

**RONALDO VIANA DOS REIS**

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E MOLECULAR DE  
BANANEIRA DO SUBGRUPO TERRA SUBMETIDA À  
RADIAÇÃO GAMA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R375c  
2013

Reis, Ronaldo Viana dos, 1978-

Caracterização agronômica e molecular de bananeira do subgrupo Terra submetida à radiação gama / Ronaldo Viana dos Reis. – Viçosa, MG, 2013.  
xi, 62f. : il. ; 29cm.

Orientador: Aluizio Borém

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Banana- Melhoramento genético. 2. Seleção de plantas - Melhoramento genético. 3. Mutações no melhoramento genético. 4. *Musa*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

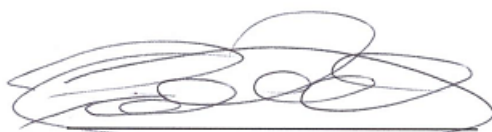
CDD 22. ed. 634.7722

**RONALDO VIANA DOS REIS**

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E MOLECULAR DE  
BANANEIRA DO SUBGRUPO TERRA SUBMETIDA À  
RADIÇÃO GAMA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de Fevereiro de 2013



Prof. Roberto Fritsche Neto



Prof. Sebastião de Oliveira e Silva



Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias



Prof. Tuneso Sedyama



Prof. Aluizio Borém de Oliveira  
(Orientador)

*Dedico esta vitória a Deus e a toda minha família, meu pai Geraldo, minha mãe Dorita, minhas irmãs Janaina e Clícia, minhas sobrinhas, Nathany e Ana Beatriz e minha noiva Hérica por todo o apoio, carinho e confiança.*

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelos ensinamentos e amor e por ter-me dado capacidade para concretizar mais esta etapa na minha caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Aos amigos do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento da UFV

Ao Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelo apoio financeiro ao projeto e pela concessão da Bolsa.

Ao professor Aluizio Borém, pela orientação, amizade e confiança depositada em mim no desenvolvimento do trabalho.

Ao pesquisador Edson Perito Amorim, pelos ensinamentos, sugestões e colaborações para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores da Pós-graduação da UFV, pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso, em especial ao Prof. Tuneo Sedyama.

Aos Técnicos de Laboratório Raimundo e Vanderson, e a todos os colegas do laboratório de biologia molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que conviveram comigo e pela colaboração no desenvolvimento do trabalho, em especial ao Zalmar Santana Gonçalves.

A secretária Edna, do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pelo apoio quando solicitado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e para a realização deste trabalho.

**OBRIGADO!**

## BIOGRAFIA

RONALDO VIANA DOS REIS, filho de Geraldo Viana dos Reis e Dorita Nogueira de Souza Reis, nasceu em 01 de outubro de 1978, em Salinas, estado de Minas Gerais.

Cursou ensino fundamental e médio científico na rede pública, na cidade de Salinas/MG, em 2003 iniciou o curso de Engenharia Agrônômica/Bacharelado, na Universidade Estadual de Montes Claros/UNIMONTES, no campus de Janaúba/MG.

No ano de 2006 ingressou como bolsista de iniciação científica na Universidade Estadual de Montes Claros, pela FAPEMIG, trabalhando com o projeto “Conservação pós-colheita, análise nutricional e sensorial, características físico-químicas de híbridos e variedades de bananeira (*Musa spp.*) resistentes a sigatoka negra no norte de Minas Gerais” sob a orientação da Professora Gisele Polete Mizobutsi, por onde permaneceu por dois anos.

Em junho de 2007 iniciou o projeto de conclusão de curso no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, sob a orientação do pesquisador Edson Perimo Amorim, trabalhando com “Variabilidade genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites”, monografia aprovada em 09 de dezembro de 2007.

Em fevereiro de 2008 foi selecionado pelo programa de pós-graduação, Mestrado *Stricto Sensu*, em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual do Norte Fluminense sob a orientação do professor Alexandre Pio Viana, e realizou seu experimento na Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF, trabalhando com

Marcadores moleculares microssatélites aplicados ao melhoramento intrapopulacional do maracujazeiro azedo. A dissertação foi aprovada em 19 de fevereiro de 2010.

