UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA GENES POTENCIALMENTE RELACIONADOS A RESPOSTAS DE DEFESA A ESTRESSE BIOTICO EM *MUSA SP.*

MICHELINE DO AMARAL DIAS

Brasília – DF

Junho, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA GENES POTENCIALMENTE RELACIONADOS A RESPOSTAS DE DEFESA A ESTRESSE BIOTICO EM *MUSA SP.*

Orientadores:

Robert Neil Gerard Miller, Biólogo, Ph.D. (Instituto de Biologia – UnB).

Vânia Cristina Rennó Azevedo, Bióloga, Ph.D. (Embrapa).

Brasília – DF

Junho, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA GENES POTENCIALMENTE RELACIONADOS A RESPOSTAS DE DEFESA A ESTRESSE BIOTICO EM *MUSA SP.*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília, na área de melhoramento genético vegetal, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:

_____

Robert Neil Gerard Miller, Ph.D.

Professor do IB – UnB

_____

Vânia Cristina Rennó Azevedo, Ph.D.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

_____

Nara de Oliveira Silva Souza, Ph.D.

Professora da FAV-UnB

Brasília, Junho de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Micheline do Amaral

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA GENES POTENCIALMENTE RELACIONADOS A RESPOSTAS DE DEFESA A ESTRESSE BIOTICO EM *MUSA SP.*

Orientação: Robert Neil Gerard Miller, Brasília 2017. 42 folhas. Monografia de Graduação (G) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Micheline do Amaral Dias

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA GENES POTENCIALMENTE RELACIONADOS A RESPOSTAS DE DEFESA A ESTRESSE BIOTICO EM *MUSA SP.*

Grau: Engenheiro Agrônomo

Ano: 2017

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

_____

Micheline do Amaral Dias

Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará. Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei. Porque ele te livrará do laço do passarinheiro, e da peste perniciosa.

Salmo 91

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por ter me dado saúde e a oportunidade de realizar este sonho.

Agradeço à toda a minha família, especialmente aos meus avós, Maria Camilo de Castro e Baltazar Basílio do Amaral, pela força, amor e apoio e por sempre acreditarem no meu potencial.

Agradeço aos meus orientadores Robert Neil Gerard Miller e Vânia Cristina Rennó Azevedo, por me orientarem e me transmitirem preciosos conhecimentos.

Agradeço a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e aos técnicos do Laboratório de Genética Vegetal, pelo apoio ao desenvolvimento da minha pesquisa.

À Universidade de Brasília, por me acolher e me auxiliar para que eu conseguisse concluir meu curso.

Agradeço à todos os meus professores, por me transmitirem conhecimentos necessários para minha vida profissional.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acessos diplóides (AA) de *M. acuminata* contrastantes em resistência à doenças causadas por *Mycosphaerella sp.* selecionados para a validação de marcadores moleculares SSR. Fonte: adaptado de Passos *et al.,* 2012.....Página 27.

Tabela 2. Informação das sequências de primers SSR derivados de *M. acuminada DH Pahang*.....Página 28.

Tabela 3. Resultado de análise feita no Software Power Marker para os 7 marcadores polimórficos encontrados.....Página 34.

Tabela 4. Resultado das análises quanto ao comportamento dos 39 pares de *primers*.....Página 34.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quantificação de DNA dos 19 acessos de *Musa*.....Página 26.
Figura 2. Otimização de temperatura de anelamento de *primers*, aplicadas nos 4 *bulks* de DNA.....Página 29.
Figura 3. Polimorfismo encontrados no par de primer LOCUS 1 (A) no par de primer LOCUS 4 (B).....Página 33.

SUMÁRIO

1. Introdução....10
2. Referencial Teórico....12
2.1 A Descoberta do DNA....12
2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)....12
2.3 Marcador Molecular Microssatélite (SSR)....13
2.4 Eletroforese....15
2.4.1 Uso de Géis de poliacrilamida....16
2.4.2 Uso de Géis de Agarose....16
2.5 Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura....17
2.6 Conceito de Doença....18
2.6.1 Sigatoka Amarela – *Mycosphaerella musicola*....18
2.6.2 Sigatoka-Negra – *Mycosphaerella fijiensis*....20
2.7 Genes de Resistência....22
2.8 Melhoramento genético em *Musa*....22
3. Objetivos....24
3.1 Objetivos Gerais....24
3.2 Objetivos Específicos....24
4. Material e Métodos....25
4.1 Quantificação de DNA....25
4.2 Diluição de DNA....26
4.3 Amplificação de DNA....26
4.4 Método de Avaliação....29
4.4.1 Detecção de polimorfismos microssatélites em géis de poliacrilamida desnaturante....29
4.4.2 Preparação das placas - Protocolo de gel de poliacrilamida 5%....30
4.4.3 Montagem das placas....30
4.4.4 Aplicação da poliacrilamida....30
4.4.5 Pré-corrida....31
4.4.6 Aplicação das amostras....31
4.4.7 Revelação com prata....31
4.5 Análise Estatística....32
5. Resultados e Discussões....33
6 Conclusões....36
7 Referências Bibliográficas....37

1. INTRODUÇÃO

A bananeira é classificada como membro da classe *Liliopsida* (monocotiledôneas), subclasse *Zingiberidae*, ordem *Zingiberales*, família *Musaceae* e gênero *Musa*. O gênero *Musa* é dividido nas sessões *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* e *Eumusa*, sendo essa última, onde se encontram as espécies comerciais conhecidas. A maioria dos cultivares é obtida a partir de duas espécies, *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B) (Salomão e Siqueira, 2015).

Diversas cultivares de banana são cultivadas na maioria dos países de clima tropical. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), em 2012 o volume das exportações de bananas global atingiu um recorde de 16,5 milhões de toneladas, 1,1 milhões de toneladas (ou 7,3 por cento) acima do nível de 2011. A banana é a segunda fruta mais consumida no Brasil, perdendo apenas para a laranja. Em relação ao seu papel social, a cultura é explorada por pequenos empresários rurais, permitindo a fixação de mão-de-obra no campo, uma vez que se constitui em fonte de renda contínua para estes agricultores (Amorim, et al., 2009).

Sua reprodução assexuada resultou em uma base genética restrita, com pouca resistência à pragas e doenças na maioria das variedades comerciais. A bananeira é atacada por mais de 50 patógenos fúngicos, bacterianos, virais, nematóides e insetos. Entre os fungos de maior importância são os agentes causais da Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola*, Leach) e Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) (Silva, 2013).

As estratégias de melhoramento não convencionais, como a transformação e seleção assistida por marcadores genéticos, oferecem uma abordagem alternativa para a introgressão de genes de resistência em cultivares comerciais. Microssatélites podem ser detectados em sequências de genes e os polimorfismos podem ser detectados utilizando *primers* complementares às sequências conservadas que flanqueiam essas repetições (Holland et al., 2001). Esses marcadores moleculares são ferramentas úteis para ensaios de variação genética e fornecem um meio eficiente para ligar variação fenotípica e genotípica (Kalia et al., 2011). A biotecnologia e a engenharia genética tem grande potencial para o melhoramento de plantas, uma vez que diminuem o tempo necessário para produzir variedades de culturas com caracteres desejáveis. Com a utilização de técnicas de biologia molecular é possível acelerar a transferência de genes desejáveis entre variedades e introduzir novos genes de espécies selvagens relacionadas. Caracteres poligênicos que antes eram muito difíceis de analisar por métodos tradicionais de melhoramento de plantas, agora são facilmente analisados utilizando marcadores moleculares (Mohan et al., 1997).

Os microssatélites podem ser utilizados para diferentes fins, como por exemplo evolução, taxonomia, saturação de mapas genéticos e seleção assistida por marcadores (SAM) quando co-localizados com QTLs de resistência, Apesar do desenvolvimento recente de marcadores microssatélites em *M. acuminata* e *M. balbisiana*, contudo, em comparação com outras espécies cultivadas, o número total disponível para as análises genéticas continua a ser limitada, uma vez que os alelos podem estar ausentes ou possuírem características monomórficas, quando testados nos diferentes cultivares (Miller et al., 2010).

2. Referencial Teórico

2.1 A descoberta do DNA

Em 1953, Watson e Crick forneceram o modelo para a estrutura do DNA e a partir desse momento, vários estudos puderam ser realizados, resolvendo em nível molecular o processo da hereditariedade. Com isso, a estrutura do DNA pode ser descrita, sendo composta por nucleotídeos, unidos por ligações de hidrogênio (dupla ou tripla), formando fita dupla em formato de hélice. Os nucleotídeos são formados por um açúcar desoxirribose de cinco carbonos, aos quais um ou mais grupos fosfatos estão ligados e uma base nitrogenada, esta base pode ser Adenina, Citosina, Guanina ou Timina. Os genes contêm informações biológicas que devem ser copiadas com precisão para serem transmitidas às próximas gerações cada vez que a célula se divide para formar duas células-filhas. Os organismos diferem-se um dos outros porque suas respectivas moléculas de DNA possuem diferentes sequências de nucleotídeos e com isso, carregam diferentes informações biológicas. A variação epigenética é outro fator pelo qual os indivíduos diferem em suas características, por possuírem modificações do genoma que são herdadas pelas gerações seguintes sem alterar a sequência do DNA. A herança epigenética depende de pequenas mudanças químicas no DNA e em proteínas que envolvem o DNA. Com isso, existem evidências científicas mostrando que hábitos da vida e o ambiente em que um organismo vive, podem modificar o funcionamento de seus genes (Alberts, et al., 2010).

