranina 1% em etanol 50% por 24 horas (FRANKLIN, 1945). Após lavar o material por três vezes com álcool etílico a 30%, as lâminas foram montadas em glicerina.

As contagens e medições foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ (RASBAND, 2012). Foram feitas medições das seguintes variáveis anatômicas: comprimento do córtex (TC) em mm, comprimento das fibras (CF) em µm, diâmetro das fibras (DF) em µm, frequência de fibras (FF) em número de células por mm², frequência de laticíferos (FL) em número de células por mm², e área do conjunto de fibras (AF). Cada repetição foi composta por três lâminas, sendo avaliadas três regiões diferentes de cada lâmina, para cada genótipo. Os valores ajustados e/ou transformados foram submetidos à ANOVA paramétrica e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

2.3 Resultados e Discussão

Por meio dos cortes histológicos foi possível observar que o pedicelo dos frutos da bananeira possui estrutura anatômica típica das plantas monocotiledôneas, apresentando uma ampla região de parênquima com feixes vasculares dispersos, o que caracteriza uma distribuição do tipo atactostelo. É possível observar a ocorrência de laticíferos articulados não anastomosados distribuídos por todo órgão.

O pedicelo da banana em secção transversal possui epiderme unisseriada e células papilosas. O genótipo BB França e o híbrido BRS Preciosa, exibem epiderme proeminentemente papilosa, destacando-se dos demais genótipos, que também apresentam células papilosas, porém menos acentuadas (Figura 1).

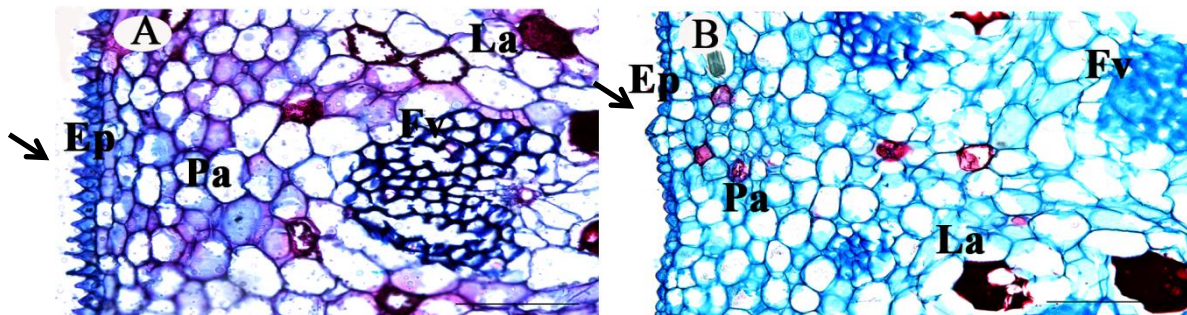


Figura 1. Seção transversal do pedicelo de bananeira. A) Setas indicam: Epiderme proeminentemente papilosa no genótipo BB França e B) Epiderme papilosa no genótipo Híbrido AB. Feixe Vascular (Fv), Epiderme (Ep), Parênquima fundamental (Pa) e Laticífero (La). Barra = 500µm.

As papilas são projeções da parede periclinal externa. A ocorrência das papilas nos genótipos não está relacionada com o fator resistência ao despencamento, mas apenas uma característica de proteção. Para vários autores, a importância das papilas é apenas taxonômica, enquanto outros acreditam que essas estruturas exercem o papel de refletir a luz solar (FAHN, 1995).

Logo abaixo da epiderme, ocorre o córtex, onde se encontra o tecido parenquimático, composto por células de formato e dimensões variadas. Foi observado que no genótipo BB França (BB), resistente, aumento no tamanho das células parenquimáticas e maior lignificação das mesmas no estágio 6 de maturação, devido a uma maior afinidade desses tecidos com o corante safranina.

No genótipo 017041-01 (AA), suscetível, foi observada presença marcante de parênquima aerífero, caracterizado por grandes espaços intercelulares (Figura 2). Esta característica não foi evidenciada nos genótipos resistentes BB França, Khai Nai On e BRS Preciosa, o que informa que a resistência ao despencamento pode estar relacionada com a sua ocorrência e distribuição. Com a presença do parênquima aerífero o órgão se torna mais leve e frágil; conseqüentemente mais susceptível ao despencamento. Essa susceptibilidade pode ocorrer devido à força realizada pelo fruto para se manter na penca.

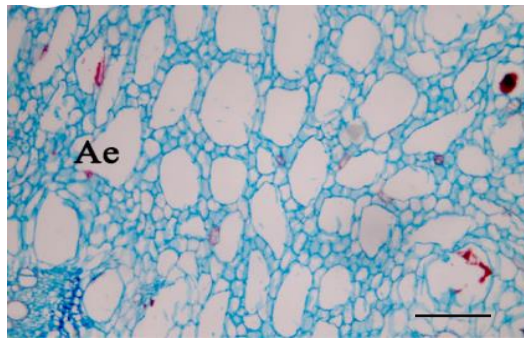


Figura 2. Pedicelo do genótipo 017041-01 (AA), suscetível ao despencamento, em seção transversal. Aerênquima (Ae). Barra = 200µm.

De acordo com Cheng et al., 2008, *Musa* sp. possui frutos climatéricos que perdem rapidamente a rigidez da estrutura celular e textura quando a maturação é iniciada; fato confirmado por Putra et al. (2010), os quais concluíram que o despencamento nas cultivares *Musa Rastali* e *Musa Pisang Awak*, propensas ao despencamento, foi causado por desintegração, colapso e diminuição da espessura das células ao longo da região onde ocorre o despencamento dos frutos. Pereira (2002), também, evidenciou degeneração do tecido parenquimático na região do pedicelo em frutos maduros, formando grandes espaços vazios, favorecendo o despencamento.

Houve variação quanto à distribuição e arranjos dos tecidos vasculares nos genótipos analisados. Quatro tipos de fibras vasculares foram observados, sendo eles: feixe de fibras ou grupos de fibras (Figura 3, A), feixes colaterais (Figura 3, E), feixe vascular com bainha esclerenquimática incompleta (Figura 3, H) e feixe vascular com bainha esclerenquimática completa (Figura 3, B).

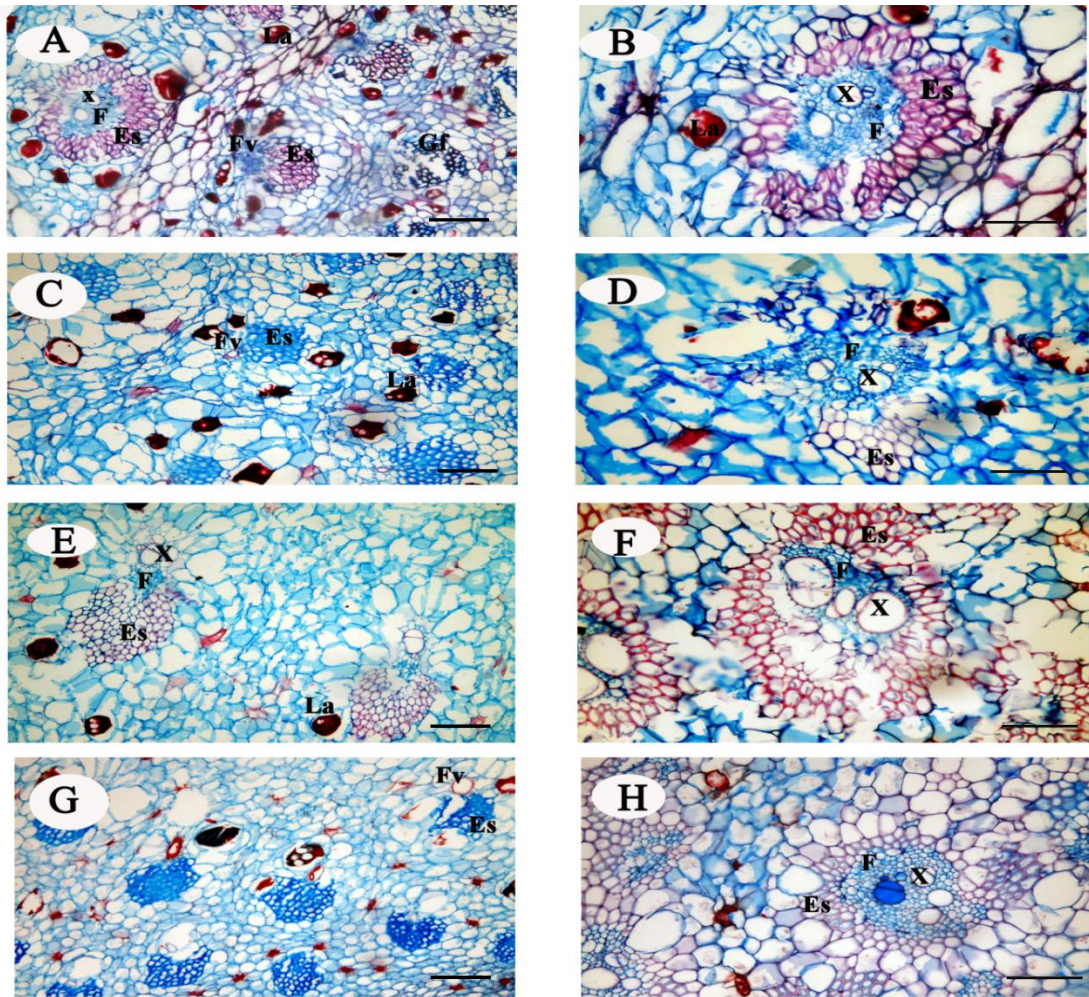


Figura 3 (A-H). Seção transversal do pedicelo de banana. A e B) BB França (BB, resistente), C e D) híbrido AB (AB, moderadamente resistente), E e F) Khai Nai On (AA, resistente), G e H) TH 0301 (AA, moderadamente resistente), (I e J) 017041-01 (AA, suscetível), (K e L) BRS Preciosa, (M e N) BRS Pioneira. Feixe Vascular (Fv), Esclerênquima (Es), Xilema (X), Floema (F), Grupo de fibras (Gf) Laticífero (La). Barra = 200µm (B, D, F, H). Barra = 500 µm (A, C, E, G).

Continua...