Foi analista de laboratório na empresa AGROGENÉTICA de abril a agosto de 2010, desenvolvendo o projeto de “Otimização das condições de extração, amplificação e eletroforese para padronização de um sistema de genotipagem molecular de soja baseado em marcadores microssatélites”.

Em agosto de 2010 iniciou o doutorado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa sob a orientação do professor Aluizio Borém tendo finalizado os créditos e qualificado em outubro de 2011.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	9
<b>ARTIGO 1 - SELEÇÃO DE POSSÍVEIS MUTANTES DE BANANA TERRA MARANHÃO OBTIDOS POR RADIAÇÃO GAMA .....</b>	<b>16</b>
<i>RESUMO</i> .....	16
<i>ABSTRACT</i> .....	17
<i>INTRODUÇÃO</i> .....	17
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	19
<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....	23
<i>CONCLUSÕES</i> .....	26
<i>AGRADECIMENTOS</i> .....	27
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	27
<b>ARTIGO 2 - DISSIMILARIDADE GENÉTICA E SELEÇÃO DE POSSÍVEIS MUTANTES DE BANANA TERRA MARANHÃO UTILIZANDO A ESTRATÉGIA WARD-MLM .....</b>	<b>37</b>
RESUMO .....	37
ABSTRACT .....	38
INTRODUÇÃO .....	39
MATERIAL E MÉTODOS .....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
CONCLUSÕES .....	49
AGRADECIMENTOS .....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>61</b>
<i>Artigo 1</i> .....	61
<i>Artigo 2</i> .....	61

## RESUMO

REIS, Ronaldo Viana dos. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Caracterização agronômica e molecular de bananeira do subgrupo Terra submetida à radiação gama.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadores: Edson Perito Amorim e Luiz Carlos Chamhum Salomão.

O cultivo da bananeira é uma importante atividade e possui relevante papel econômico e social no mundo. O estudo da diversidade genética é importante para programas de melhoramento, especialmente na elucidação da variabilidade genética disponível para os melhoristas. As características agronômicas e os marcadores moleculares têm sido utilizados para determinar essa diversidade em muitas espécies. Objetivou-se: 1) selecionar possíveis mutantes de banana Terra Maranhão obtidos por radiação gama com boas características agronômicas e altura reduzida; 2) avaliar a variabilidade genética e selecionar possíveis mutantes de banana Terra Maranhão submetidos à radiação gama com base em dados agronômicos e perfis de marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) utilizando a estratégia Ward-MLM. Na primeira parte do trabalho, foram irradiadas 315 gemas *in vitro* com raio gama nas doses de 20 Gy, as quais foram subcultivadas e posteriormente avaliadas em campo durante dois ciclos de produção. A avaliação dos clones foi realizada com o objetivo principal de selecionar 10% das melhores plantas. O plantio foi feito no espaçamento 3 m x 4 m, e a adubação foi realizada de acordo com as recomendações técnicas para a cultura. Foram avaliadas em campo 233 plantas irradiadas e 41 testemunhas. Dentre as plantas irradiadas selecionadas, observaram-se genótipos que apresentam altura reduzida. Os genótipos Irra 04, Irra 13, Irra 19 e Irra 21 apresentaram altura de 3,6 m, valores abaixo da média das testemunhas selecionadas. Outros genótipos irradiados selecionados como o Irra 14 e Irra 16 com altura de 3,65 m se mostraram promissores, pois além da altura reduzida, apresentaram um bom peso de cacho e menor período de floração em relação

à média das testemunhas, fator relevante para as próximas etapas de melhoramento. Estes resultados confirmam a possibilidade de emprego da indução de mutação em bananeira tipo Terra para a obtenção de características agronômicas desejáveis e altura reduzida. Na segunda parte do trabalho, foram avaliadas em campo 233 plantas irradiadas e 41 testemunhas. Os dados agronômicos e moleculares foram submetidos ao algoritmo estatístico Ward-MLM no programa SAS. A análise de agrupamento foi realizada pelo método da distância média ou também denominado de método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA) com base na matriz de distância do algoritmo de Gower e o coeficiente de correlação cofenético foi calculado usando o software R. A distância entre os possíveis mutantes variou 0,321 a 0,524, com distância média de 0,426 e o coeficiente de correlação cofenético 0,79. Os três supostos mutantes que foram selecionados com base nas melhores características agronômicas e altura baixa serão submetidos a novas avaliações nas próximas etapas do programa de melhoramento da Embrapa. Esta é a primeira tentativa de utilização de dados combinados em bananeira do tipo Terra com o intuito de selecionar mutantes e avaliar a variabilidade genética.