2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O avanço das técnicas de Biologia Molecular tem revolucionado os conhecimentos sobre o genoma, quanto a sua estrutura, expressão e função. Entretanto, um fator limitante sempre foi a pequena quantidade de material (DNA) disponível para análises. O método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi proposto por Saiki e Cols, em 1985, o que permitiu um grande avanço em análises de DNA. Tendo como princípios básicos a ligação de oligonucleotídeos (*primers)* à região específica da molécula de DNA e a ação de uma enzima chamada DNA polimerase. Com isso, foi possível amplificar um número ilimitado de sequências alvo, as quais podem ser estudadas por métodos convencionais de análise do DNA. Na PCR, além desta enzima, são utilizados os quatro nucleotídeos e um par de *primers* (iniciadores constituídos de 10pb a 20pb) que flanqueiam a região a ser amplificada. Estes *primers* são utilizados para direcionar a síntese do DNA, em ciclos repetidos. Em cada ciclo, as fitas servem de molde para a geração de novas fitas (Silva, 2001).

A desnaturação é a primeira etapa da PCR e consiste em aquecer a reação a 94-98 ºC por 20-30 segundos, como objetivo de separar a fita dupla do DNA em duas fitas simples. A separação da fita dupla do DNA em duas fitas simples permite que os *primers* se encaixem na região complementar à sua sequência (anelamento). Ao fim da etapa de desnaturação do DNA (separação da fita dupla), dá-se início a uma nova etapa da PCR, o anelamento dos *primers*. Na etapa de anelamento dos *primers*, a temperatura que estava entre 94 e 98ºC diminui e permanece entre 48 e 72ºC por 20-60 segundos e consiste na ligação dos *primers* nas respectivas sequências complementares da região-alvo do DNA. A extensão geralmente é realizada entre 68-72ºC, uma faixa de temperatura ideal para o funcionamento da maioria das Taq polimerase encontradas no mercado. A extensão final é geralmente realizada a 72ºC por um período de 5 a 15 minutos. Isso é fundamental para que o DNA de fita simples seja totalmente estendido (Pinho, et al., 2016).

No início da utilização da técnica de PCR, era preciso a adição da enzima a cada novo ciclo da reação, devido à sua desnaturação em altas temperaturas, perdendo a sua eficiência rapidamente. Isso tornava o processo demorado, trabalhoso e sujeito a erros, até que em 1988 foi descoberta a DNA polimerase termotolerante (Taq polimerase), proveniente da bactéria *Thermus aquaticus* que sobrevive a temperaturas de 70-75ºC em fontes de água quente no Parque Nacional de Yellowstone, nos Estados Unidos (Pinho, et al., 2016).

2.3 Marcador Molecular Microssatélite – MMM

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do ácido desoxirribonucleico (DNA), culminando com o surgimento dos rnarcadores moleculares na década de 1980. Além das vantagens apresentadas sobre os marcadores morfológicos, as tecnologias existentes fornecem um número praticamente ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma, de forma automatizada e a custos cada vez mais reduzidos (Guimarães et al., 2009).

O genoma dos eucariotos e procariotos contém sequências repetitivas que podem ser utilizadas como marcadores de DNA. As sequências simples repetidas SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STMS (*Sequence Tagged Microssatellite Site*), também denominados microssatélites, são um dos marcadores mais polimórficos encontrados hoje nos genomas de animais e plantas. Marcadores SSR são caracterizados por uma sequência de 1 a 6 nucleotídeos, que pode estar repetida em tandem. Estas repetições surgem provavelmente de “escorregões” da enzima DNA polimerase durante a replicação do DNA, da recombinação desigual ou do alinhamento incorreto das fitas de DNA (Tachida et al., 1992).

Para se conseguir marcadores microssatélites, é necessário, primeiramente, o desenvolvimento dos *primers* específicos para a espécie em estudo. Esse desenvolvimento requer a construção de uma biblioteca genômica, seleção e sequenciamento dos clones positivos e desenhos dos *primers*. Tais *primers*, em alguns casos, podem ser utilizados para obtenção de marcadores microssatélites em espécies geneticamente relacionadas.

Além do uso de marcadores moleculares microssatélites para estudos genômicos, as novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração, estão sendo amplamente utilizadas para estudos com mesmos fins. Tais tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única análise. Dentre as novas plataformas de sequenciamento, duas já possuem ampla utilização em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a *Solexa da Illumina*. Outros dois sistemas de sequenciamento que começam a ser utilizados são a plataforma da *Applied Biosystems*, denominada *SOLiD System*, e o *HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing* (tSMS), da Helicos. Essas novas plataformas possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento. Essa maior eficiência advém do uso da clonagem in vitro e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis. A clonagem in vitro em suporte sólido permite que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez com a plataforma 454, *Solexa* ou *SOLiD* (Carvalho et al., 2010).

As principais vantagens dos marcadores microssatélites são a co-dominância dos marcadores, o alto nível de polimorfismo que pode ser detectado, a alta reprodutibilidade das marcas e a possibilidade de detecção de vários microssatélites (multiplex) no mesmo gel, facilitando a operacionalização das análises, principalmente, quando é necessária a análise de grande número de acessos. As principais desvantagens podem ser o alto custo requerido no desenvolvimento de *primers* específicos, quando eles não estão disponíveis para a espécie a ser estudada e o fato de bandas inespecíficas ou géis de baixa resolução poderem dificultar a acurada avaliação dos polimorfismos (Faleiro, 2007).

2.4 Eletroforese

O termo eletroforese foi introduzido por Michaelis em 1909, para descrever o movimento de colóides sob a influência de um campo elétrico. Esta técnica de separação baseada na migração de moléculas carregadas foi realizada por Arne Tiselius, pela primeira vez, em 1937, onde criou o método denominado eletroforese em campo livre. Este método era bastante limitado devido à instabilidade do equipamento, e principalmente, pelos efeitos de difusão e aquecimento gerados pelo campo elétrico, os quais comprometiam a separação dos compostos. Estes efeitos foram minimizados com a introdução de um suporte (gel ou papel) que ajudou a conter o movimento livre das moléculas, de forma que o efeito da difusão fosse reduzido (Bastos e Masson, 2013).

O princípio físico-químico que norteia a eletroforese é a capacidade de moléculas carregadas migrarem sob influência de um campo elétrico. Esta migração segue a Lei de Coulomb, onde partículas de carga positiva migram para o pólo negativo (catodo) e partículas de carga negativa migram para o pólo positivo (anodo). A velocidade de migração das moléculas é proporcional ao campo elétrico e inversamente proporcional ao seu volume molecular. Assim, uma amostra submetida à eletroforese terá cada molécula constituinte localizada em uma zona do gel, onde moléculas com menor peso molecular irão migrar mais rapidamente e as que possuem maior peso molecular irão migrar mais lentamente. O objetivo principal desta técnica é separar moléculas orgânicas, como DNA, RNA e proteínas, de acordo com sua carga elétrica e volume molecular. Atualmente existem três modelos mais utilizados de eletroforese, um baseado em gel de agarose, outro em gel de poliacrilamida e por fim, outro realizado no sequenciador automático de DNA (De-Souza, 2003).

Dois componentes básicos são necessários para se realizar uma eletroforese: um campo elétrico (obtido através de uma fonte de corrente contínua) e a própria molécula carregada. Para visualização das moléculas separadas (na forma de bandas eletroforéticas) são utilizados corantes específicos para proteínas, como *Coomassie Blue*, e soluções específicas contendo os componentes necessários (substratos, coenzimas, solução-tampão e sais) para revelação das bandas de atividade enzimática. No caso de moléculas de DNA e RNA, diversos sistemas de revelação de bandas são empregados, no caso do corante brometo de etídio, a detecção da amostra é feita através da fluorescência emitida por esse corante em presença da luz ultravioleta. As bandas podem ser detectadas também por radioatividade, nitrato de prata ou quimiluminescência (Moraes, et., 2013).

Na técnica, utiliza-se uma cuba com dois compartimentos separados. Os eletrodos determinam os polos positivo e negativo em cada compartimento, onde é adicionada uma solução-tampão com sal, que conduz eletricidade. O gel é montado entre os dois compartimentos de tal forma que a única conexão elétrica entre os compartimentos seja através do gel de poliacrilamida com a solução. Todo o processo de eletroforese é realizado empregando uma solução-tampão apropriada, a qual é essencial para manter um estado constante de ionização das moléculas a serem separadas (Moraes, et., 2013).

2.4.1 Uso de Géis de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica amplamente usada para a separação de biomoléculas, tais como os ácidos nucléicos e as proteínas. Os géis de poliacrilamida são constituídos pela polimerização da acrilamida e apresentam poros de dimensões moleculares, sendo que a separação nessas malhas é baseada tanto nos princípios da filtração em gel, como na mobilidade eletroforética das moléculas. Nesse sentido, nesse tipo de eletroforese, as grandes moléculas têm sua migração retardada com relação às moléculas de menor tamanho (Pereira, 2003).