FIGURA 3. CONTINUAÇÃO

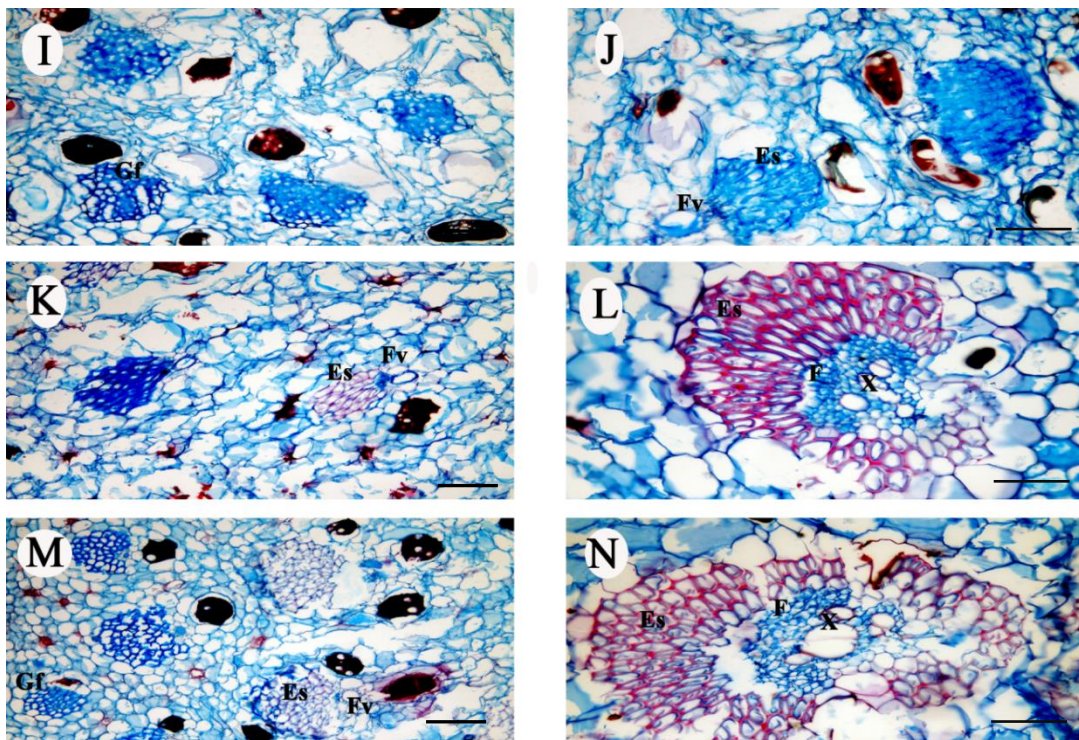


Figura 3 (I a N). Seção transversal do pedicelo de banana. A e B) BB França (BB, resistente), C e D) híbrido AB (AB, moderadamente resistente), E e F) Khai Nai On (AA, resistente), G e H) TH 0301 (AA, moderadamente resistente), (I e J) 017041-01(AA, suscetível), (K e L) BRS Preciosa, (M e N) BRS Pioneira. Feixe Vascular (Fv), Esclerênquima (Es), Xilema (X), Floema (F), Grupo de fibras (Gf) Laticífero (La). Barra = 200µm (J, L, N). Barra 500 µm (I, K, M)

O genótipo BB França, resistente ao despencamento, destacou-se dos demais, pois a bainha de fibras esclerenquimáticas, formada por até quatro camadas de fibras, foram fortemente coradas pela safranina (Figura 3, B); já no genótipo 017041-01, suscetível, foi observado apenas feixes vasculares e feixes colaterais corados pelo azul de astra (Figura 3, I e J). O azul de astra tem sido empregado em conjunto com a safranina para distinguir as paredes celulares celulósicas (primárias) das lignificadas (secundárias).

O grupo, distribuição e coloração dos tecidos vasculares que foram observados nos sete genótipos analisados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Tipos de fibras, local de ocorrência e coloração encontrados em sete genótipos de *Musa sp.*

Genótipo	Tipo de fibras	Local de ocorrência	Corante
BB França (BB) (resistente)	Feixe de Fibras	Córtex	Azul de Astra
	Fibras colaterais	Região periférica	Safranina
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática completa	Centro	Safranina
Híbrido AB (AB) (moderado)	Feixe de fibras	Córtex	Azul de Astra
	Fibras colaterais	Região periférica	Azul de Astra
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática incompleta	Centro	Safranina
Khai Nai On (AA) (resistente)	Feixe de fibras	Córtex	Azul de Astra
	Fibras colaterais	Região periférica	Safranina e Azul de Astra
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática incompleta	Centro	Safranina
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática completa	Centro	Safranina
TH 0301 (AA) (moderado)	Feixe de Fibras	Córtex	Azul de Astra
	Fibras colaterais	Região periférica	Azul de Astra
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática incompleta	Centro	Safranina
017041-01 (AA) (suscetível)	Feixe de Fibras	Córtex	Azul de Astra
	Fibras colaterais	Região periférica	Azul de Astra
BRS Pioneira (AAAB) (Suscetível)	Feixe de Fibras	Córtex	Azul de Astra
	Fibras colaterais	Região periférica	Azul de Astra
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática incompleta	Centro	Safranina
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática completa	Centro	Safranina
BRS Preciosa (AAAB) (resistente)	Feixe de Fibras	Córtex	Azul de Astra
	Fibras colaterais	Região periférica	Azul de Astra e Safranina
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática incompleta	Centro	Safranina
	Feixe vascular com bainha esclerenquimática completa	Centro	Safranina

No presente estudo, pode-se inferir que as variações dos feixes vasculares entre os genótipos analisados estão relacionadas com a resistência ao despencamento, pois observou-se que as fibras de BB França (Figura 3, A e B), Khai Nai On (Figura 3, G e H) e BRS Preciosa (Figura 3, K e L), genótipos tolerantes ao despencamento, mostraram-se mais lignificadas.

Sumardi e Wulandari (2010) observaram variações anatômicas nos feixes vasculares (tamanho, estrutura e diâmetro) em cinco cultivares de banana e atribuíram ao nível de ploidia dos genótipos.

Fahn (1995) sugere que as fibras possuem parede celular secundária, lignificada ou não, com função principal de suporte e, algumas vezes, de proteção. Essas fibras proporcionam, aos órgãos da planta, resistência mecânica diante das diversas situações, como torções, excesso de peso e pressões.

As paredes celulares das fibras do genótipo 017041-01 (suscetível) apresentou coloração azul, indicando afinidade com o corante azul de astra ao invés da safranina. Uma vez que nos processos de dupla coloração as fibras sempre coram pela safranina, devido à sua afinidade com a lignina, essa reação atípica na coloração pode ser atribuída ao processo incompleto de lignificação. Tal afirmação é corroborada pela espessura reduzida da parede celular das fibras do genótipo 017041-01 (suscetível) (Figura 3, I e J), quando comparadas às paredes das fibras esclerenquimáticas do genótipo BB França (resistente) (Figura. 3, A e B).

A presença de laticíferos foi identificada em todos os genótipos, entretanto, com variação na cor e na distribuição. A diferença na coloração do conteúdo dos laticíferos pode refletir a variação na composição química do exsudato. Todos os genótipos apresentaram laticíferos do tipo articulado e não anastomosado (Figura. 4), corroborando resultados reportados por Sumardi e Wulandari (2010).

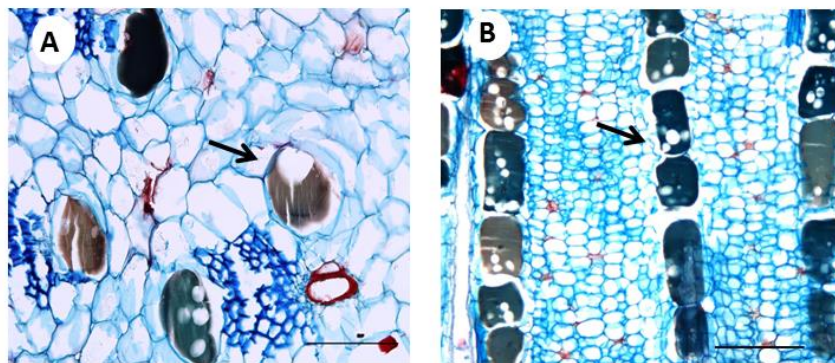


Figura 4. Seção transversal (A) e longitudinal (B) do pedicelo de bananeira. As Setas indicam: laticíferos. Genótipo TH 0301, no estágio 6 de maturação. Barra = 200µm. Setas indicam os laticíferos.

As mudanças anatômicas observadas durante o amadurecimento nos estádios de maturação 4 (fruto mais amarelo que verde), 5 (fruto amarelo com extremidade verde) e 6 (fruto totalmente amarelo), foram mais evidentes no genótipo 017041-01 (suscetível). No estágio 6, pôde-se observar que o tecido parenquimático desse genótipo, é mais frágil, com rompimento de várias células ao redor dos feixes vasculares e dos laticíferos (Figura 5). De acordo com Kleng et al. (2011), quando frutos maduros são comparados anatomicamente com frutos verdes, ocorre a redução da espessura da casca, aumento de espaços intercelulares e diminuição de tecidos dos feixes vasculares. Estas características parecem estar mais acentuadas em genótipos suscetíveis ao despencamento.

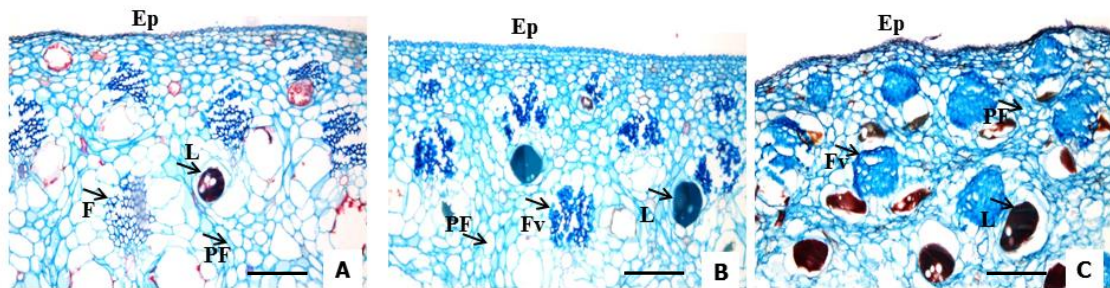


Figura 5. Feixe Vascular (Fv), Epiderme (Ep), Parênquima fundamental (PF) e Laticífero (L) em secções transversais do pedicelo da banana. Genótipo 017041-01, A: estágio 4, B: estágio 5 e C: estágio 6. Barra 500 μ m.