## ABSTRACT

REIS, Ronaldo Viana dos. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February 2013. **Agronomic characterization and molecular subgroup banana Terra subjected to gamma radiation.** Advisor: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Advisors: Edson Perito Amorim and Luiz Carlos Chamhum Salomão.

The cultivation of banana is an important activity and has significant social and economic role in the world. The study of genetic diversity is important for breeding programs, especially in the elucidation of the genetic variability available to plant breeders. The agronomic traits and molecular markers have been used to determine this diversity in many species. This study aimed to: 1) select potential banana Terra Maranhão mutants obtained by gamma radiation with good agronomic characteristics and reduced height, 2) assess the genetic variability and select possible mutant banana Terra Maranhão subjected to gamma radiation based on agronomic data and profiles molecular markers Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) using the Ward-MLM strategy.. In the first part of the study, 315 were irradiated gemstones in vitro with gamma ray doses of 20 Gy, which were subcultured and subsequently evaluated in the field during two growing seasons. The evaluation of the clones was performed with the main objective of selecting the best plants 10%. The planting was done in 3 mx 4 m spacing, and fertilization was performed according to the technical recommendations for culture. Were assessed in 233 plants irradiated and 41 witnesses. Among the irradiated plants selected were observed genotypes that exhibit reduced height. Genotypes Irra 04, Irra 13, Irra 19 and Irra 21 showed height of 3.6 m, below the average values of selected witnesses. Other genotypes irradiated selected as Irra 14 and Irra 16 with height of 3.65 m were promising, because besides the reduced height, had a good bunch weight and smaller flowering period compared to the average of the

witnesses, a factor relevant to the next steps for improvement. These results confirm the possibility of using mutation induction in banana type Terra to obtain desirable agronomic characteristics and reduced height. In the second part of the study, were assessed in 233 plants irradiated and 41 witnesses. The agronomic and molecular data were subjected to statistical algorithm Ward-MLM program in SAS. Cluster analysis was performed by the method of the average distance or also called clustering method midway between groups (UPGMA) based on the distance matrix algorithm Gower cofenético and the correlation coefficient was calculated using the software R. The distance between the possible mutants ranged from 0.321 to 0.524, with an average distance of 0.426 and correlation coefficient cofenético 0.79. The three putative mutants were selected based on best agronomic characteristics and low altitude will undergo further evaluation in the next stages of the breeding program of Embrapa. This is the first attempt to use the combined data of the type in banana Terra in order to select mutants and assess genetic variability.

## INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo da bananeira é uma importante atividade do agronegócio brasileiro e possui relevante papel econômico e social no mundo, com uma área de plantio estimada de 4,1 milhões de hectares, em 107 países, e uma produção de 70 milhões de toneladas. Com uma produção aproximada de 7,34 milhões de toneladas em 2011, e uma área cultivada de aproximadamente 528 mil hectares, o Brasil se destaca como o quarto produtor mundial de banana e, a Região Nordeste contribui com 40% da produção nacional, onde se estima que a produção dessa fruta empregue 960 mil pessoas (FAO, 2012).

A banana é a fruta mais consumida no mundo e em sua quase totalidade na forma *in natura*, essa fruta constitui parte integrante da alimentação das populações de baixa a alta renda, não só pelo seu valor nutritivo, como pelo seu baixo custo e sabor agradável. Além disso, a banana pode ser utilizada na preparação de pratos culinários, banana chips e outros produtos industriais, e ainda, no uso medicinal, ornamental e na confecção de artigos de decoração (BAKRY et. al., 2009).

O centro de origem da maior parte do germoplasma de banana está localizado no Continente Asiático. Outros centros secundários ocorrem na África Oriental, em algumas ilhas do Pacífico e uma considerável diversidade genética na África Ocidental (CHAMPION, 1967). As cultivares encontradas nestas regiões evoluíram de espécies selvagens e apresentam três níveis de ploidia, existindo diploides com 22 cromossomos (2x), triploides com 33 cromossomos (3x) e tetraploides com 44 cromossomos (4x), que são múltiplos do número básico ( $n=11$ ) (SHEPHERD, 1984).