Na maioria dos casos, o tampão nos reservatórios da cuba de eletroforese apresenta pH e força iônica diferentes do tampão usado para confeccionar o gel (sistema descontínuo). Depois de aplicada, a amostra é arrastada por uma fronteira de íons em movimento, que é criada quando a corrente elétrica passa através dos eletrodos, do polo negativo em direção ao polo positivo (Pereira, 2003).

2.4.2 Uso de Géis de Agarose

A agarose é um polímero linear extraído de algas marinhas e o gel é formado por uma complexa rede desse polímero. O polímero é fundido na presença de solução tampão adequada até que se obtenha uma preparação transparente e homogênea. Com temperatura próxima a 60ºC, a solução é transferida para um molde utilizado para o preparo do gel. Durante a corrida, moléculas de DNA maiores, migram mais lentamente do que as moléculas menores, outros fatores também afetam a migração das moléculas de DNA como a concentração de agarose e o tipo de marcador molecular utilizado (De-Souza, 2003).

Assim, quanto maior a molécula, maior o tempo de migração, possibilitando a separação dos fragmentos (Magalhães, 2005). Após o término da eletroforese, os produtos da PCR podem

ser visualizados sob luz ultravioleta em um fotodocumentador com a ajuda de um corante (Brometo de Etídio, Gel *Red*, etc.) (Pinho, et al., 2016).

A eletroforese é realizada com uma fonte de alimentação que fornece uma corrente contínua entre os eletrodos (catodo e anodo) na unidade (cuba) de eletroforese. Toda a eletroforese é realizada com tampão apropriado, onde o gel fica submerso, sendo essencial para manter um estado constante de ionização das moléculas a serem separadas (J. Walker, 2009). Na prática, um gel de agarose a 0,8% é apropriado para separação de fragmentos de 0,5 até 20-30 kb, aproximadamente. Géis com maiores concentrações (2,5 até 3%) separam fragmentos menores (80 até 500 pb). Géis de agarose a 0,5% separam fragmentos com até 50 kb, porém, são bastante frágeis e o tempo de corrida é excessivamente demorado (Magalhães, et al., 2005).

2.5 Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura

No Brasil pode ser encontrado grande número de germoplasmas, podendo eles estar concentrados em centros de programas de melhoramento genético da bananeira. Um deles é o programa iniciado na Embrapa Mandioca e Fruticultura em 1983, em baseia-se principalmente no melhoramento de diplóides (AA), e posterior cruzamento destes com triplóides AAB do tipo Prata e Maçã, gerando tetraplóides AAAB. A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui um dos maiores bancos de germoplasmas de *Musa* do mundo. Possuindo aproximadamente 600 acessos, de diferentes grupos genômicos e níveis de ploidia. Um banco de germoplasma deve conter uma variabilidade genética mínima que represente o acesso, seja cultivar de elite ou primitiva, espécie ou gênero. Considera-se, que o germoplasma de bananeira da Embrapa é bem representativo, apresentando desde espécies selvagens do gênero *Musa*, como *M. acuminata* e *M. balbisiana*, até cultivares e variantes dos tipos Prata e Maçã. Uma das estratégias para a solução de vários problemas relacionados ao cultivo da bananeira, principalmente fitossanitários, é a seleção de novos genótipos, mediante o melhoramento genético. Entretanto, essa estratégia passa obrigatoriamente pelo conhecimento da variabilidade genética disponível, utilizada como critério de seleção para os cruzamentos entre genótipos com características agronômicas complementares. Ao longo dos anos, o programa de melhoramento genético da bananeira desenvolveu as cultivares Caipira, Thap Maeo, FHIA 18, Prata Graúda, Prata Baby (Nam), Pacovan Ken, Japira, Vitória, Preciosa, Tropical, Maravilha, Caprichosa, Garantida e Princesa (Silva et al., 2002).

2.6 Conceito de Doença

A fitopatologia é a ciência que estuda as doenças das plantas em todos os seus aspectos, desde a diagnose e sintomatologia, passando pela etiologia e epidemiologia, até o controle. A doença por sua vez é um distúrbio da função normal em uma planta. Série de processos fisiológicos nocivos causados por uma contínua irritação da planta em virtude de um agente primário. É revelada pela atividade celular mórbida e manifestada nos tecidos e órgãos por resposta patológica característica chamada sintoma. Os agentes causadores de doenças em plantas são conhecidos como patógenos, eles usualmente interagem com a planta, vivendo dentro ou fora dela, invadindo seus tecidos, gerando, então, o processo infeccioso (Gaspartto, et., 2010).

A resistência natural de plantas a patógenos baseia-se em barreiras e mecanismos de defesa já existentes, independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção. Em contraposição, plantas possuem outros mecanismos de defesa, ainda mais eficientes que aparentemente, permanecem inativos ou latentes, só sendo acionados ou ativados, após serem elas expostas a agentes de indução. Nesse caso, a resistência é dita induzida, ou seja, as plantas percebem as agressões, e sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo tendo muitas vezes seu desenvolvimento prejudicado. A planta reconhece o microrganismo e ocorre o desencadeamento de respostas celulares que abortarão o processo de infecção e/ou colonização (Barros, et al., 2010).

2.6.1 Sigatoka Amarela – *Mycosphaerella musicola*

A Sigatoka amarela foi observada pela primeira vez na Ilha de Java por Zimmermann em 1902. A doença é causada pelo fungo *Pseudocercospora musae Zimmermann*, 1902 (forma assesxuada) ou *Mycosphaerella musicola Leach,* 1941 (forma sexuada) (Salomão e Siqueira, 2015). Foi inicialmente descrita no Brasil, no Estado do Amazonas, em 1944. Atualmente ocorre em todos os estados brasileiros onde a banana é cultivada. Assim como na sigatoka-negra, os prejuízos são devidos à morte prematura das folhas e ao enfraquecimento das plantas, cuja redução na produção pode chegar a 50% (Pereira, 2003) e em condições muito favoráveis para o desenvolvimento do fungo, os danos podem chegar a 100% (Cordeiro, et., 2016).

Os sintomas iniciais da doença aparecem como uma leve descoloração em forma de ponto entre as nervuras secundárias da segunda à quarta folha, a partir da vela. A contagem das folhas é feita de cima para baixo, onde a folha da vela é zero e as subsequentes recebem os números 1, 2, 3, 4, e assim por diante. Essa descoloração aumenta, formando estrias de tonalidade amarela que passam para estrias marrons e posteriormente para manchas pretas, necróticas,

circundadas por um halo amarelo, adquirindo a forma elíptica-alongada. O coalescimento das lesões, formando extensas áreas necróticas, geralmente ocorre em estádios avançados da doença, e quando em alta intensidade. A morte precoce das folhas é a principal consequência da incidência da doença sobre a bananeira, o que reflete diretamente na produção. Entre os distúrbios observados em plantações afetadas podem ser listados: diminuição do número de pencas por cacho; redução do tamanho dos frutos, maturação precoce dos frutos no campo, ou durante o transporte; enfraquecimento do rizoma; e perfilhamento lento (Cordeiro, et al., 2016).

A Sigatoka-amarela é causada por *Mycosphaerella musicola*, forma sexuada do fungo, que produz ascósporos em ascos localizados dentro dos pseudotécios. Na fase assexuada, Pseudocercospora musae, forma conídios em estrutura esporodóquios, originados na câmara subestomática. Ascósporos e conídios estão presentes nas plantações afetadas pela doença, sendo fortemente influenciados pelas condições climáticas. O estabelecimento do patógeno nos tecidos e as severidade da doença são muito influenciados pelas condições climáticas. O período chuvoso e quente é o mais favorável ao seu desenvolvimento, requerendo maior atenção do produtor. O inverso ocorre durante a época mais seca e fria. A reprodução sexuada ocorre nas manchas em estádios V e VI durante a época chuvosa com temperaturas superiores a 20 ºC. Os ascósporos são liberados pelo umedecimento dos tecidos das folhas doentes, que tenham pseudotécios maduros em suas manchas. Os ascósporos após serem liberados, ficam a mercê de ventos laterais, que os transportam a grandes distâncias e ventos ascendentes, que os transportam as folhas superiores mais jovens. Esses esporos produzidos nos tecidos densamente infectados nos períodos mais úmidos são a via principal de transmissão da doença entre áreas distantes. A condição essencial para a germinação dos ascósporos de *M. musicola* é a presença de uma lâmina de água sobre a folha e a ocorrência de temperaturas que variam entre 8 e 38ºC, com faixa ótima entre 25 – 26 ºC. Após a germinação, o tubo germinativo cresce sobre a superfície foliar por 72 horas antes de penetrar pelos estômatos. A influência da temperatura para o crescimento do tubo germinativo é a mesma para a germinação dos ascósporos (Cordeiro, et al., 2016).