Não foi observada linha de abscisão nos genótipos. Este fato corrobora os resultados reportados por outros autores que também não detectaram formação de camada de abscisão na região onde ocorre o despencamento nos frutos da bananeira e sugeriram que a ruptura deve ser devido ao enfraquecimento da casca no pedúnculo (Maia et al., 2004; Imsabai et al., 2006; Imsabai e Ketsa, 2007; Putra et al., 2010)

O resumo das análises de variância encontra-se na Tabela 3. Verifica-se que o teste F revelou diferenças altamente significativas entre os genótipos para todas as variáveis.

No caso dos coeficientes de variação, os menores valores registrados foram para diâmetro das fibras e comprimento das fibras. Por outro lado, a maior percentagem ocorreu nas variáveis: frequência de laticíferos e comprimento do córtex (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância obtido para as sete variáveis avaliadas.

Variáveis	Quadrados Médios		Média	CV (%)
	Acessos	Erro		
Diâmetro das fibras (DF)	298,42**	12,97	31,59	3,05
Comprimento das fibras (CF)	143,03**	697	668,12	3,95
Frequência das fibras (FF)	1,32**	0,05	2,21	10,49
Frequência dos laticíferos (FL)	5,21**	0,44	3,56	18,63
Comprimento do córtex (TC)	0,04**	0,001	0,25	15,62
Área do conjunto de fibras (AF)	0,002**	0,000036	0,071	8,42

** : significativo a 1%; ^{ns}: não significativo.

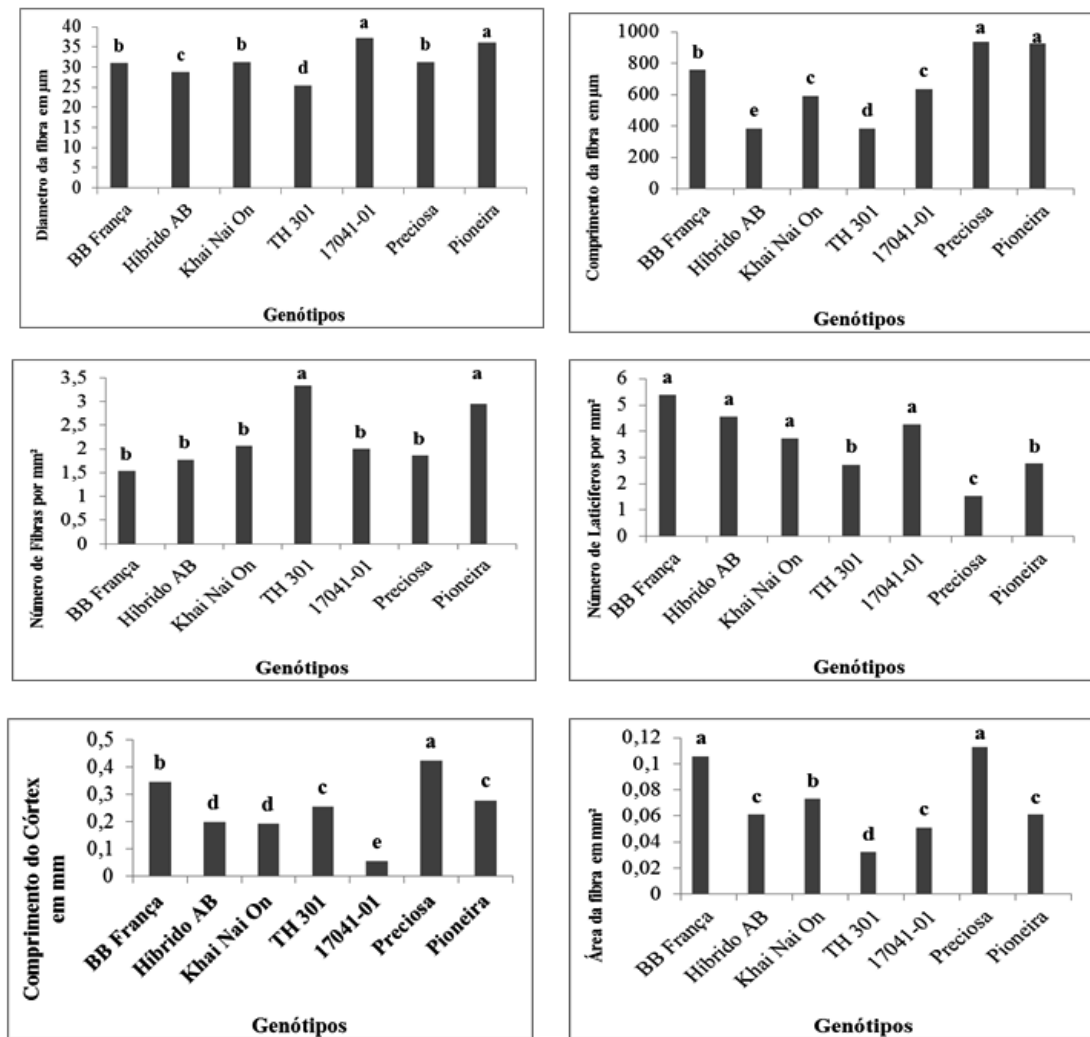


Figura 6. Valores médios do diâmetro das fibras (DF), comprimento das fibras (CF), frequência de fibras (FF), frequência de laticíferos (FL), Comprimento do córtex (CC), e área do conjunto de fibras (AF) de sete genótipos no estágio de maturação 6.

Barras seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os diploides apresentaram fibras mais curtas, variando de 384,97 μm (Híbrido AB) a 639,54 μm (BB França), enquanto os híbridos tetraploides, BRS Pioneira e BRS Preciosa, obtiveram fibras com comprimento de 925,22 μm e 939,50 μm , respectivamente (Fig. 6).

O genótipo BB França, que possui elevada resistência ao despencamento, apresentou a maior média de comprimento de fibra entre os diploides. O genótipo 017041-01, suscetível ao despencamento, apresentou o terceiro maior valor para o comprimento das fibras e o maior diâmetro, não tendo diferença significativa entre o diâmetro das fibras do híbrido tetraploide BRS Pioneira (suscetível). De acordo Pereira (2002) comprimento de fibras não parece ser determinante para explicar a maior ou menor resistência ao despencamento.

Houve uma tendência de uniformidade para a variável número de fibras por mm^2 ; apenas o diploide TH 0301, moderadamente resistente, e o tetraploide BRS Pioneira, suscetível, diferiram dos demais genótipos apresentando valores superiores. O mesmo ocorreu com a variável número de laticíferos por mm^2 , apenas os genótipos TH 0301 e BRS Preciosa (resistente) apresentaram os menores valores. A maioria dos feixes vasculares encontra-se cercados por laticíferos. Os mesmos resultados foram encontrados por Amnuaysin et al., (2012) na casca e por Sumardi e Wulandari, (2010) na raiz e folha. No entanto, o número de fibras e de laticíferos por mm^2 não parecem estar relacionados ao despencamento prematuro dos frutos nos genótipos estudados.

A variável área do conjunto de fibra mostrou ter maior relação com o despencamento, uma vez que os genótipos resistentes, BB França, BRS Preciosa e Khai Nai On, obtiveram os maiores valores. De acordo com Amnuaysin et al. (2012), que estudaram alterações anatômicas na casca da cultivar ‘Hom Thong’ (*Musa acuminata*, AAA, subgrupo Gros Michel) durante o seu desenvolvimento e maturação, um aumento no tamanho da célula da fibra foi observado na fase inicial de desenvolvimento, a taxa de ampliação celular reduziu gradualmente e parou quando os frutos atingiram a maturidade. O aumento da espessura da parede da fibra, causada pela deposição de uma parede celular secundária, ajudou a fornecer resistência para a casca.

Entre os diploides estudados, o genótipo BB França, resistente, apresentou a maior média para a variável comprimento do córtex, enquanto o genótipo 017041-01, suscetível, apresentou a menor. Analisando apenas os diploides do genoma A, o diploide selvagem Khai Nai On, resistente ao despencamento, mostrou-se superior para a variável área do conjunto de fibra, característica que parece estar mais relacionada à resistência ao despencamento e poderá ser usado em programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes ao despencamento natural dos frutos.

2.4 Conclusões

A formação do parênquima aerífero é uma alteração anatômica verificada durante o despencamento, sendo mais intenso no genótipo suscetível 017041-01.

Maiores valores da área do conjunto de fibras e uma maior deposição de lignina nos mesmos mostraram-se relacionados à resistência ao despencamento.

Referências

- ADDICOTT, F. T. **Abscission**. Los Angeles: University of California, 1982. 369 p.
- AMNUAYSIN, N.; SERAYPHEAP, K e KIDYOO, M. Anatomical Changes in Peel Structure of ‘Hom Thong’ Banana during Fruit Development and Ripening. **Tropical Natural History**, v. 12, n.2, p. 127-136, 2012.
- BAIRD, L. A. M e WEBSTER, B. D. The anatomy and histochemistry of fruit abscission. **Horticultural Reviews**, v.1, n, 4, p. 172-203, 1979.
- CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.; MCGUIRE, R.G.; KELMAN, A. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay. **Plant Disease**, v.76, n.4, p. 329-334, 1992.
- CHENG, G., X. DUAN, B. YANG, Y. JIANG, W. LU, Y. Luo and W. Jiang. Effect of hydroxyl radical on the scission of cellular wall polysaccharides in vitro of banana fruit at various ripening stages. **Acta Physiology Plant**, n. 30, p. 257-263, 2008.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1995. 544 p.
- FRANKLIN, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. **Nature**, v. 155, n, 3924, p. 51, 1945.
- GERLARCH, D. *Botanischmikrotechnik: Eine Einführung*. Georg Thieme, Stuttgart, 311p, 1969.
- IMSABAI, W e KETSA, S. The structure and biochemical changes during finger drop in ripening bananas. **Thai Journal of Agricultura Science**, v. 40, n. 3-4, p. 127 – 132, 2007.
- IMSABAI, W.; SAICHOL, K.; DOORN, W. Physiological and biochemical changes during banana ripening and finger drop. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, n.2, p. 211-216, 2006.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: The Maple Press Company: 523p, 1940.
- KHENG, T. Y.; DINGA, P.; RAHMANB, N. A. A. Physical and cellular structure changes of Rastali banana (Musa AAB) during growth and development. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 3, p. 382–389, 2011.
- MAIA, V. M.; ALEXANDRE, R. S.; SALOMÃO, L. C. C.; SILVA, E. A. M. da. MEIRA, R. M. S. A. Efeitos das condições de amadurecimento sobre a suscetibilidade de bananas ‘SH 3640’ ao despencamento natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 351-353, 2004.
- MANRIQUE, G. D. & LAJOLO F. M. FT-IR Spectroscopy as a Tool for Measuring Degree of Methyl Esterification in Pectins Isolated from Ripening Papaya Fruit. **Postharvest Biology and Technology** **Postharvest Biology and Tecnology**, v. 25, n. 1, p. 99 - 107, 2002.