Cruzamentos interespecíficos entre *M. acuminata* Colla (genoma A,  $2n=2x=22$ ) e *M. balbisiana* Colla (genoma B,  $2n=2x=22$ ), deram origem à maioria dos genótipos de

bananeiras atualmente em uso para alimentação, razão pela qual as plantas geradas destes cruzamentos apresentam características das duas espécies (SIMMONDS, 1973). Estudos realizados por Simmonds & Shepherd (1955) constataram os seguintes grupos genômicos: diploides AA, AB e BB; triploides AAA, AAB e ABB; e tetraploides AAAA, AAAB, AABB e ABBB, sendo esta classificação adotada em todo o mundo. Além dos grupos genômicos, foi estabelecido o uso do termo subgrupo, para denominar um complexo de cultivares, originárias, por meio de mutações de uma única cultivar original (Shepherd et al., 1984), como no caso do grupo AAA, subgrupo Cavendish e grupo AAB, subgrupos Prata e Terra, no Brasil.

As primeiras pesquisas na área de melhoramento genético de bananeira ocorreram no final da década de 1920, em Honduras, Trinidad e Jamaica, motivadas pelo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* agente causal do mal-do-panamá (SHEPHERD, 1992). No início da década de 1930 foi sintetizado o primeiro tetraplóide a partir do cruzamento de uma cultivar triplóide AAA (Gros Michel) com um diplóide AA (selvagem). Desta forma, iniciou-se um sistema de hibridação que permitiu o melhoramento de algumas cultivares triplóides de banana e também de diplóides (AA).

Entre os problemas fitossanitários que impedem a obtenção de altos rendimentos na cadeia produtiva da banana estão as sigatoka amarela (*Mycosphaerella musicola*) e negra (*Mycosphaerella fijiensis* Var. *difformis*), e o mal-do-panamá, principais doenças que causam perdas significativas na produção, além da altura elevada das plantas em algumas cultivares como a Terra Maranhão, Pacovan e Preciosa. As cultivares mais conhecidas (Prata, Pacovan, Maçã, Grande Naine e Terra) são muito suscetíveis à Sigatoka-negra e, à exceção da 'Terra' e 'Maçã', são também suscetíveis à Sigatoka-amarela. Com relação ao mal-do-Panamá, as cultivares Grande Naine e Terra, são

resistentes, a ‘Maçã’ é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis.

Uma das estratégias para a solução desses problemas é a obtenção de novas variedades resistentes de porte baixo, e, geralmente, é compatível com outras técnicas de manejo. Embora no Banco de Germoplasma de Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura exista variabilidade genética (diploides AA), o melhoramento é dificultado pela esterilidade constatada em alguns diploides e triploides e a falta de conhecimento do tipo de herança da resistência as pragas e doenças. As dificuldades resultantes da baixa produção de sementes ou em alguns casos, ausência de sementes em cruzamentos, podem ser contornadas, mediante a escolha adequada dos genitores e ou pelo uso de tecnologias não convencionais de melhoramento, como a indução de mutação (SILVA, et. al., 2011a; SILVA et. al., 2011b).

O método de melhoramento mais utilizado em bananeira é o cruzamento de diploides pré-melhorados AA (genitor masculino) com triploides comerciais e consequente geração de híbridos tetraplóides (SILVA, et. al., 2011a). Na Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde se usa triploides AAB, do tipo Prata e Maçã, a técnica é usada desde 1982 até os dias atuais, com relativo sucesso (SHEPHERD, 1987; SILVA et. al., 1999; SILVA et. al., 2011b).

No entanto, o melhoramento convencional tem sido dificultado por vários fatores que acometem as diferentes cultivares, seja a ausência de sementes, fator este que resulta da inexistência de pólen viável, esterilidade feminina, reduzido número de sementes ou, talvez, de polinizadores naturais eficientes. As cultivares que não produzem sementes quando polinizadas ou aquelas que as produzem em pequena quantidade podem tanto ser diplóides quanto triplóides. A ausência de sementes pode estar relacionada à intensa seleção agrônômica para este fator podendo ser, portanto, um reflexo do processo de domesticação da espécie (SHEPHERD et. al., 1986).