Ao contrário dos ascósporos, os conídios são formados sobre os esporodóquios durante a maior parte do ano. A esporulação ocorre intensamente durante a noite, quando a umidade relativa é superior a 90% e a temperatura se encontra entre 20 e 30 ºC. Os conídios são liberados principalmente pelas gotas de chuva e orvalho que caem sobre a superfície das manchas esporuladas, e os arrastam para folhas inferiores, por isso a distribuição do inóculo conidial na plantação é principalmente no sentido vertical. O vento não tem um papel importante na disseminação dos conídios de *M. musicola*. A temperatura tem uma influência muito grande na

duração do período de incubação e de evolução das lesões. Observações realizadas têm permitido determinar que quando a temperatura média está em torno de 25 ºC, o período de incubação é em média 15 dias; quando, entretanto, a temperatura mínima cai para níveis abaixo de 20 ºC, este período pode aumentar para 56 dias. O patógeno apresenta alta variabilidade em virulência e em agressividade. Isso deve ser considerado nas estratégias de controle genético. A elevada variabilidade genética deve também ser considerada nos programas de controle químico, de forma a evitar que isolados resistentes sejam selecionados por fungicidas sistêmicos (Cordeiro et al., 2016).

2.6.2 Sigatoka-Negra – *Mycosphaerella fijiensis*

A doença foi descrita, pela primeira vez, em 1963, nas Ilhas Fiji. Em 1972 ocorreu o primeiro surto em Honduras. Em Costa Rica, foi identificada em 1979, e em 1981 na Colômbia. Atualmente está disseminada por toda a América Central e em vários países da África e da Ásia. Na América do Sul, ocorre na Colômbia, Venezuela, Peru, Equador e Bolívia. No Brasil, foi constatada no Amazonas, em fevereiro de 1989, nos Municípios de Tabatinga e Benjamin Constant. Está ocorrendo de forma severa em praticamente todo o Estado. Já atingiu também os Estados do Acre, Rondônia, Amapá, Roraima, Pará e Mato Grosso (Pereira, et., 2003), Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins (Cordeiro, et al., 2016).

A Sigatoka-negra é causada pela espécie *Mycosphaerella fijiensis* (fase sexuada), corresponde a *Pseudocercospora fijiensis* (fase assexuada). Conídios de *P. fijiensis* estão presentes durante as fases de estrias ou manchas jovens da doença. Nesses fases observam-se conidióforos, isolados ou em pequenos grupos, saindo dos estômatos localizados na face inferior da folha. A fase sexuada é considerada mais importante no aumento da doença, uma vez que, um grande número de ascósporos é produzido em pseudotécios, que se formam em lesões nos estádios finais da mancha, principalmente na face superior da folha, durante as fases de pico da doença em períodos de alta umidade e temperatura favorável. O desenvolvimento das lesões e a disseminação dos esporos de *M. fijiensis* são fortemente influenciados por fatores ambientais como umidade, temperatura e vento (Bennett e Arneson 2003).

Os sintomas causados pela evolução das lesões produzidas pela Sigatoka-negra se assemelham aos decorrentes do ataque da Sigatoka-amarela. A infecção ocorre nas folhas mais novas da planta, sintomas aparecem na face inferior da folha como estrias de cor marrom, evoluindo para estrias negras. As lesões em estádio final apresentam também centro deprimido de coloração cinza. Geralmente, no entanto, devido à alta frequência de infecções, o

coalescimento das lesões dessa doença ocorre ainda na fase de estrias, não possibilitando a formação de halo amarelo em volta da lesão. Observa-se, por outro lado, um impacto visual forte devido à coloração, predominantemente, preta e à necrose que se desenvolve, precocemente, nas folhas afetadas. Os reflexos da doença, em função da rápida destruição da área foliar e a consequente redução da capacidade fotossintética da planta, se refletem na redução da capacidade produtiva do bananal (Cordeiro, et al., 2016).

As condições ótimas para o desenvolvimento de lesões da Sigatoka-negra ocorrem com temperaturas na faixa de 25 a 28ºC, umidade relativa alta e período chuvoso prolongado. Após a adesão do esporo sobre as folhas novas, a germinação ocorrerá na presença de água livre e temperaturas superiores a 21ºC. Na sequência desse processo, o tubo germinativo cresce sobre a folha até encontrar um estômato por onde ocorrerá a penetração. A produção de esporos é mais precoce nessa doença do que na Sigatoka-amarela, ocorrendo ainda na fase de estrias, o que confere maior agressividade a *M. fijiensis*, comparada a *M. musicola*. O vento, juntamente com a umidade, principalmente na forma de chuva, são principais responsáveis pela liberação dos esporos e sua disseminação (Cordeiro, et al., 2016).

Várias são as medidas de controle da Segatoka-negra e da Sigatoka-amarela. Na agricultura moderna, o manejo integrado de pragas e doenças se constitui na principal arma de luta fitossanitária. O uso de variedades resistentes é sempre uma decisão com o foco maior no mercado, mas sempre que possível deve-se substituir as variedades suscetíveis pelas resistentes. Também é recomendável a utilização das práticas culturais que reduzam a formação de ambientes favoráveis ao desenvolvimento das sigatokas e reduzam o inóculo no interior do bananal. Os fungicidas ainda são indispensáveis para o controle da Sigatoka, principalmente considerando que as variedades suscetíveis são as mais plantadas. A utilização desses produtos, no entanto, deve ser cercada de uma série de cuidados de forma a minimizar riscos ao homem e ao meio ambiente. Como o controle é preventivo, é importante que as folhas mais novas sejam protegidas, visto que é nelas que a infecção ocorre. Em qualquer aplicação, o produto deverá ser elevado acima do nível das folhas, a fim de que seja depositado nas folhas da vela, 1, 2 e 3, as quais ficarão protegidas da infecção (Cordeiro, 2016). É proibida a utilização de produtos sem o devido registo no Ministério da Agricultora, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Recomenda-se a consulta ao Agrofit na página do MAPA, a fim de obter a lista atualizada dos produtos registrados para uso na cultura da banana (Agrofit, 2003).

2.7 Genes de Resistência

No processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa que somente são ativados em resposta a infecção por patógenos ou tratamento com determinados compostos químicos, naturais ou sintéticos, denominados elicitores (Carvalho, 2012). A resistência natural de plantas a patógenos baseia-se em barreiras e mecanismos de defesa já existentes, independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção. Em contraposição, plantas possuem outros mecanismos de defesa, ainda mais eficientes que permanecem inativos ou latentes, só sendo acionados ou ativados, após serem expostas a indutores. Nesse caso, a planta reconhece o microrganismo e ocorre o desencadeamento de respostas celulares que farão com que o processo de infecção e/ou colonização pare. As interações de plantas com microrganismos são definidas a partir de um reconhecimento, com posterior transdução do sinal externo, ativação de mensageiros secundários e expressão de genes específicos (Barros et al., 2010). Segundo Qi et al., 2011, as plantas possuem dois tipos distintos de receptores imunes. O primeiro tipo, os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhece padrões moleculares conservados associados à patógenos (PAMPs) iniciando um processo de imunidade conhecido por PTI (PAMP – *triggered immunity*). O segundo tipo são as proteínas de resistência (R), que reconhecem efetores do patógeno e iniciam a imunidade conhecida com ETI (*Effector – triggered immunity*).

Vários programas de melhoramento estão utilizando genes de resistência (R) de plantas na busca pelo desenvolvimento de variedades resistentes à doenças. Esses genes de resistência atuam em mecanismos pós invasão, que detectam efetores patogênicos e desenvolvem respostas de defesa (Chisholm et al., 2006). Até o momento, foram reconhecidas oito classes de genes de resistência, de acordo com a organização de aminoácidos conservados e seus domínios de membrana (Gururani et al., 2012). Dentre estas classes, a mais numerosa é composta por membros de uma família gênica codificante para proteínas contendo um sítio de ligação de nucleotídeo (NBS - *nucleotide-binding site*) e uma região rica em repetições de leucina (LRR - *leucine-rich repeats*) (Marone et al., 2013). O domínio LRR, presente em muitas proteínas de funções diversas, está envolvido nas interações proteína-proteína (Hammond-Kosack e Kanyuka, 2001).

2.8 Melhoramento Genético em Musa

Estudos comprovaram que o continente asiático é o centro de origem da bananeira e portanto, o lugar onde ocorreu a evolução da maioria das espécies conhecidas hoje. Outros

centros secundários também são conhecidos, como a África Oriental, África Ocidental e ilhas do Pacífico. A evolução ocorreu principalmente a partir do cruzamento interespecífico das espécies selvagens *Musa acuminata Colla* (genoma A, 2n=2x=22) e *M. balbisiana Colla* (genoma B, 2n=2x=22), e com isso, originou-se à maioria dos genótipos de bananeiras com frutos comestíveis. Porém, ainda existem poucas cultivares disponíveis para o comércio com potencial agronômico, tolerantes às pragas e doenças, que apresentem frutos com boas características de mercado. Um dos grandes desafios encontrados por produtores rurais, é o significativo ataque que a bananeira sofre por diversos fitopatógenos, dentre eles, os de maior importância econômica são os fungos causadores da Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola, Leach*) e Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis, Morelet*) (Silva, et al., 2013).