MATSUURA, F. C. A. U.; COSTA, J. I. P. da.; FOLEGATTI, M. I. da S. MARKETING DE BANANA: PREFERÊNCIAS DO CONSUMIDOR QUANTO AOS ATRIBUTOS DE QUALIDADE DOS FRUTOS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 48-52, 2004.

PAUL, R. E.; CHEN, N. J. Postharvest variation in cell wall - degradation enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. **Plant Physiology**, v. 72, n.2, p. 382-385, 1983.

PEREIRA, M. C. T. **Caracterização, anatomia do pedicelo, fisiologia e redução do despencamento natural de bananas após a colheita. 2002.** 80f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2002.

PEREIRA, M.C.T.; SALOMÃO, L.C.C.; SILVA, S.O.; CECON,P.R.; PUSCHMANN, R.; JESUS, O.N.; CERQUEIRA, R.C.C. Suscetibilidade à queda natural e caracterização dos frutos de diversos genótipos de bananeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 499-502, 2004.

PUTRA, E.T.S.; ZACARIA, W.; ABDULLAH, N.A.P.; SALEH, G. Cell ultrastructure and peel nutrient content of neck zone in six cultivars of *Musa sp* fruit during ripening. **International Journal of Botany**, v.6, n.1, p. 47 - 52, 2010.

RASBAND, W. S. ImageJ, U, S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>,1997-2012.

SEMPLE, A. J.; THOMPSON, A. K. Influence of the ripening environment on the development of finger drop in bananas. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 46, n.2, p. 139-146, 1988.

SOTO, M. Situación y avances tecnologicos en la producción bananera mundial. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n. spe, p.13-28, 2011.

SUMARDI, I e WULANDARI, M. Anatomy and morphology character of five Indonesian banana cultivars (*Musa spp.*) of different ploidy level. **BIODIVERSITAS**, v.11, n. 4, p. 167-175, 2010.

VON LOESECKE, H. W. Bananas, chemistry, physiology and technology. New York: Interscience Publishers, 1949.

CAPÍTULO 3

Expressão de genes associados com o despencamento natural de frutos de bananeira em diferentes estádios de maturação.

Resumo: O despencamento natural dos frutos, uma das principais desordens fisiológicas que podem ocorrer em bananas, está estreitamente relacionado com o processo de maturação e envolve o amolecimento e enfraquecimento da casca na área de junção do fruto com a penca, chamada de pedicelo. O objetivo deste trabalho foi analisar os níveis de expressão de genes envolvidos nos processos de maturação e despencamento natural dos frutos, na região do pedicelo de bananas provenientes de genótipos suscetíveis e resistentes ao despencamento. Para este fim, os valores dos Ct (*cycle threshold*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica relativa dos genes modificadores da parede celular (PEL1, EXP1 e XTH4) entre os estádios de maturação (4, 5 e 6) na zona de despencamento (ZD) e na região mediana da casca (zona controle - ZC). As reações foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) usando três repetições biológicas e três repetições técnicas. Para realizar a análise de expressão relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e os genes endógenos Tubulina e 25S foram utilizados como referência. Os resultados finais da análise por RT-qPCR mostraram que houve expressão diferencial entre os estádios de maturação nos genótipos estudados. Os genes PEL1 e XTH4 demonstraram perfis de expressão relacionados com o despencamento nos frutos sendo bons candidatos para estudos funcionais em bananeira, podendo ser utilizado para direcionar o programa de melhoramento da cultura visando à produção de frutos com resistência para essa característica.

Palavras-chave: *Musa* spp. Parede celular. RT-qPCR.

Gene expression associated to the natural fruit finger drop in bananas in different stages of maturation.

Abstract - Natural fruit finger drop, one of the major physiological disorders that can occur in bananas, is closely related to the maturation process and involves the softening and weakening of the peel in the area in the junction of the fruit with the bunch, called a pedicel. The objective of this work was to analyze the levels of expression of genes involved in the processes of maturation and natural fruit finger drop in the pedicel of bananas from susceptible and resistant genotypes to fruit finger drop. The values of Ct (cycle threshold) were used to determine the gene expression difference as to cell wall modifier genes (PEL1, EXP1 and XTH4) between the different stages of ripeness (4, 5 and 6) in finger drop zone (ZD) and in the middle of the fruit (control zone-ZC). The reactions were carried out in the 7500 Fast real-time PCR (AppliedBiosystems) equipment using three biological and three technical replicates. To perform the analysis of relative expression, The method $2^{-\Delta\Delta CT}$, was used and Tubulina and 25S, were used as a reference genes. The final results of the analysis by RT-qPCR showed that there was a differential expression between the stages of maturation in the genotypes studied. Genes PEL1 and XTH4 showed expression profiles related to the fruit finger drop. They are good candidates for functional studies in bananas, can be used to direct the improvement of species aiming at the production of fruits with resistance fruit finger drop.

Key words: *Musa* spp. Cell wall. RT-qPCR

3.1 Introdução

A banana (*Musa spp.*) é uma das frutas mais consumidas no mundo e constitui-se em uma importante fonte de vitaminas (A, B1, B2, C, D e E), minerais (potássio, fósforo, cálcio e ferro), proteínas e lipídeos (ALVES, 1997; BORGES e SOUZA, 2009).

Em 2012, a produção mundial de banana foi em torno 102 milhões de toneladas, em uma área cultivada de cinco milhões de hectares. Nesse mesmo ano, o Brasil foi considerado o quinto maior produtor mundial, com área plantada de 487 mil hectares e com produção de quase sete milhões de toneladas (FAO, 2015).

O despencamento natural dos frutos é uma das principais desordens fisiológicas que podem ocorrer em bananas, caracterizando-se pelo desprendimento dos frutos da penca ou almofada (DADZIE e ORCHARD, 1997). Esse fenômeno está estreitamente relacionado com o processo de maturação e envolve o amolecimento e enfraquecimento da casca na área de junção do fruto com a penca, chamada de pedicelo (IMSABAI et al., 2006).

De acordo com alguns autores, essa desordem é ocasionada principalmente por fatores genéticos, deficiência nutricional, condições de armazenamento e práticas inadequadas de pós-colheita (SEMPLE e THOMPSON, 1988; PAULL, 1996; CERQUEIRA et al., 2002; SAENGPOOK et al., 2007). Alterações na pectina solúvel em água, um polissacarídeo componente da parede celular, desencadeadas pela atividade de hidrolases, como a poligalactunorase (PG), a pectinmetilesterase (PME) e a pectato liase (PL), também foram associadas ao despencamento (IMSABAI e KETSA, 2007; SAENGPOOK et al., 2007).

O aumento da atividade de enzimas que degradam paredes celulares e o aumento da produção de etileno que ocorrem durante o amadurecimento, são as principais alterações bioquímicas relacionadas ao despencamento (BRADY, 1987). Em virtude disso, alguns estudos têm utilizado ferramentas da Biologia Molecular para tentar identificar a presença destes genes e seu padrão de expressão, especialmente por meio da análise de seus mRNAs.

Mbéguie-A-Mbéguie et al. (2009), estudaram a expressão de vários genes relacionados com a degradação da parede celular durante a maturação dos frutos de bananas triploides do subgrupo Cavendish. De acordo com os autores, os dados da expressão gênica sugerem que o despencamento e o amadurecimento dos frutos, envolvem mecanismos similares e são mais expressos na região do pedicelo onde ocorre o despencamento natural dos frutos.

Hubert e Mbéguie-A-Mbéguie (2012) investigaram a relação entre a biossíntese de etileno durante o amadurecimento na região de ocorrência do despencamento. Foi observada expressão diferencial dos genes envolvidos na biossíntese do etileno na zona de controle (ZC) e na zona de despencamento (ZD). Os autores sugeriram que a biossíntese de etileno durante o amadurecimento é um potencial regulador no processo do despencamento natural dos frutos.

Até o momento, os trabalhos que visam quantificar a expressão de genes relacionados com o amadurecimento e despencamento natural dos frutos de bananeira, foram relatados apenas para bananas triploides do subgrupo Cavendish. O objetivo deste trabalho foi analisar os níveis de expressão de genes envolvidos nos processos de maturação e despencamento natural dos frutos, na região do pedicelo de bananas provenientes de genótipos suscetíveis e resistentes ao despencamento de diferentes ploidias.

3.2 Material e métodos

Material vegetal

Foram utilizados cinco genótipos pertencentes ao banco de germoplasma de bananeira (BAG-Banana) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA (Tabela 1), nos estádios de maturação 4, 5 e 6, de diferentes ploidias e padrões de resistência ao despencamento, para analisar o nível de expressão gênica de genes envolvidos nos processos de maturação e despencamento.

Tabela 1. Genótipos de bananeira indicando o grupo genômico (GG), genealogia e resistência ao despencamento (RD).

Nome	GG	Genealogia	RD
BB França	BB	Diploide silvestre	Resistente
17041-01	AA	Diploide melhorado	Suscetível
BRS Pacovan Ken	AAAB	Híbrido melhorado	Suscetível
BRS Maravilha	AAAB	Híbrido melhorado	Suscetível
BRS Pioneira	AAAB	Híbrido melhorado	Suscetível

Para cada genótipo, foram coletadas amostras de tecidos da região média da casca (zona de controle - ZC) e da área onde ocorre o desprendimento do pedicelo (zona de desprendimento - ZD) (Figura 1) de três frutos, em cada estágio de maturação 4, 5 e 6 (Figura 2). A classificação dos estádios de maturação dos frutos foi baseada na escala de Von Loesecke (1949), sendo selecionados para o estágio 4, frutos mais amarelos do que verdes; amarelo com a ponta verde para o estágio 5 e totalmente amarelo para o estágio 6 (Figura 2).