As dificuldades da hibridação na maioria das variedades têm levado o desenvolvimento de novas técnicas de melhoramento de bananeira para a criação de cultivares resistentes às doenças e de porte reduzido (SILVA et. al., 2011b).

Em situações onde existem limitações na variabilidade genética natural, ou dificuldades relacionadas às aplicações de métodos tradicionais de melhoramento, uma ferramenta de trabalho que pode superar estas barreiras é a indução de mutação por meio de agentes mutagênicos.

As mutações são definidas como alterações herdáveis na sequência do DNA não são derivadas de recombinação gênica e ou segregação genética (VAN HARTEN, 1998), e representam a base genética das variações. Estas mutações servem como ferramenta aos programas de melhoramento genético, pois acabam produzindo novas formas alélicas, que podem conferir novas características agrônômicas, aumentando a variabilidade disponível para o melhoramento (RAMALHO et. al., 1994). As mutações naturais ocorrem em taxas muito baixas, fator que limita a identificação de mutantes. No entanto, certas substâncias químicas podem ser utilizadas para aumentar as frequências de mutações e variações, a partir das quais mutantes de interesse agrônômico podem ser selecionados (PREDIERI, 2001).

A utilização de mutações como fonte de variabilidade constitui, desde a metade do século XX, ferramenta adicional na busca de novas variedades (GAUL, 1970). Os principais agentes mutagênicos podem ser divididos em químicos: etilnitroso-uréia (ENH), metil-nitroso-uréia (MNH), azida sódica (SA), etilmetanosulfonato (EMS), dietil sulfato, e físicos: raios X, raios gama, nêutrons rápidos, ultravioleta e raios laser (JAIN, 2002).

A indução de mutação mostra-se particularmente útil em situações onde há necessidade de alterações em poucas características de herança simples e em sistemas genéticos altamente desenvolvidos (ALLARD, 1971; RUTGER, 1983).

O uso de agentes mutagênicos para a obtenção de variabilidade tem sido amplamente empregado no melhoramento vegetal, em função da sua capacidade de alterar uma ou poucas características de cultivares bem estabelecidas, mas sem alterar suas características desejáveis (BROERTJES & HARTEN, 1988); e pode ser particularmente importante para o gênero *Musa*, que se caracteriza pelo sistema de reprodução assexuado, onde a variabilidade genética tende a ser naturalmente reduzida (NOVAK et. al., 1986). Nessas plantas propagadas vegetativamente, o evento de mutação induzida em uma célula somática, de qualquer camada celular no meristema caulinar ou no primórdio de gema axilar, será transmitido, e eventualmente, expresso em descendentes somáticos (clones). Uma vez encontrado algum mutante de interesse, este pode ser propagado vegetativamente, sem que seja alterada a combinação dos alelos, geralmente favoráveis (BRUCKNER, 1999).

A redução da altura da planta é uma das características mutantes mais frequentes em *Musa* spp., quando se utiliza a indução de mutação (NOVAK et. al., 1990; CÔTE et. al., 1993; ISRAELI et. al., 1995; TANG & HWANG, 1998; NEWBURY et. al., 2000; TANG & TAI, 2001). Por esta razão, a aplicação da mutagênese associada ao uso de outras tecnologias *in vitro*, se constitui em uma alternativa aos programas de melhoramento genético convencionais de bananeira, visando à redução do porte da planta, não somente por ampliar a variabilidade genética, mas também por reduzir o tempo até a seleção de mutantes com potencial para lançamento como uma nova cultivar.

Maluszynski (2001) relata que o raio gama têm sido o mutagênico a partir do qual, diretamente, via mutações, ou indiretamente, pelo uso de mutantes em cruzamentos, mais variedades têm sido liberadas. As vantagens da radiação gama, são a dosimetria acurada, razoável reprodutibilidade e a alta e uniforme penetração em sistemas multicelulares. Por meio do uso da radiação gama obtiveram mutantes com

características de maior produtividade, precocidade, menor altura, maior resistência a pragas, que foram utilizados na obtenção de novas variedades de diversas espécies de interesse agrônômico (MIKAELSEN, 1971).