Como a maioria das cultivares comerciais de banana são partenocárpicas e estéreis, seus frutos podem ou não possuir sementes, quase sempre inviáveis, o melhoramento genético convencional é de difícil execução. O surgimento das técnicas de biologia molecular e da cultura de tecidos se tornou ferramentas importantes para os estudos genéticos deste gênero, como a seleção assistida por marcadores moleculares e o mapeamento genético. O mapeamento genético tem como objetivo identificar marcadores moleculares relacionados a genes que contribuem para a manifestação de uma característica em particular ou continuamente variável de caracteres (por exemplo, um QTL). Eles podem ser usados para isolar um gene de interesse e esse gene isolado pode ser utilizado para melhorar genótipos selecionados por meio de transformação, seleção assistida por marcadores, dentre outros. Outro avanço muito importante no estudo do gênero *Musa* é a finalização do sequenciamento de seu genoma, realizado pelo *Global Musa Genomics Consortium* com a participação da Embrapa, onde será possível conhecer a sua sequência de genes (Silva, et al., 2013).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver marcadores moleculares microssatélites para genes potencialmente envolvidos em respostas de defesa em *M. acuminata* que possam ser aplicados em programas de melhoramento.

3.2 Objetivos Específicos

Otimizar as condições para amplificação de microssatélites via PCR e validar os *primers* para locos SSR quanto a detecção de polimorfismos em diploides de *M. acuminata* contrastando em resistência a doença Sigatoka.

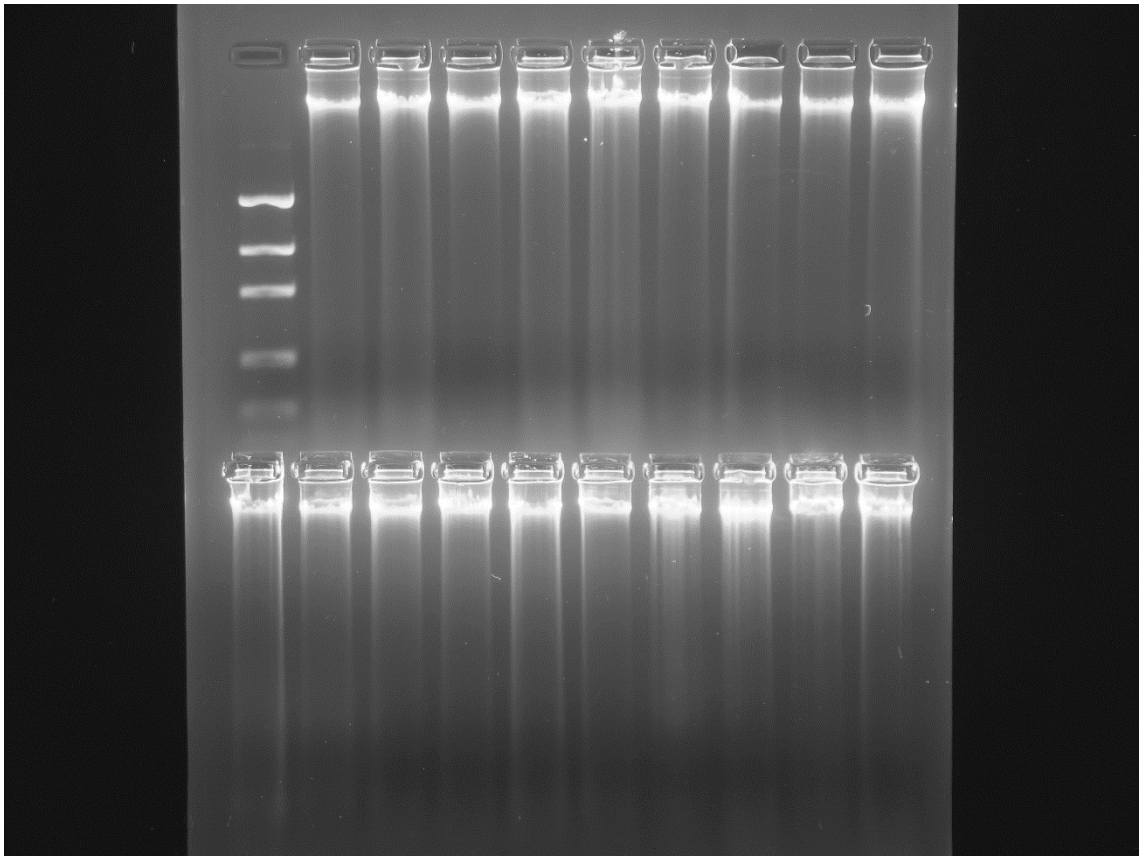
4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades desenvolvidas neste trabalho, foram realizadas no laboratório de Interação Planta-Patógeno (Universidade de Brasília) e no laboratório de Genética Vegetal (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

4.1 Quantificação de DNA

Os 21 acessos de *Musa acuminata* analisados, foram disponibilizados pela Embrapa Mandioca e Fruticultura em forma de DNAs já extraídos e concentrados (Figura 1). Como a concentração, após a extração de DNA é variável, é necessário que se realize a quantificação de todos as amostras para se conhecer a quantidade de material para trabalho. A quantificação foi realizada em cuba horizontal para eletroforese, em gel de agarose na concentração de 1% submerso em tampão TBE 1X, foi aplicada uma amostra por poço, sendo tal amostra composta por 2 microlitros de DNA concentrado e 2 microlitros de tampão azul. O quantificador de concentração de DNA utilizado foi o *Mass Ladder* na quantidade de 2 µL. A voltagem inicial utilizada na cuba foi de 100 volts e a voltagem final de 135 volts, com tempo de corrida de 50 minutos.

Figura 1. Quantificação dos 19 acessos de *Musa.*



4.2 Diluição de DNA

A concentração das amostras foi variável, sendo assim, foi necessário diluir todos os DNAs para a concentração de 300 nanogramas por microlitros (ng/µL). Essas amostras formaram o estoque de DNA e dele foram formadas novas amostras na concentração de 100 ng/µL para comporem as amostras de trabalho. Sempre que necessário fazer as reações de PCR, as amostras na concentração de 100 ng/µL foram diluídas para 3 ng/µL. A diluição foi feita com água MilliQ e DNA em quantidades variáveis de acordo com o resultado da quantificação.

4.3 Amplificação de locos SSR em genótipos de *M. acuminata*

Em trabalho anterior realizado por Emediato (2014), um total de 39 pares de *primers* foram desenhados a partir de sequências do genoma de *M. acuminata* DH Pahang com base na distância entre um microssatélite e um gene com Pfam ID de NB-ARC, representativo de sequências de genes R da familia NBS-LRR. Para restringir a análise, foi montado um ranking com os SSRs distando até no máximo 10.000 pb dos genes de interesse (Tabela 1).

Tabela 1. Informação das sequências de primers SSR derivados de *M. acuminada* e *DH Pahang.*

Primer	SSR	Anotação Genoma (NB-ARC)	Distância SSR/Gene NB-ARC (pb)
LOCUS 1	(AG)9	GSMUA_Achr6P19710_001	26
LOCUS 2	(CT)6	GSMUA_AchrUn_randomP19300_001	41
LOCUS 3	(CT)9	GSMUA_AchrUn_randomP19270_001	42
LOCUS 4	(TC)21	GSMUA_Achr4P26160_001	44
LOCUS 5	(TC)6	GSMUA_AchrUn_randomP27050_001	112
LOCUS 6	(CT)7	GSMUA_AchrUn_randomP19270_001	221
LOCUS 7	(TCA)12	GSMUA_Achr9P02765_001	269
LOCUS 8	(CTT)10	GSMUA_AchrUn_randomP22870_001	347
LOCUS 9	(AG)11	GSMUA_Achr6P32070_001	353
LOCUS 10	(TC)14	GSMUA_Achr7P20220_001	477
LOCUS 11	(TC)31	GSMUA_Achr7P20230_001	498
LOCUS 12	(AAT)7	GSMUA_Achr10P07050_001	832
LOCUS 13	(GA)14	GSMUA_Achr7P08250_001	970
LOCUS 14	(AG)10	GSMUA_Achr9P19800_001	1108
LOCUS 15	(AG)22	GSMUA_Achr9P19800_001	1436
LOCUS 16	(CT)8	GSMUA_Achr3P10930_001	1550
LOCUS 17	(TAT)10	GSMUA_Achr7P08250_001	1649
LOCUS 18	(AG)17	GSMUA_Achr7P08250_001	2330
LOCUS 19	(CT)7	GSMUA_Achr7P202	2370
LOCUS 20	(AC)8	GSMUA_Achr7P20230_001	2523
LOCUS 21	(CTT)7	GSMUA_Achr3P27820_001	2530
LOCUS 22	(AG)11	GSMUA_Achr6P21780_001	4533
LOCUS 23	(ATT)8	GSMUA_Achr1P14030_001	5314
LOCUS 24	(GT)10	GSMUA_Achr6P21780_001	5676
LOCUS 25	(TC)6	GSMUA_Achr7P20230_001	7268
LOCUS 26	(CT)7	GSMUA_AchrUn_randomP19270_001	9140
LOCUS 27	(GAA)6	GSMUA_AchrUn_randomP28320_001	DENTRO
LOCUS 28	(GA)7	GSMUA_AchrUn_randomP27810_001	DENTRO
LOCUS 29	(GAT)15	GSMUA_Achr10P07100_001	DENTRO
LOCUS 30	(GAA)10	GSMUA_Achr3P27790_001	DENTRO
LOCUS 31	(CTT)7	GSMUA_AchrUn_randomP27050_001	DENTRO
LOCUS 32	(GAG)8	GSMUA_Achr1P14020_001	DENTRO
LOCUS 33	(TTC)13	GSMUA_Achr3P28030_001	DENTRO
LOCUS 34	(AGA)11	GSMUA_Achr3P28030_001	DENTRO
LOCUS 35	(CGG)6	GSMUA_Achr9P02520_001	DENTRO
LOCUS 36	(CTT)7	GSMUA_Achr3P27830_001	DENTRO
LOCUS 37	(TTC)9	GSMUA_AchrUn_randomP19290_001	DENTRO
LOCUS 38	(AGA)7	GSMUA_Achr6P11450_001	DENTRO
LOCUS 39	(AGG)6	GSMUA_Achr8P30710_001	DENTRO

TM: Temperatura de meltin(ºC);
Primer FW (Primer forward);
Primer RV (Primer reverso).