Cada amostra foi congelada em nitrogênio líquido e estocada em ultrafreezer (- 80 °C) para posterior extração do RNA (Figura 3).



Figura 1. Regiões da casca da banana utilizadas no bioensaio: zona de controle - ZC (região mediana da casca) e zona de desprendimento – ZD (região onde ocorre o desprendimento do pedicelo).



Figura 2. Estádios de maturação: 4 (A), 5 (B) e 6 (C) do genótipo Pioneira.



Figura 3. Esquema da coleta e armazenamento dos tecidos utilizados no bioensaio. (A) Corte da região onde ocorre o desprendimento, (B) Tecidos coletados, (C e D) resfriamento e identificação durante a coleta e (E) acondicionamento final em ultrafreezer - 80 ° C.

Extração do RNA total e síntese da primeira fita (cDNA)

O RNA total foi extraído previamente de acordo com Gambino et al. (2008) e posteriormente tratado com DNase (RNase TURBOfree - Ambion) para assegurar a digestão completa de quaisquer moléculas de DNA contaminante na amostra. A análise de pureza e quantificação de RNA total foi avaliada em gel de agarose 1% e por espectrofotometria usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o RNA total tratado com DNase de acordo com as recomendações do fabricante do kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied biosystems).

Iniciadores utilizados no estudo.

Para o estudo foram selecionados quinze pares de iniciadores, sendo seis endógenos, ou de referência (EF1 MU – F,TUBMU, L2MU, Act11MU, 25SMU e ACTMU) e nove genes alvos (PEL1-SP, EXP1-SP, EXP1-SP, XTH6-SP, ACO1, ACS2, ACS3, PG1-SP, XTH4-SP e ACS1) (Tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica de genótipos de bananeira.

EF1 MU-F	EF	Fator de elongação	F: cggagcgtgaaagaggaat R: accagcttcaaaaccaccag	Padevin et al., 2012
TUBMU	TUB	Beta Tubulina	F:tgttgcatcctggtactgct R: ggctttcttgactggtacac	Padevin et al., 2012
L2MU	L2	Ribonucleoproteína	F:agggtcatagccacaccac R:ccgaactgagaagcccctac	Padevin et al., 2012
Act11MU	ACT11	Actina 11	F: cccaaggcaaaccgagagaag R: gtggctcacaccatcaccag	Padevin et al., 2012
25SMU	25S	25S rRNA	F: acattgtcaggtggggagtt R: cctttgttccacacgagatt	Padevin et al., 2012

Continua...

CONTINUAÇÃO. TABELA2.

ACTMU	ACT	Actina	F: gagaagatacagtgctgga R: attaccatcgaaatattaaaag	Padevin et al., 2012
PEL1-SP	MaPEL1	pectato liase	F: tgatcatttcttctttcag R: tccaagtcaagtagtatcaacaca	Pua et al., 2001
XTH4-SP	MaXTH4	endotransglicosilase xiloglucano	F: cgactgatggctgctggat R: tccatctttacatacaaacggaact	Mbeguie - A - Mbeguie et al., 2009
XTH6-SP	MaXTH6	endotransglicosilase xiloglucano	F: tgctacgaccagcatcgatatggca R: gatggtgatcgtcgacggcacttg	Mbeguie - A - Mbeguie et al., 2009
ACS1	MaACS1	1-aminociclopropano- 1-carboxilato sintase	F: agaactcctcctacttcat R: atgatagtcctgaaagttgg	Rozen e Skaletsky, 2000
ACS2	MaACS2	2-aminociclopropano- 2-carboxilato sintase	F: tgcggccttgctgctggg R: aaaccaccccggttcgctgc	Rozen e Skaletsky, 2000
ACS3	MaACS3	3-aminociclopropano- 3-carboxilato sintase	F: ccgtactatccagggttcgacagg R: gaagtcgacgagggtgtccagtct	Rozen e Skaletsky 2000
PG1-SP	MaPG1	Poligalacturonase	F: tcttcatttcttcttttctgc R: ttagtatgcagcaaattagatcc	Asif et al., 2005
EXP1-SP	α MaEXP1	proteína expansina	F: ggtggaggcattcggtctggt R: gggaggtgacacgatgagaagatg	Trivedi et al., 2004
ACO1	MaACO1	1-aminociclopropano- 1-carboxílico oxidase	F: aagctctacgtcggcataa R: gacagcttcctaacgcaag	Mbeguie - A - Mbeguie et al., 2008

Eficiência dos *primers* e amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Para cada gene, foram conduzidas três repetições biológicas para a zona de despencamento (ZD), um *pool* dos três estádios de maturação (4, 5, e 6) da zona de controle (ZC) (Figura 4) e o controle negativo (água).

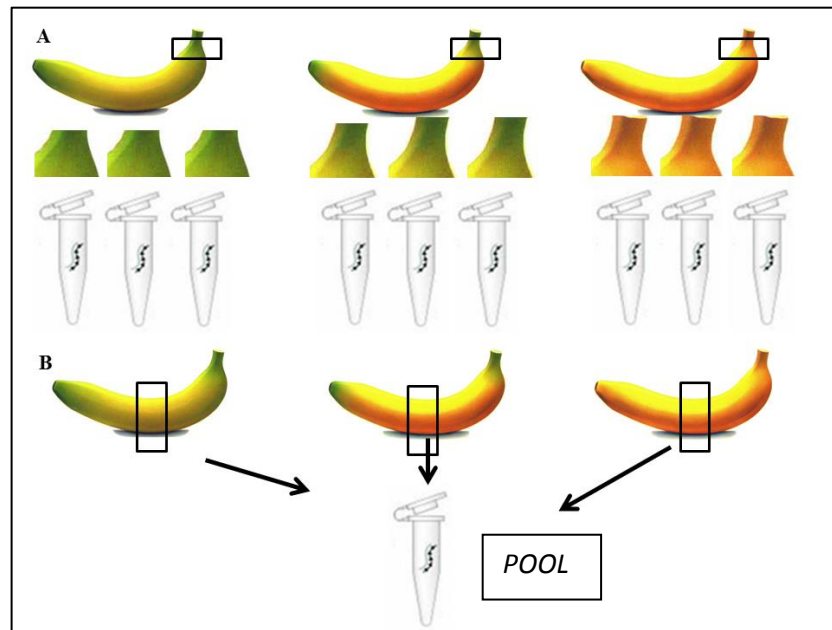


Figura 4. Esquema ilustrativo do bioensaio. (A) triplicadas biológicas dos estádios 4, 5 e 6. (B) formação do *pool* dos controles.

A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada por curva padrão, com cinco diluições seriadas de um *pool* dos cDNAs da zona de controle dos três estádios de maturação do genótipo Pioneira (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64) e pelo coeficiente R^2 resultante. A partir da inclinação da reta obtida, foi realizado o seguinte cálculo:

$Slope = -1/a$, sendo que a é a inclinação da reta obtida.

Com os valores do *Slope* calcula-se a eficiência utilizando-se o seguinte cálculo:

$$Eficiência = 10^{(-1/slope)} - 1$$

Para os primers que apresentaram apenas um produto de amplificação, ou seja, um único pico visualizado na curva de dissociação e com a eficiência entre 80 e 100 %, foram feitas reações com os cDNA dos diferentes estádios de maturação e um *pool* da zona controle provenientes da extração de RNA das amostras do bioensaio. Para cada primer do gene alvo e

do gene de referência, foram utilizados três frutos diferentes (réplicas biológicas), uma triplicata técnica de cada fruto e uma triplicata de controle negativo, o NTC (*No Template Control*) composto pelo mesmo mix utilizado na reação, porém foi adicionado água RNase free ao invés do cDNA

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa utilizando-se a expressão: $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) que se baseia na reação exponencial da PCR e onde QR (Quantificação Relativa) representa o nível de expressão gênica, Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene endógeno (de referência), e $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse em determinado tempo e o ΔCt da amostra de referência (controle).

Os valores dos Ct (*cycle threshold*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica entre os estádios de maturação (4, 5 e 6) e a zona controle (ZC). Os resultados brutos dos Cts das reações de RT-qPCR foram visualizados com o software 7500 v.2.0.4. (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a normalização dos valores de expressão para cada uma das amostras, calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes de interesse de forma relativa aos genes de referência Tubulina e 25S, de acordo com PFAFFL et al. (2002).

As análises de RT-qPCR foram conduzidas no equipamento ABI 7500 Fast *Real-Time PCR* System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reação de RT-qPCR foi realizada em um volume final de 10 μ L contendo 2 μ L de cDNA (100 ng), um par de *primers* (0,4 μ L dos *primers forward+reverse* na concentração de 10 μ M) e 5 μ L de Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG w/ROX kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante e 2,3 μ L de água Miliq autoclavada.

As condições de termociclagem utilizadas na RT-qPCR foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão do *primer* a 58 °C por 60 segundos, seguido de uma curva de dissociação gerada a partir da desnaturação do produto amplificado pelo aumento da temperatura no fim da reação para verificar a especificidade do *primer* (95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e 95°C por 15 segundos) com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. A curva de *melting* foi determinada após o término dos ciclos de reações de cada produto amplificado entre 72 e 95°C.

Análises estatísticas

Para a realização da quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o software ExpressionSuite, versão 1.0.3 que realiza a quantificação comparativa pelo método de “*Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*” (PFAFFL et al., 2002).

3.3 Resultados e Discussão

Extração e quantificação de RNA

As amostras de RNA total extraídas pelo método de Gambino et al. (2008) apresentaram boa integridade dos fragmentos. A Figura 6 representa um gel de agarose 1% com 13 amostras de RNA total.



Figura 6. Análise eletroforética em gel de agarose 1% RNase free de 13 amostras de RNA total do genótipo Pacovan Ken (1-13).