O uso de mutagênicos físicos no melhoramento da bananeira foi sugerido antes de 1963 por Champion (BROERTJES & HARTEN, 1988), no entanto, apenas duas cultivares desenvolvidas por meio de raio gama foram relatadas. A primeira a ‘Klue Hom Thong KU1’ que apresenta elevado peso de cacho e a ‘Novaria’ com ciclo precoce e qualidade dos frutos (FAO/IAEA, 2009).

Jain (2005) relata que os principais objetivos da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), ao utilizar agentes mutagênicos em *Musa* spp., é integrar a radiação com o cultivo *in vitro* e com os métodos de genética molecular, para induzir variações desejáveis, como resistência a pragas, redução da altura de plantas e precocidade, assim como promover o desenvolvimento de métodos para a multiplicação rápida e em larga escala, dos mutantes ou segregantes.

Em bananeira, muitos trabalhos têm sido realizados visando à geração de variabilidade genética para o melhoramento, a partir de irradiação com agentes físicos e químicos (NOVAK et al., 1990; MATSUMOTO & YAMAGUCHI, 1990; DOMINGUES et. al., 1994; PÈREZ PONCE & ORELLANA, 1994; JAMALUDDIN, 1994; TULMANN NETO et. al., 1995; BHAGWAT & DUNCAN, 1998a; MAK et. al., 1996; ALVES, 2000; HO et. al., 2001; BERMÚDEZ et. al., 2002; GARCIA et. al., 2002; ROUX, 2004; LÓPEZ et. al., 2004 e RESENDE, 2005).

Novak et. al. (1990) regeneraram explantes da cultivar Grande Naine, irradiados com raio gama na dose de 60 Gy, do qual, identificaram uma planta com florescimento precoce (clone GN-60A). Este clone foi micropropagado e suas mudas testadas a campo, em quatro locais (ROUX et al., 1994). O clone floresceu significativamente mais cedo que os controles não irradiados (Grande Naine), sendo liberado

subseqüentemente com o nome de Novaria, e entrou em produção comercial na Malásia a partir de 1993 (MAK et al., 1996).

Bermúdez et. al. (2002), utilizando gemas adventícias de clones de bananeira das cultivares Maçã (AAB) e Gros Michel (AAA), irradiadas com raio gama, na dose de 25 Gy, obtiveram três mutantes resistentes a *Fusarium oxysporum* avaliados a campo, em solo infectado com o patógeno.

Matsumoto & Yamaguchi (1990) utilizaram a irradiação em conjunto com seleção *in vitro* e selecionaram um mutante de Cavendish tolerante ao alumínio. Usando também radiação, foi obtido por Ho et. al., (2001), outro clone dessa mesma cultivar resistente à murcha de Fusarium.

Domingues et. al., (1994) e Tulmann Neto et. al., (1995), utilizando a indução de mutação *in vitro*, com o uso de raio gama em ápices caulinares de bananeira, indicaram um maior aumento na variabilidade genética quando comparada com a taxa de variação somaclonal. O cobalto 60, com doses de 10 a 60 Gy, tem sido empregado para a obtenção de novas variedades de bananeira, produtivas, resistentes a pragas, de porte baixo (PÉREZ PONCE & ORELLANA, 1994; JAMALUDDIN, 1994); ou tolerantes ao alumínio (MATSUMOTO & YAMAGUCHI, 1991). Resultados obtidos por Jamaluddin (1994) com a indução de mutação *in vitro*, mediante o uso de raio gama, em doses que variaram de 10 Gy a 60 Gy e ou etilmetanossulfonato (EMS), levaram à seleção de clones da Grande Naine (Fatom-1) e de Pisang Rastali (AAB Maçã) mais precoces, com porte baixo e com maior rendimento.

Resende (2005) aplicando raio gama nas doses de 20 Gy em triplóides AAB (Pacovan) e 30 Gy em tetraplóides AAAB (Pacovan Ken) obteve ampla variabilidade genética para porte e uma série de mutantes para outras características, que foram avaliadas em campo.

A aplicação de raio gama, com o propósito de obter plantas com menor porte, surge como prática promissora, utilizada para reduzir os custos e as perdas de cachos por tombamento de planta durante a fase de produção.