Para a caracterização dos locos SSR (amplificação e análises de polimorfismos) foram usados 19 genótipos diplóides parentais (AA) de *M. acuminata* produzidos pelo programa de melhoramento da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, contrastando em resistência as doenças Sigatokas negra e amarela (Tabela 2), além de dois indivíduos (03115), derivados do cruzamento de *M. acuminata* Calcutta 4 e Pisang Berlin (progênie). O DNA genômico foi extraído dos genótipos e agrupado em quatro *bulks*, de acordo com a resistência.

Tabela 2. Acessos diplóides (AA) de *M. acuminata* contrastantes em resistência à doenças causadas por *Mycosphaerella sp.* selecionados para a validação de marcadores moleculares SSR. Fonte: adaptado de Passos *et al.*, 2012.

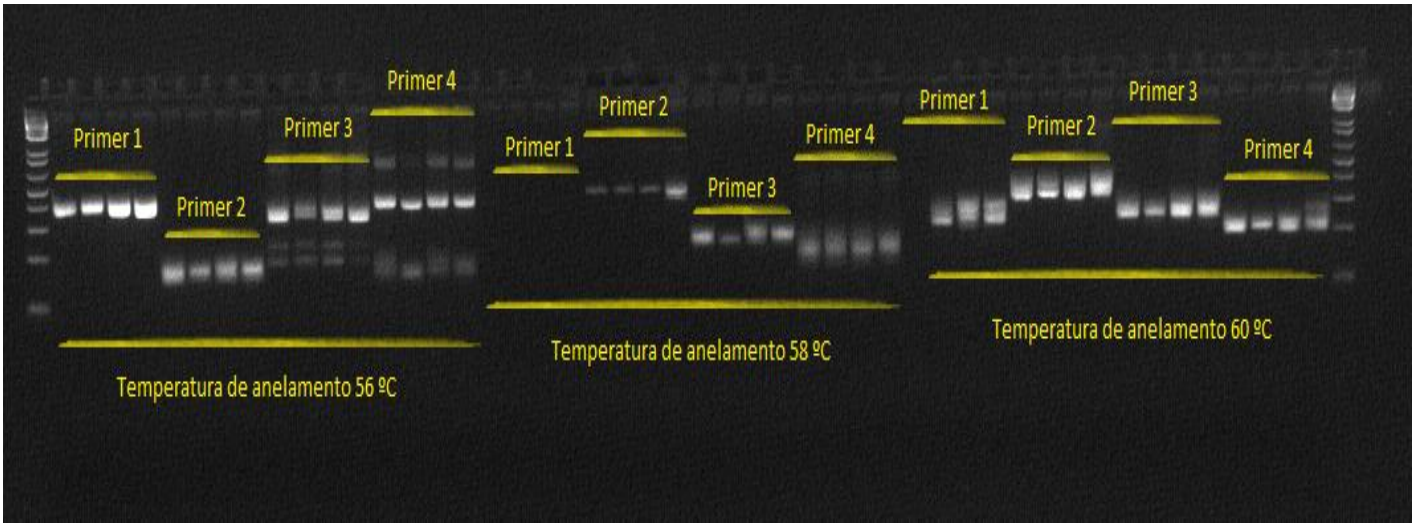
Genotipo de M. acuminata	Resistencia à Sigatoka negra	Resistencia à Sigatoka amarela	Bulk
Calcutta 4	Resistente	Resistente	1 e 3
Lidi	Resistente	Resistente	1 e 3
0323-03	Resistente	Resistente	1 e 3
SH32-63	Resistente	Suscetível	1 e 4
0116-01	Resistente	Resistente	1 e 3
1304-06	Resistente	Resistente	1 e 3
Burmanica	Resistente	Resistente	3
Microcarpa	Resistente	Resistente	3
1741-01	Nd	Resistente	3
9179-03	Nd	Resistente	3
1318-01	Nd	Resistente	3
4279-06	Nd	Resistente	3
Pisang Berlin	Parcialmente resistente	Suscetível	2 e 4
Niyarma Yik	Suscetível	Suscetível	2 e 4
Raja Uter	Nd	Suscetível	4
Tjau Lagada	Suscetível	Suscetível	4
F2P2	Nd	Suscetível	4
Khai Nai On	Suscetível	Suscetível	4
Sow muk	Resistente	Suscetível	4
Jaribuaya	Resistente	Suscetível	4

Nd: Não definido

A primeira amplificação de DNA foi realizada com os 39 pares de *primers* (SSR) específicos obtidos a partir da sequência correspondente à região flanqueadora de cada loco, apenas para otimizar as temperaturas de anelamento (Figura 2). Os SSRs foram amplificados através de reações de PCR nos 4 *bulks* que foram posteriormente individualizados naqueles que

apresentaram polimorfismos. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) com volume final da reação de 13 μL, contendo 3 ng de DNA genômico, tampão PCR 1X (100 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl), 2,5 mM de dNTP, 2,5 mM de de BSA (Albumina de Soro Bovino); 1,5 mM de MgCl2, 0,9 μM de cada *primer* (*foward e reverse)* e 1,25 U Taq DNA polimerase. As condições de amplificação foram as seguintes: 94° C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 94° C por 1 minuto; temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* por 1 minuto (52-60º C), 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Figura 2. Otimização de temperatura de anelamento dos primers, aplicadas nos 4 bulks de DNA.



Primer 1: LOCUS 1, Primer 2: LOCUS 2, Primer 3: LOCUS 3 e Primer 4: LOCUS 4.

4.4 Métodos de Avaliação

4.4.1 Detecção de Polimorfismos Microssatélites em Géis de Poliacrilamida Desnaturante.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (50 ng/L) por 20 minutos a 90 Volts em cuba horizontal, apenas para confirmação da amplificação eficiente do loco com base no tamanho esperado do fragmento, comparado com o marcador de peso molecular 1Kb *ladder* (Invitrogen). Os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta, onde as imagens foram capturadas por meio do *Gel logic 200 imaging system* (KODAK®, EUA). Os ajustes e otimizações foram realizados de acordo com esse resultado, aumentando ou diminuindo a temperatura de anelamento (variação de 48°C – 64°C), e também a concentração de MgCl2. Os locos que apresentaram

correta temperatura de anelamento, foram posteriormente analisados em gel desnaturante de poliacrilamida 5% e visualizados com coloração de nitrato de prata.

4.4.2 Preparação das Placas - Protocolo de Gel de Poliacrilamida 5%

Uma placa *repel* (repelir o gel) feita em acrílico foi selecionada, lavada com água destilada e seca com papel toalha. Em seguida, uma placa *bind* (aderir o gel) feita de vidro, também foi selecionada, lavada com álcool e seca com papel toalha. Na placa *repel,* foi adicionado 1 ml de *repel* e este foi espalhado bem por toda a placa e deixado secar por 5 minutos. Esse procedimento deve ser repetido duas vezes, como meio de garantir que a placa consiga repelir o gel no ato da desmontagem da cuba. Na placa *bind*, foi adicionada a solução *bind* e espalhada com rapidez, pois esta solução seca muito rápido. A solução *bind* foi composta de 1990 µL de etanol, 10 µL de ácido acético e 6 µL de *bind silane*.

4.4.3 Montagem das Placas

Foram colocados dois espaçadores de mesmo tamanho (fita vermelha), um de cada lado da placa *repel*. Eles foram ajustados para que ficassem bem rente (sem sobras) com a base da placa. Os espaçadores tem como principal importância dar espessura para o gel de poliacrilamida quando polimerizado. A placa *bind* foi colocada sobre a placa *repel* e ajustada com a base. Em seguida, foram escolhidas duas borrachas pretas, com os buracos para baixo, e então encaixadas nas laterais da junção das duas placas. A base da cuba foi escolhida (plástico com duas presilhas brancas) e encaixada. No fim da montagem, o pente foi testado e colocado com os dentes para cima (para fora).

4.4.4 Aplicação da Poliacrilamida

A aplicação foi feita com o auxílio de uma seringa grande, onde havia uma pequena mangueira em sua extremidade. Foram misturados e aplicados 100 ml de poliacrilamida a 5% e 700 µL de APS, no orifício inferior da placa já preparada e montada. Assim que a aplicação da solução foi feita, foi colocado o pente (com os dentes virados para baixo), esta etapa, deve ser feita com muito cuidado para não formar bolhas no interior da placa e não colocar um pente que fique frouxo no espaço delimitado para ele. Após a aplicação, a placa foi deixada em repouso por duas horas, para que o gel se polimerizasse e em seguida foi feita a eletroforese.