Validação dos genes por RT-qPCR

A curva padrão gerada para cada um dos genes é representada pelo o valor Ct correspondente versus o log da quantidade de cDNA utilizada na reação. A partir do *slope* desta curva, foi possível calcular a eficiência de amplificação (*E*) dos *primers*. Dos 15 pares de *primers* (seis endógenos e nove alvos) submetidos à análise por RT-qPCR, cinco (dois endógenos e três alvos) apresentaram apenas um produto de amplificação observado na curva de dissociação e eficiências entre 80 - 100%.

As temperaturas de dissociação foram de 80,71°C, 84,54°C, 80,71°C, 81,21°C e 78,72°C para 25S, TUBMU, EXP1-SP, PEL1-SP, XTH4-SP, respectivamente. Um exemplo

das curvas de dissociação para 3 genes (um de referência e dois alvos), encontra – se na Figura 7 .

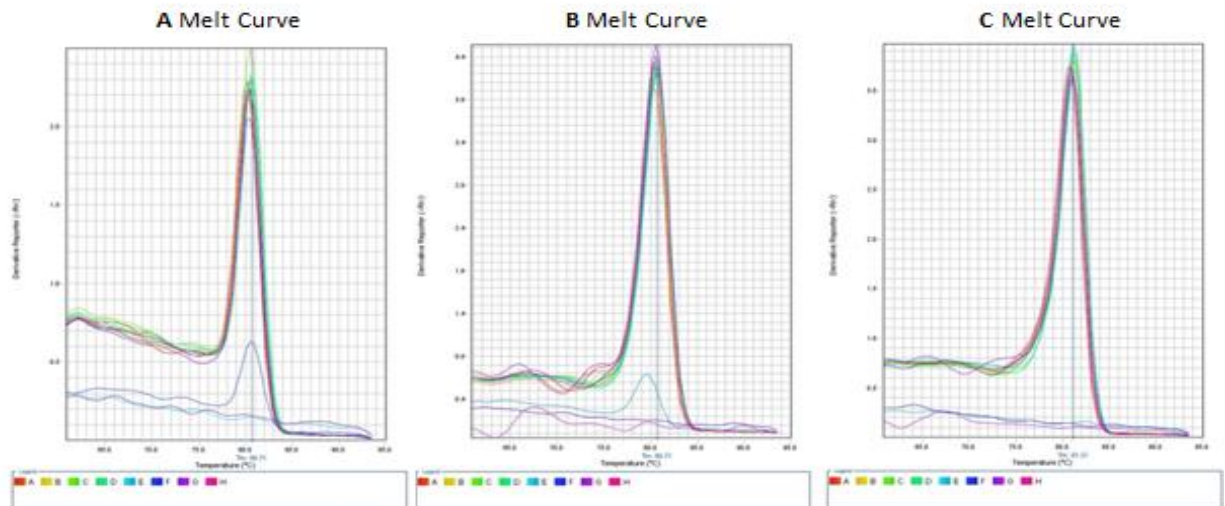


Figura 7. Exemplos de curvas de dissociação dos genes 25SMU(A), EXP1-SP (B), PEL1-SP (C).

Análise de expressão gênica

A região média (Zona de Controle - ZC) do fruto foi usada como controle e os genes de referência *Tubulina* (TUBMU) e *25S* (25SMU), como normalizadores das quantificações. Os valores de expressão menores que 1, que se encontram nos gráficos para a zona de despencamento (ZD), revelam que os transcritos de RNA mensageiro foram menos expressos na ZD do que na ZC.

Expressão gênica da proteína expansina (EXP1)

A expressão do gene EXP1 no diploide BB França (BB) (resistente), foi inferior à do controle para todos os estádios de maturação analisados (Figura. 8, A). Para o diploide 017041-01 (AA) (suscetível), a expressão igualou-se ao controle apenas no E6 (estádio 6 de maturação) (Figura. 8, B). Nos tetraploides suscetíveis, BRS Maravilha (AAAB) e BRS Pioneira (AAAB), a expressão detectada foi inferior ao controle (Figura. 8, C e D). Para BRS Pacovan Ken (AAAB), que é um tetraploide, a expressão do gene EXP1 foi super-expressa

com cerca de 500 x de aumento em relação à expressão da ZC (Figura. 8, E). A BRS Pacovan Ken é uma variedade já conhecida por despencar e o despencamento dos frutos está relacionado com o aumento da temperatura. Na região Sul, por exemplo, essa variedade tende a despencar menos. Entretanto, nas nossas condições de Região Nordeste do Brasil, onde a temperatura média é relativamente alta, essa variedade é considerada uma das mais suscetíveis ao despencamento.

De acordo com Rose et al. (1997), as expansinas, grupo de enzimas extracelulares que modificam diretamente as propriedades mecânicas da parede celular, exercem um importante papel no amaciamento de frutos. O amadurecimento associado às expansinas deve contribuir para a degradação da parede celular por meio do aumento da acessibilidade de outras proteínas modificadoras da parede celular, como as poligalacturonases (PG) e as celulases (ROSE e BENNETT, 1999).

Quanto a expressão gênica, Bummell et al. (1999) detectaram a presença de altos níveis de RNA mensageiro do gene EXP1 durante o amadurecimento do tomate. Em frutos de bananas, os genes EXP1, EXP4 e EXP5 pareceram ser os principais candidatos envolvidos no desprendimento da parede celular relacionada com o despencamento, sendo o EXP1 o principal gene envolvido nesse processo (Mbeguie - A - Mbeguie et al., 2009).

No entanto, não foi observado grande quantidade de transcritos na região de ocorrência do despencamento nos genótipos avaliados, exceto para o genótipo Pacovan Ken.

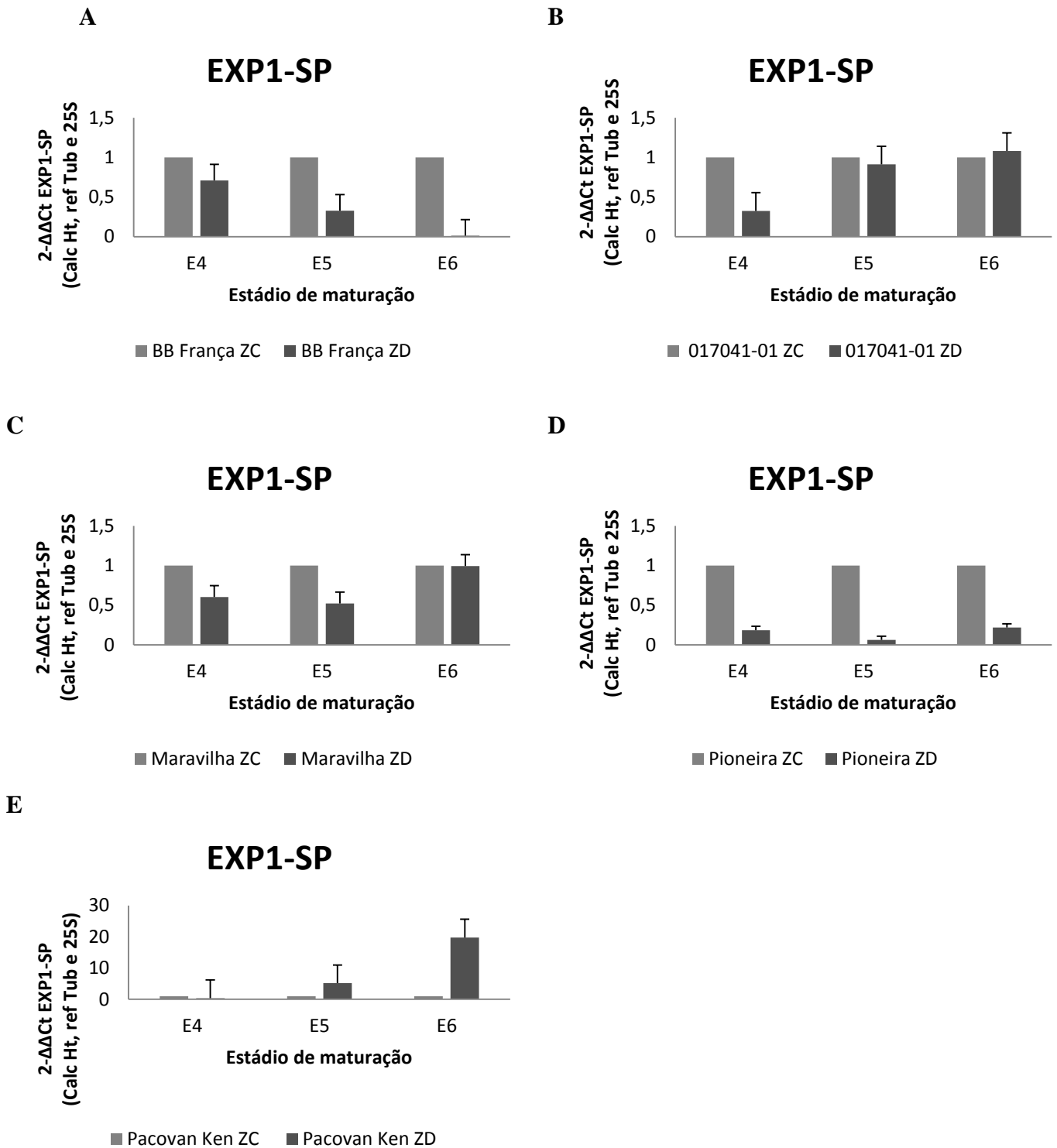


Figura 8. Perfil de expressão relativa do gene proteína expansina (EXP1) em amostras de tecidos da região média da casca (zona controle - ZC) e da área onde ocorre o desprendimento do pedicelo (zona de desprendimento - ZD) nos estádios de maturação E4, E5 e E6 dos genótipos: A) BB França (resistente ao desprendimento); B) 017041-01 (suscetível ao desprendimento); C) Maravilha (suscetível ao desprendimento); D) Pioneira (suscetível ao desprendimento) e E) Pacovan Ken (suscetível ao desprendimento). As quantificações foram normalizadas utilizando os genes de referência *Tubulina* e *25S*.