Neste contexto, objetivou-se neste trabalho: 1) selecionar possíveis mutantes de banana Terra Maranhão obtidos por radiação gama com boas características agronômicas e altura reduzida; 2) avaliar a variabilidade genética e selecionar possíveis mutantes de banana Terra Maranhão submetidos à radiação gama com base em dados agronômicos e perfis de marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) utilizando a estratégia Ward-MLM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allard, RW. **Princípios de melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher. 381 p. 1971.

Alves, GD. **Indução de mutação em gemas micropropagadas de bananeira ‘Nanicão’ (*Musa spp.*, Grupo AAA) e seleção de mutantes tolerantes à salinidade**. Tese (Doutorado)–Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 105 p. 2000.

Bakry, F.; Carreel, F.; Jenny, C.; Horry, J. Genetic improvement of banana. In: Jain, SM.; Priyadarshan, PM. (Eds.). **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species**. Springer, p.3-46. 2009.

Bermúdez, I.; Herrera, I.; Orellana, N.; Veitia, N.; Romero, C.; Clavelo, J.; Garcia, L.; Acosta, M.; Garcia, L.R.; Padrón, Y. Study of experimentally-induced variants of ‘Manzano’ (AAB) and ‘Gros Michel’ (AAA) bananas for their potencial resistance to *Fusarium wilt*. **Infomusa**, Montpellier, v.11, n.2, p.7-8, 2002.

Bhagwat, B.; Duncan, E.J. (1998a). Mutation breeding of Highgate (*Musa acuminata* AAA) for tolerance to *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* using gamma irradiation. **Euphytica** 101:143-150.

Broertjes, C.; Van Harten, AM. **Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops**. Amsterdam: Elsevier, 345p. 1988.

Bruckner, C. H. Melhoramento de fruteiras. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. p.679-714. 1999.

Champion, J. **Les bananiers et leur culture**; Tome I: Botanique et genetique. Paris: IFAC,. 214p. 1967.

Côte, FX.; Sandoval, JA.; Marie, PH.; Auboiron, E. Variations in micropropagated bananas and plantains: literature survey. **Fruits**, Paris, v.48, p.11-18, 1993.

Domingues, ET.; Tulmann-Neto, A.; Mendes, BM.J.; Ando, A . Efeitos de doses de raios gama em ápices caulinares de bananeira (*Musa* sp.) desenvolvidos *in vitro* para indução de mutação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.7, p.1091-1098, 1994.

FAO/IAEA. **Mutant Varieties Databases**. Disponível em:<<http://www.iaea.org/MDV/>>. Acesso em: 17 dez 2011.

Food and agriculture organization of the united nations. **FAOSTAT**. 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acessado em: 14 Dez. 2012.

Garcia, LR.; Pérez, PJ.; Bermúdez, IC.; Orellana, PP.; Veitia, NR.; Padrón, YM.; Romero, CQ. Comparative study of variability produced by induced mutation and tissue culture in banana (*Musa* sp.) cv ‘Grande naine’. **Infomusa**, 11(2):4-6. 2002.

Gaul, H. Mutagen effects observable in the first generation. In: **Manual Mutation Breeding**, IAEA. 1969, New Delhi Proceeding. Vienna: FAO/IAEA Division 1971. 106.1970.

Ho, YM.; Mak, C.; Liew, KW. Selection of banana cultivars for tolerance to *Fusarium wilt* race 4 in Malaysia. In: Molina, AB.; Nik Masdek, NH.; Liew, KW. (Ed.). **Banana Fusarium wilt management: towards sustainable cultivation**. International Network for the Improvement of Bananas and Plantains – Asia and Pacific Network, Los Baños, Laguna, p.234-242. 2001.

Israeli, Y.; Lahav, E.; Reuveni, O. *In vitro* culture of bananas. In: GOWEN, S. (Ed.). **Bananas and plantains**. London: Chapman and Hall, p.147-178. 1995.

Jain, SM. A review of induction of mutations in fruits of tropical and subtropical regions. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.575, p.295-302, 2002.

Jain, SM. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.82, p.113-123, 2005.

Jamaluddin, SH. Mutation breeding of banana in Malaysia. In: Jones D.R. (Ed.) **The improvement and testing of Musa: a global Workshop**. Montpellier: INIBAP. p.228-232. 1994.