4.4.5 Pré-corrida – Aquecimento do Gel

A base da placa montada e com o gel já polimerizado foi retirada, e a placa colocada na cuba, o tampão TBE 1X foi colocado na cuba e dentro da placa. Em seguida, os fios foram encaixados e ligados na fonte. A fonte utilizada foi manual, utilizando 90 volts e fazendo uma pré-correr por cerca de 40 a 60 minutos, a fim de aquecer o gel para receber as amostras de DNA.

4.4.6 Aplicação das Amostras

As amostras foram compostas por 3 µL de DNA e 4 µL de tampão de formamida por amostra. O excesso de bolhas foi retirado com o auxílio de um conta gotas (lugar aonde o pente é colocado para aplicação das amostras), e com o auxílio de uma pipeta multicanal o DNA mais tampão foram aplicados nos poços do pente. O tampão formamida foi aplicado em cada amostra, porém antes dele ser aplicado, as amostras de DNA foram desnaturadas a 95ºC por 5 minutos e colocadas imediatamente no gelo. No início e final da aplicação das amostras nas placas, foram aplicado 3 µL de *ladder* para estimação do tamanho das bandas, para auxílio da escoriação (escore-classificar o tamanho das bandas).

4.4.7 Revelação com Nitrato de Prata

A coloração seguiu três passos: fixação do gel com uma solução de ácido acético glacial (Merck) 10% por 10 minutos; coloração (oxidação) do gel por uma solução de AgNO3 acrescido de formaldeído 37 % (2g de AgNO3 em 2 L de água milli-Q) por 3 minutos; revelação do gel com uma solução de Na_2CO_3 gelado (60 g de Na_2CO_3 em 2 L de água milli- Q com 3 mL de formaldeído 37% e 400 µL de $Na_2O_3S_2$ 10 mg/mL) por aproximadamente 10 minutos ou até que as bandas pudessem ser visualizadas. Os tamanhos dos locos foram comparados ao marcador de peso molecular *ladder* 10 pb. Após a revelação dos géis de poliacrilamida, as placas foram dispostas para secagem em temperatura ambiente por vinte e quatro horas ou mais, e em seguida, escaneados e escoreados no computador. Através do escoreamento, foi possível a atribuição de um valor para tamanho de bandas de cada indivíduo. O tamanho da banda foi definido através de sua comparação com o marcador de referência *Ladder*. Aqueles locos que apresentaram polimorfismos na análise dos *bulks* foram novamente submetidos a PCR e visualizados em gel de nitrato de prata com os DNAs dos *bulks* individualizados para a identificação dos alelos em cada genótipo utilizando as progênies planta 1 e planta 2 como controle.

4.5 Análise Estatística

A análise estatística dos genótipos diploides que apresentaram polimorfismo foi realizada através do programa *PowerMarker* V3.25, que fornece um ambiente de análise integrado de dados (IAE) para dados de marcadores moleculares. Este *software* resulta em vários tipos de dados, como: Número de alelos por loco, heterozigosidade observada, variação alélica, heterozigosidade esperada e conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Liu e Muse, 2005). Os marcadores microssatélites polimórficos foram analisados e inseridos no *software* de acordo com os tamanhos das bandas encontradas na revelação dos géis de poliacrilamida, sendo cada marcador microssatélite utilizado nos 21 indivíduos.

5. Resultados e Discussões

Dos 39 pares de *primers* microssatélites (SSR) utilizados para estas análises em *Musa*, foi verificada a presença de polimorfismo genético em sete deles (17,95%), envolvidos com a resistência de Sigatoka Negra e Amarela. A análise inicial feita nos *bulks* de *M. acuminata* utilizando-se gel de poliacrilamida para visualização das bandas, possibilitou a verificação da presença de marcadores polimórficos, monomórficos, falhas na amplificação e daqueles onde ocorreu a inespecificidade das bandas. Os locos que apresentaram comportamento polimórfico quando analisados em *bulks*, foram testados nos 19 parentais contrastantes de *M. acuminata* individualmente, além das duas progênies entre Calcutta 4 e Pisang Berlin. O polimorfismo dos microssatélites pode surgir de "escorregões" da enzima DNA polimerase durante a replicação do DNA, da recombinação desigual ou do alinhamento incorreto das fitas de DNA (Tachida et al., 1992). O uso dos *bulks* vem sendo aplicado em várias outras culturas, como a mandioca (Olasanmi et al., 2014), algodão (Marangoni et al., 2013), milho (Xu et al., 1999), trigo (Ghazvini et al., 2013), tomate (Joshi et al., 2013), e outros, permitindo analisar maior número de indivíduos por análise feita.

Foram detectados um total de 50 alelos nos sete locos (Figura 3) microssatélites polimórficos em que o número de alelos por loco variou de quatro a 11 (Tabela 3), com uma média de 7,28 alelos por loco SSR nos 21 genótipos de *M. acuminata*. O tamanho dos alelos variou de 260 a 394 pb nos locos (LOCUS 9 e LOCUS 24, respectivamente). A média da heterozigosidade observada dos 7 locos foi 0,514, com os locos LOCUS 3 e LOCUS 32 conferir (0,150 e 0,900, respectivamente).

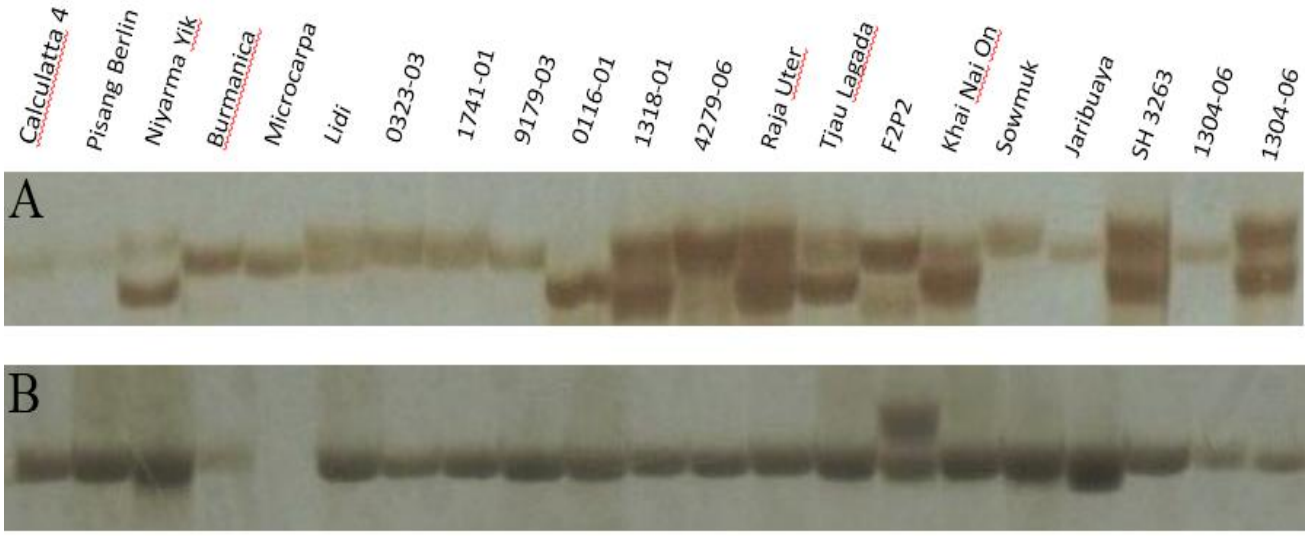


Figura 3. Polimorfismo encontrados nos genotipos de *M. acuminata* usando o par de primers para LOCUS 1 (A) e o par de primers para LOCUS 4 (B).

Tabela 3. Resultado de análise feita no *Software Power Marker* para os 7 marcadores polimórficos encontrados.

Marker	Major. Allele.Frqu	Genotype No	Sample Size	No.of obs.	Allele No	Availability	Gene Diversity	Heterozygosity	PIC
LOCUS 1	0,4	7	20	20	5	1	0,7138	0,35	0,6648
LOCUS 4	0,475	11	20	20	10	1	0,7288	0,5	0,7067
LOCUS 9	0,275	13	20	20	11	1	0,8175	0,9	0,7948
LOCUS 24	0,475	6	20	20	4	1	0,6713	0,6	0,619
LOCUS 28	0,3	12	20	20	9	1	0,8225	0,45	0,8019
LOCUS 30	0,425	10	20	20	7	1	0,75	0,65	0,7214
LOCUS 32	0,875	5	20	20	5	1	0,23	0,15	0,2233
Mean	0,4607	9,1429	20	20	7,2857	1	0,6763	0,5143	0,6474

De acordo com a classificação feita por Botstein et al. (1980), marcadores moleculares com valores de PIC superiores a 0,500 são considerados muito informativos, valores entre 0,250 e 0,500 mediamente informativos e inferiores a 0,240 pouco informativos, representa a qualidade do marcador utilizado. O valor de PIC com os sete marcadores variou de 0,223 (LOCUS 32) a 0,801 (LOCUS 28), 85% dos marcadores obtiveram PIC superior a 0,500. O loco que obteve menor valor de PIC foi o LOCUS 32 (0,223), caracterizando-o como pouco informativo. Além dos sete locos polimórficos encontrados, também houveram aqueles com comportamento monomórfico, inespecífico ou que não amplificou (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado das análises quanto ao comportamento dos 39 pares de *primers*.