Expressão gênica da Pectato liase (PEL 1)

A expressão da pectase liase (PEL1) foi menor que a do controle em todos os estádios analisados para o diploide BB França (BB) (resistente) (Figura 8, A). No diploide suscetível ao despencamento, 017041-01 (AA), foi observada maior atividade da enzima no estádio 4, com 5,4 x de expressão do gene da PEL 1 em comparação ao controle. A expressão ficou menor que a do controle em E5 e de 1,5 x mais em E6. (Figura.8, B). Para o tetraploide Maravilha (AAAB), o gene foi expresso aproximadamente 1,6 x a mais que o controle, apenas no E6 (Figura. 9, C). O gene PEL 1 teve sua expressão aumentada ao longo dos estádios de maturação E4 e E6 com 2,27 e 1,59, respectivamente no tetraploide suscetível Pioneira (AAAB) (Figura 9, C). Os maiores valores de expressão foram observados no tetraploide Pacovan Ken (AAAB) (suscetível) nos estádios de maturação E5 e E6 com 5,15 e 19,79, respectivamente (Figura 9, E).

De acordo com Pua et al. (2001) transcritos de pectato liase acumulam-se diferencialmente em tecidos do fruto da bananeira durante a maturação, sendo mais abundantes na casca do que na polpa.

Amnuaysin et al. (2012) observaram aumento da atividade e expressão gênica da enzima pectato liase durante o amadurecimento do fruto da bananeira. Baixos níveis da expressão e atividade da pectato liase, nos estádios iniciais de maturação, e o seu subsequente aumento em estádios mais avançados de maturação, sugerem que a pectato liase pode estar associada com a degradação da pectina, componente principal da parede celular, durante o amadurecimento.

De acordo com Imsabai et al. (2006) existe uma correlação positiva entre a atividade da enzima e pectitato liase (PL) e a região onde ocorre o desprendimento do fruto. Mbéguié-A- Mbéguié et al. (2009) reportaram que houve aumento dos níveis de RNAs mensageiros dos genes reguladores da PL, na zona de despencamento.

Os resultados de expressão relativa demonstram que houve maior aumento nos níveis de RNAs mensageiros nos genótipos suscetíveis, destacando-se os tetraploides BRS Pioneira, BRS Maravilha e BRS Pacovan Ken com valores mais elevados nos estádios de maturação 5 e 6, período em que pode-se observar o despencamento dos frutos.

O gene PEL 1, apresentou resultados em concordância com o grau de despencamento dos genótipos, ou seja, todos expressaram maior quantidade de transcritos em relação à zona de controle, exceto para BB França, genótipo resistente, que confirmou a sua resistência, devido à baixa expressão de transcritos no E6, como era esperado. Esse gene demonstra ser um excelente candidato para os estudos de despencamento em bananeira.

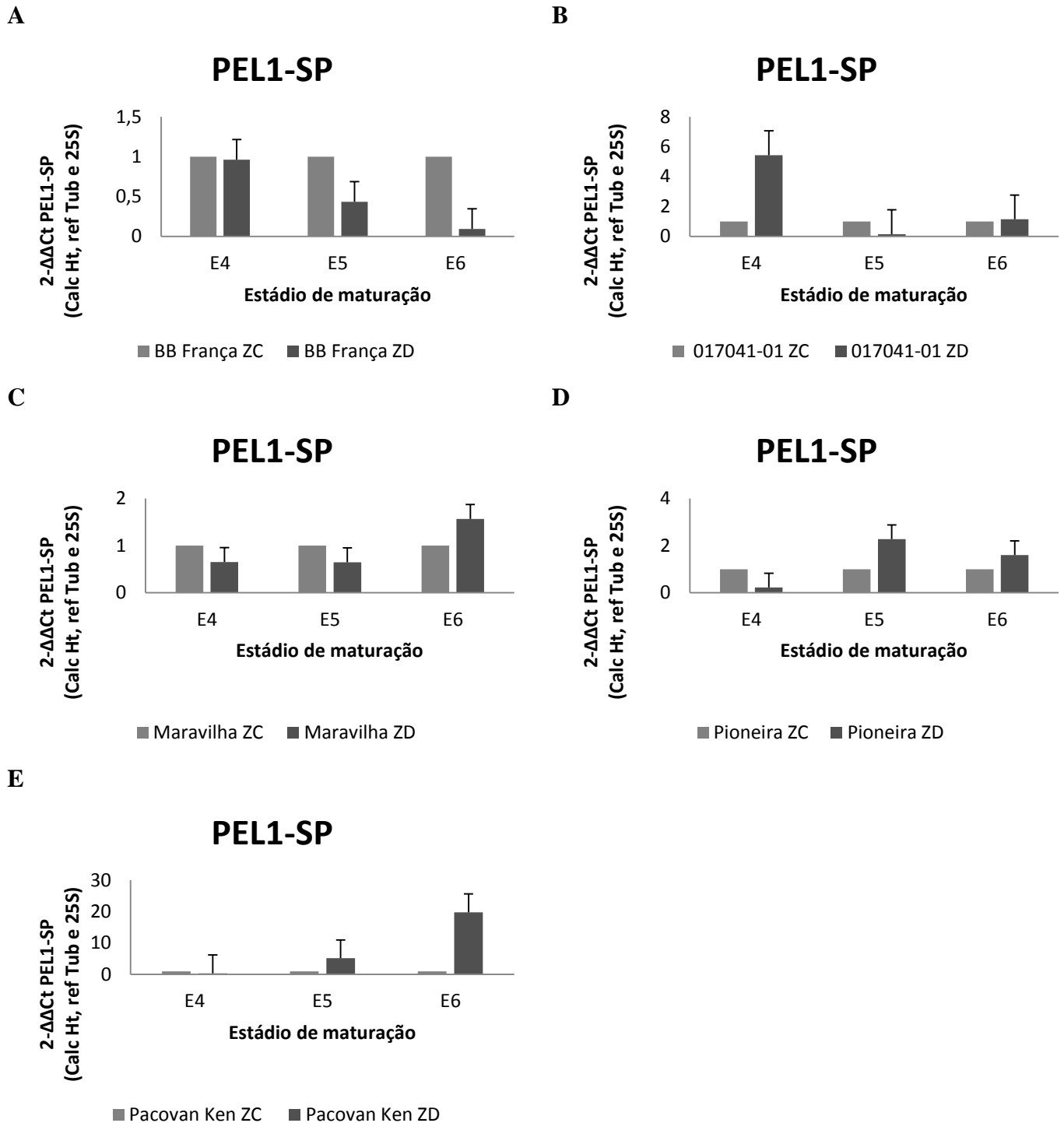


Figura 9. Perfil de expressão relativa do gene Pectato Liase (PEL1) em amostras de tecidos da região média da casca (zona controle - ZC) e da área onde ocorre o desprendimento do pedicelo (zona de desprendimento - ZD) nos estádios de maturação E4, E5 e E6 dos genótipos: A) BB França (resistente ao desprendimento); B) 017041-01 (suscetível ao desprendimento); C) Maravilha (suscetível ao desprendimento); D) Pioneira (suscetível ao desprendimento) e E) Pacovan Ken (suscetível ao desprendimento). As quantificações foram normalizadas utilizando-se os genes de referência *Tubulina* e 25S.

Expressão gênica da endotransglicosilase xiloglucano (XTH4)

Para o gene XTH4, que codifica para a endotransglicosilase xiloglucano, houve expressão aumentada em todos os genótipos, sendo que no E4 do genótipo 017041-01, suscetível, a expressão foi negativa e igualou-se ao controle no E6 do genótipo, suscetível, maravilha. Os maiores valores de expressão relativa foram observados no E6 do genótipo BB França, resistente, no E5 dos genótipos 017041-01 e Maravilha (suscetíveis) e no E4 dos genótipos Pacovan Ken e Pioneira (suscetíveis) (Figura 10).

Genes modificadores de hemiceluloses têm sido relatados no amolecimento de frutos de morango, já que o aumento da transcrição desses genes está relacionado com a diminuição da firmeza dos frutos (OPAZO et al., 2010). Alguns autores também sugeriram que as proteínas XTHs poderiam exercer um papel no amolecimento de kiwi e maçã (ATKINSON et al, 2009). Aumento nos níveis de expressão do gene XTH foi reportado por Arrowsmith e Silva (1995) durante processos que envolvem a degradação da parede celular durante o amadurecimento do tomate.

De acordo com Mbégué-a-Mbégué et al. (2009), o envolvimento da síntese de xiloglucano e a degradação da parede celular mediada por proteínas Xth não pode ser excluída no processo do despencamento natural dos frutos de bananeira. Os mesmos autores observaram maiores níveis de expressão do gene XTH durante a maturação e o despencamento de bananas Cavendish.

De acordo com os resultados das análises comparativas da expressão de genes modificadores da parede celular na ZD e ZC, o gene XTH4 foi o que obteve maior pico de expressão na ZD em todos os genótipos analisados, obtendo, assim, perfil de expressão relacionado com o despencamento dos frutos nos diferentes genótipos. Fato que o torna um bom candidato para estudos funcionais em bananeira

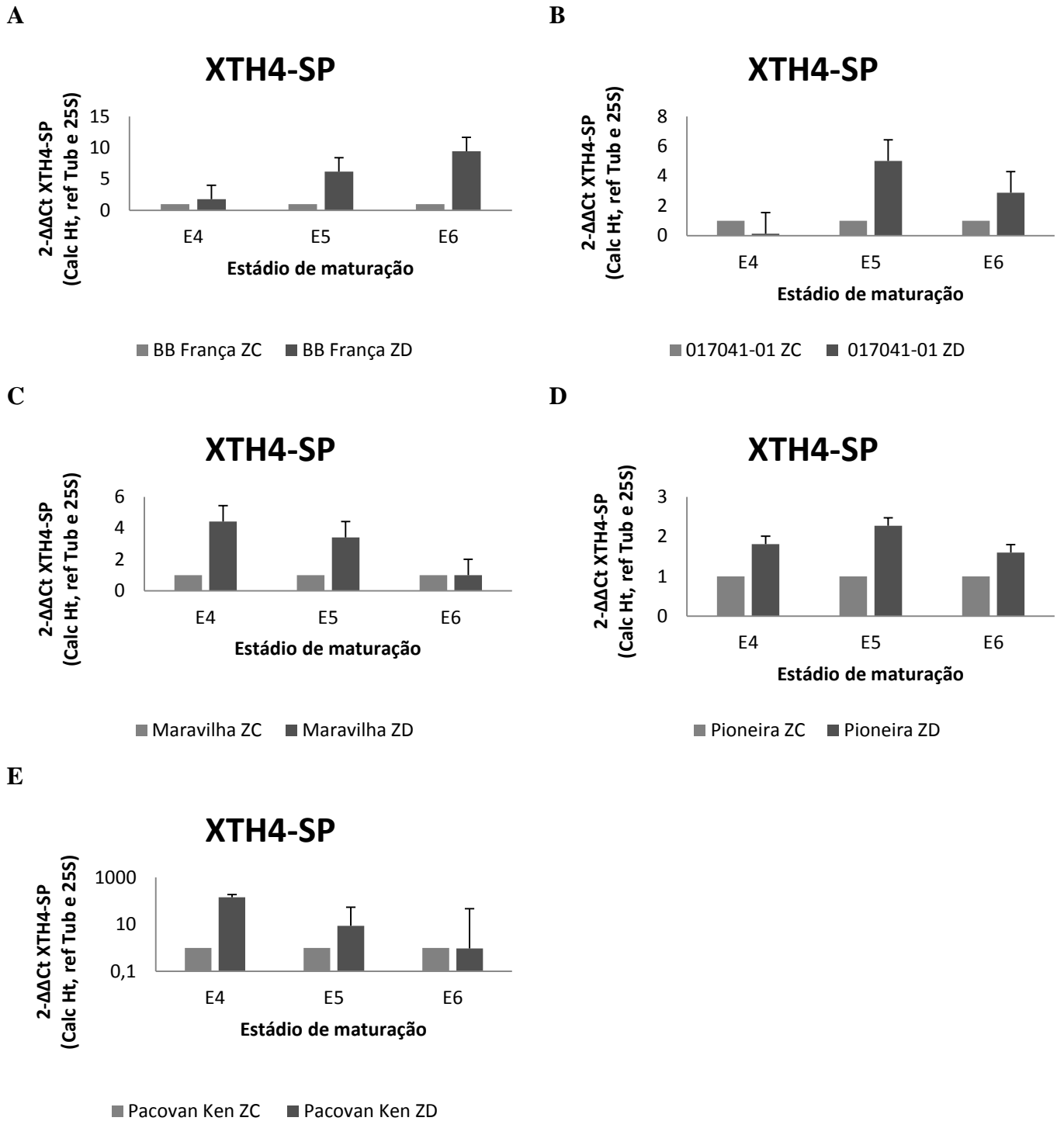


Figura 10. Perfil de expressão relativa do gene A endotransglicosilase xiloglucano (XTH4) em amostras de tecidos da região média da casca (zona controle - ZC) e da área onde ocorre o desprendimento do pedicelo (zona de despencamento - ZD) nos estádios de maturação E4, E5 e E6 dos genótipos: A) BB França (resistente ao despencamento); B) 017041-01 (suscetível ao despencamento); C) Maravilha (suscetível ao despencamento); D) Pioneira (suscetível ao despencamento) e E) Pacovan Ken (suscetível ao despencamento). As quantificações foram normalizadas utilizando os genes de referência *Tubulina* e *25S*.

3.4 Conclusões

Há expressão diferencial dos genes estudados entre os estádios de maturação e os diferentes genótipos;

Os diploides, BB França e 017041-01, obtiveram expressões similares aos dos tetraploides, Pioneira e Maravilha;

Os Genes PEL1 e XTH4 obtiveram perfis de expressão relacionados ao despencamento em diferentes genótipos sendo bons candidatos para estudos funcionais em bananeira;

O gene PEL1 demonstra ser um excelente candidato para os estudos de despencamento em bananeira, podendo ser utilizado para direcionar o programa de melhoramento da cultura visando à produção de frutos com resistência para essa característica.

Referências

- ALVES, E. J. (Org.). A cultura da banana: aspectos técnicos socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: SPI/ Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP, p. 585, 1997.
- AMNUAYSINA, N.; JONESC, M. L.; SERAYPHEAP, K. Changes in activities and gene expression of enzymes associated with cell wall modification in peels of hot water treated bananas. **Scientia Horticulturae**, v. 142, n.1, p. 98–104, 2012.
- ARROWSMITH, D.A., DE SILVA, J. Characterization of two tomato fruit expressed cDNAs encoding xyloglucan *endo*-transglycosylase. **Plant Molecular Biology**, v. 28, p. 391–403, 1995.
- ASIF, M e NATH, P. Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 177–184, 2005.
- ATKINSON, R.G.; JOHNSTON, S.L.; YAUK, Y.K.;SHARMA, N.N.; SCHRODER, R. Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p.149–157, 2009.
- BORGES, A. L; SOUZA, L, S. Nutrição e adubação na cultura da banana na região Nordeste do Brasil. In: GODOY, L. J. G; GOMES, J. M. Tópicos sobre nutrição e adubação da banana. Botucatu/ SP: FEPAF/UNESP, 2009.
- BRADY, C.J. Fruit ripening. *Annual Reviews in Plant Physiology*, 38, 155–178, 1987.
- BRUMMELL, D. A.; HARPSTER, M. H.; DUNSMUIR, P. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. **Plant Molecular Biology**, v. 39, n.1, p. 161–169, 1999.
- CERQUEIRA, R. C; SILVA, S. O; MEDINA, V. M; Características pós-colheita de frutos de genótipos de bananeira (*Musa* spp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, São Paulo, v.24, n.3, p. 654-657, 2002.
- DADDZIE, B. K.; ORCHARD, J. E. Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. Roma: IPGRI, 63 p. Guias técnicas Inibap, 2, 1997.
- GAMBINO, G., PERRONE, I., GRIBAUDO, I. A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants. **Phytochemical Anayses**. v. 19, n. 6, p. 520–525, 2008.
- HUBERT, O.;MBÉGUIE´-A-MBÉGUIE, D. Expression patterns of ethylene biosynthesis genes from bananas during fruit ripening and in relationship with finger drop. **AoB PLANTS**, v.41, p. 1-10, 2012.
- IMSABAI, W e KETSA, S. The structure and biochemical changes during finger drop in ripening bananas. **Thai Journal of Agricultura Sciense**, v. 40, n. 3-4, p. 127 – 132, 2007.

- IMSABAI, W.; SAICHOL, K.; DOORN, W. Physiological and biochemical changes during banana ripening and finger drop. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, n.2, p. 211-216, 2006.
- KENDE, H.; BRADFORD, K.; BRUMMELL, D.; CHO, H. T.; COSGROVE, D. J.; FLEMING, A. J.; GEHRING, C.; LEE, Y.; MCQUEEN-MASON, S.; ROSE, J. K. C.; VOESENEK, L. AC. J. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 55, n.3, p. 311-314, 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; HUBERT.; FILS-LYCAON, B.; CHILLET, M.; BAURENS, F. C. EIN3-like gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Grande naine). **Physiologia Plantarum**, v, 133, p. 435–448, 2008.
- MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; HUBERT, O.; BAURENS, F. C.; MATSUMOTO, T.; CHILLET, M.; FILS-LYCAON, B.; SIDIBÉ-BOCS, S. Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 7, p.2021 -2034, 2009.
- OPAZO, M.C., FIGUEROA, C.R., HENRÍQUEZ, J., HERRERA, R., BRUNOB, C., VALENZUELA, P.D.T., MOYA-LEÓN, M.A. Characterization of two divergent cDNAs encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) expressed in *Fragaria chiloensis* fruit. **Plant Science**. v. 179, n.5, p. 479 - 488, 2010.
- PODEVIN, N.; KRAUSS, A.; HENRY, I.; SWENNEN, R.; REMY, S. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop *Musa*. **Molecular Breeding**, v. 30, p. 1237–1252, 2012
- PAULL, R. E. Ethylene, storage and ripening temperatures affect Dwarf Brazilian banana finger drop. **Postharvest Biology and Tecnology**, v. 8, n.1, p. 65-74, 1996.
- PUA, E.C., ONG, C.K., LIU, P., LIU, J.Z. Isolation and expression of two pectate lyase genes during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*). **Physiologia. Plantarum**, v. 113, n. 1, p. 92–99, 2001.
- PFAFFL, M. W. et al. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **NucleiAcids Research**, v. 30, 2002.
- ROSE, J. K. C e BENNETT, A. B . Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends Plant Science**. v.4, n.5, p. 176-183, 1999.
- ROSE, J. K. C.; Lee, H.H.; e BENNETT, A. B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening regulated. **Palnt Biology**, v. 94, n. 11, p. 5955-5960, 1997.
- SAENGPOOK, C.; KETSA, S.; DOORN van, W. G. Effects of relative humidity on banana fruit drop. **Postharvest Biology and Tecnology**, v. 45, n.1, p. 151-154, 2007.

SANWAL, G.G e PAYASI, A. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. **Phytochemistry**, v. 63, n.3, p. 243–248, 2003.

SEMPLE, A. J.; THOMPSON, A. K. Influence of the ripening environment on the development of finger drop in bananas. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 46, n.2, p. 139-146, 1988.

TRIVEDI. P.; K e NATH, P. MaEXP1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit. **Plant Science**, n. 167, p. 1351–1358, 2004.

VON LOESECKE, H. W. Bananas, chemistry, physiology and technology. New York: Interscience Publishers, 1949.

Conclusões Gerais

Os marcadores SSRs foram capazes de detectar variabilidade genética entre os genótipos diploides analisados. No entanto, Não foi observada correlação entre os grupos formados pelo método UPGMA e o grau de despencamento dos frutos;

O teste não paramétrico revelou possibilidade de associação entre bandas ISSRs e a variável RD (Resistência ao despencamento);

Estudos anatômicos confirmaram a fragilidade dos tecidos de genótipos suscetíveis. O genótipo 017041-01 apresentou grande quantidade de parênquima aerífero, característica não evidenciada nos genótipos resistentes BB França, Khai Nai On e BRS Preciosa.

No que diz respeito às análises comparativas da expressão de genes modificadores da parede celular na ZD e ZC, os genes PEL1 e XTH4 mostraram perfis de expressão relacionados com o despencamento dos frutos em diferentes genótipos. O gene PEL1 demonstra ser um excelente candidato para os estudos de despencamento em bananeira, podendo ser utilizado para direcionar o programa de melhoramento da cultura visando à produção de frutos com resistência para essa característica.

A ploidia não mostrou correlação com os resultados da expressão relativa, uma vez que os diploides, BB França e 017041-01, obtiverem expressões similares aos dos tetraploides, BRS Pioneira e BRS Maravilha.