PRIMER	COMPORTAMENTO
LOCUS 01	Polimórfico
LOCUS 02	Monomórfico
LOCUS 03	Inespecífico
LOCUS 04	Polimórfico
LOCUS 05	Inespecífico
LOCUS 06	Monomórfico
LOCUS 07	Inespecífico
LOCUS 08	Não funcionou
LOCUS 09	Polimórfico
LOCUS 10	Inespecífico
LOCUS 11	Não funcionou
LOCUS 12	Não funcionou
LOCUS 13	Inespecífico
LOCUS 14	Inespecífico
LOCUS 15	Não funcionou

LOCUS 16	Não funcionou
LOCUS 17	Inespecífico
LOCUS 18	Polimórfico
LOCUS 19	Não funcionou
LOCUS 20	Inespecífico
LOCUS 21	Inespecífico
LOCUS 22	Monomórfico
LOCUS 23	Monomórfico
LOCUS 24	Polimórfico
LOCUS 25	Inespecífico
LOCUS 26	Polimórfico
LOCUS 27	Monomórfico
LOCUS 28	Monomórfico
LOCUS 29	Não funcionou
LOCUS 30	Não funcionou
LOCUS 31	Monomórfico
LOCUS 32	Polimórfico
LOCUS 33	Monomórfico
LOCUS 34	Monomórfico
LOCUS 35	Monomórfico
LOCUS 36	Inespecífico
LOCUS 37	Inespecífico
LOCUS 38	Monomórfico
LOCUS 39	Inespecífico

Uma das grandes aplicações dos marcadores moleculares em pesquisas tem sido na construção de mapas de ligação para diversas espécies de plantas. Mapas de ligação foram utilizados para a identificação de regiões cromossômicas que contêm genes que controlam características simples (controlada por um único gene) e características quantitativas usando análises de QTL (*Quantitative Trait Loci*). Os QTLs são regiões dentro dos genomas que contêm genes associados a uma característica quantitativa agronomicamente importante como produtividade e algumas formas de resistência a doenças. Os marcadores moleculares também são utilizados na transferência de alelos de resistência de fontes exóticas e muitas vezes não adaptadas para cultivares com alto valor agronômico. Esses marcadores, se ligados aos alelos de resistência, podem ser usados na seleção assistida por marcadores (SAM), nas etapas do melhoramento genético. Estes marcadores são uma grande e valiosa ferramenta para estimação de diversidade genética e para estudos de filogenia de espécies. No gênero *Musa*, esses marcadores são amplamente utilizados para diferentes fins, como o estudo de diversidade genética, estabilidade genômica *in vitro* de plântulas regeneradas de *M. acuminata*, conservação e estudos de transformação genética (Emediato, 2014).

6. Conclusões

Dos 39 marcadores microssatélites desenvolvidos e avaliados em genótipos de *M. acuminata*, 7 apresentaram comportamento polimórfico com alto valor informativo (PIC), valor similar foi encontrado por Emediato (2014), sendo considerados os mais úteis para aplicação em seleção assistida por marcadores moleculares. A identificação e a caracterização de genes envolvidos em resistência a doenças em *M. acuminata* durante a interação com *M. musicola*, associado ao desenvolvimento de marcadores moleculares, irá contribuir para o desenvolvimento de um controle eficaz das doenças Sigatokas Negra e Amarela, com base no melhoramento genético através da transformação de plantas ou seleção assistida por marcadores (SAM).

7. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula.** 5.ed. Porto Alegre: Artmed, p.195-200. 2010.

AGROFIT. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 23 Fev. 2017.

AMORIM, E.P. et al. **Caracterização agronômica e molecular de genótipos diploides melhorados de bananeira.** Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal, SP, v. 31, n01, p. 154-161, 2009.

AMORIM, E.R. et al. **New microsatellite markers for bananas (*Musa* spp).** Genetics and Molecular Research 11 (2): 1093-1098 (2012).

BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. **Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos.** Biosci. J. Uberlândia, v. 26, n02, p. 231-239, 2010.

BENNETT, R.S.; ARNESON, P.A. **Sigatoka negra de bananas e plátanos. Disponível em:** <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/BlackSigatokaPort.aspx>. Acesso em: 23 Fev. 2017.

BUSO, G.S.C. et al. **Manual de Utilização de Marcadores Moleculares para Análise de Diversidade Genética.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 30 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 291). 2009.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2016. p.9-54.

CARVALHO, N.L. **Resistência genética induzida em plantas cultivadas.** Santa Maria. Rio Grande do Sul, v. 07, n07, p. 1379-1390, 2012.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J. **Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response.** Cell. 2006 Feb 24;124(4):803–14.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia, Volume 2.** Ouro Fino-MG: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2016. p.109-123.

CORDEIRO, Z.J.M.; ROCHA, H.S.; ARAÚJO, A.G. **Metodologias para Manuseio de Mycosphaerella musicola em Laboratório.** 1.ed. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 32p.

COSTA, M.R.; MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA.** Belém: Ernbrapa Amazônia Oriental, 24p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89). 2001.

DE-SOUZA, M.T. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose. In: AZEVEDO, M.O. et al. (Ed.). **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Editora universidade de Brasília, 2003. p.111-128.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. **Quem somos.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura>. Acesso em: 20 Fev. 2017.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Banco ativo de germoplasma de banana.** Disponível em: <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-vegetal/projetos-componentes/pc6-banco-ativo-de-germoplasma-de-especies-frutiferas/planos-de-acao/pa4-banco-ativo-de-germoplasma-de-banana>. Acesso em: 01 Fev. 2017.

EMEDIATO, F.L. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise de expressão de genes envolvidos em resposta ao estresse biótico em genótipos de *Musa acuminata*.** 2014. 213f. Dissertação (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília – UnB/DF, 2014.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético moleculares: aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** 1.ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

GASPAROTTO, L. et al. **Glossário de fitopatologia.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 421p.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, U.V.; LANZA, M.A.; SCHUSTER, I. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.30, n.253, p.24-33, 2009.

GURURANI, M.A. et al. **Plant disease resistance genes: current status and future directions.** Physiological and Molecular Plant Pathology 78: 51–65. 2012.

HARDING, R.M.; BOYCE, A.J. CLEGG, J.B. **The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules.** Genetics. 1992 Nov;132(3):847–59.

HAMMOND-KOSACK, K.E; JONES, J.D.G. 1997. **Plant disease resistance genes**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48:573-605.

LIU, K.; MUSE, S.V. **PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis**. Bioinformatics. 2005 May 1;21(9):2128–9.

MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, J.C.; BARELLI, C; DARINI, A.L.C. **Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review.** Revista do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, v.64, n02, p.155-161, 2005.

MARONE, D. et al. **Plant Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes: Active Guardians in Host Defense Responses.** International Journal of Molecular Sciences. 14(4):7302-7326. 2013.

MILLER, R.N.G. et al. **Characterization of novel microsatellite markers in Musa acuminate subsp. Burmannicoides, var. Calcutta 4.** BMC Research Notes. 2010 May 27;3(1):148.

MORAES, C.S. et al. **Série em biologia celular e molecular: Métodos experimentais no estudo de proteínas.** Rio de Janeiro: IOC, 2013. 84p.

OLIVEIRA, I.E.S.; VIEIRA, L.S.T.; SILVA, J.O.; SEREJO, J.A.S. **Conservação in vitro de acessos do banco de germoplasma de banana.** 9ª Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2015.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A.F.S.; VÉRAS, S.M. **Doenças da Bananeira no Estado do Amazonas a (3. Edição Revisada).** Manaus, AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 12 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 12). 2003.

PEREIRA, I.S. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. In: AZEVEDO, M.O. et al. (Ed.). **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Editora universidade de Brasília, 2003. p.175-186.

PINHO, D.P.; MACHADO, A.R.; FIRMINO, A.L. Princípios e Métodos para Identificação Molecular de Fungos. In: ALFENAS, A.C; MAFIA, R.G. (ed.). **Métodos em fitopatologia.** 2.ed. Viçosa: UFV, 2016. p.389-404.

QI, Y.; TSUDA, K.; GLAZEBROOK, J.; KATAGIRI, F. **Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in Arabidopsis.** Mol Plant Pathol. 2011 Sep;12(7):702–8.

SALOMÃO, L.C.C.; SIQUEIRA, D.L. **Cultivo da Bananeira.** Viçosa, MG: Editora UFV, 2015. 109p.

SILVA, F.H. **Biologia molecular.** São Paulo: Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, 2001. 25p.

SILVA, S.O. **Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis.** Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal, SP, v. 35, n03, p. 919-931, 2013.

Tachida H, Iizuka M. **Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage**. Genetics. 1992 Jun;131(2):471–8.

WALKER. J. **Electrophoretic techniques.** In: WILSON. K.; WALKER. J. (ed.). Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 7ed. United States of America: Cambridge University Press, New York, 2009. p.399-432.

WANG, J.Y.; CHEN, Y-Y; LIU, W-L, WU, Y-T. **[Development and application of ESTderived SSR markers for bananas (Musa nana Lour.)].** Yi Chuan. 2008 Jul;30(7):933–4.