López, J.; Strosse, H.; De LAC. Ventura, J.; Sánchez, R.; Rodríguez, S.; Swennen, R.; Panis, B.; Afza, R. Field evaluation of potencial mutants obtained after gamma irradiation of banana and plantain (*Musa* spp.) shoot-tip and embryogenic cell cultures.

In: Jain, S.M.; Swennen, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Enfield: Science Publishers, p.87-96. 2004.

Mak, C.; Ho, YW.; Tan, YP.; Ibrahim, R. Novaria – un nuevo mutante de banano inducido por radiación gama. **Infomusa**, Montpellier, v.5, n.1, p.35-36, 1996.

Maluszynski, M. Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA Database. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.65, p.175-177, 2001.

Matsumoto, K.; Yamaguchi, H. Induction and selection of aluminum tolerance in the banana. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Plant mutation breeding to crop improvement**. Vienna: IAEA, 1991. v.2, p.249-256, 1991.

Mikaelsen, K. Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays, fast neutrons and ethyl methane sulphonate in rice. In: RICE BREEDING WITH INDUCED MUTATIONS III, IAEA, 1969, New Delhi **Proceedings...** Vienna: FAO/IAEA Division. ,p. 91-96. 1971.

Newbury, HJ.; Howell, EC.; Crouch, J.H.; Ford-Lloyd, BV. Natural and culture-induced genetic variation in plantains (*Musa* spp. AAAB group). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.48, p.493-500, 2000.

Novak, F.J.; Afza, R.; Van Duren, M.; Omar, M.S. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa* cvs). **Tropical Agriculture**, London, v.67, n.1, p.21-28, 1990.

Novak, FJ.; Brunner, H.; Afza, R.; Phadvibulya, V.; Hermelin, T.; Donni, B. Micropropagation and radiation sensitivity in shoot tip cultures of banana and plantain. In: International Atomic Energy Agency. **Nuclear technics and in vitro culture for plant improvement**. Vienna:IAEA, p.167- 174. 1986.

Perea, DM.; Constabel, C. Estratégias para el mejoramiento de bananos e platanos. **Augura- Revista**, Bogotá, v. 19, n. 1, p. 40, 1996.

Pérez Ponce J.; Orellana, P. Musa improvement in Cuba. In: Jones D.R. (Ed.) **The Improvement and testing of musa: o global Workshop**. Montpellier: INIBAP, p.203-206, 1994.

Predier I, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.64, p.185-210, 2001.

Ramalho, MAP.; Santos, JB.; Pinto, CABP. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 359p. 1994.

Resende, JCF. **Melhoramento da bananeira (*Musa spp.*) utilizando indução de mutação com raios gama e variação somaclonal para a redução da altura de plantas..** Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 155p. 2005.

Roux, NS. Mutation induction in *Musa* – review. In: Jain, SM.; Swennen, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Enfield: Science Publishers. p.23-32. 2004.

Roux, NS.; Afza, R.; Brunner, H.; Morburgo, R. Van Duren, M. Complementary approaches to cross-breeding and mutation breeding for musa improvement. In: Jones D.R. (Ed). **The improvement and testing of Musa: a global Workshop**. Montpellier, INIBAP, p.213-218 1994.

Rutger, JN. Applications of induced and spontaneous mutation in rice breeding and genetics. **Advance in agronomy**, New York, v. 36, p. 383-413, 1983.

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

Shepherd, K. Banana breeding – past and present. **Acta Horticulturae**, v. 196, p. 37-43, 1987.

Shepherd, K.; Dantas, JLL.; Alves, EJ. Melhoramento genético da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.12, n.133, p.11-19, 1986.

Shepherd, K.; Alves, EJ.; Ferreira, R. Classificação dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Banana (BAG) do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7, Florianópolis, SC. **Anais**. Florianópolis-SC: SBF/EMPASC, p.213-219. 1984.

Shepherd, K. **History and methods of banana breeding** In: Report of the First External Program and Management Review of the International Network for the

Improvement of Banana and Plantain, Washington, CGIAR SECRETARIAT, The World Bank, 1992, p.108-110.

Shepherd, K.; Dantas, JLL.; Alves, EJ. Melhoramento genético da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.12 p.11-19, 1986.

Silva, SO.; Shepherd, K.; Alves, EJ. Cultivares de banana. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Brasília: Embrapa- SPI, p.85-105. 1999.

Silva, SO.; Matos, AP.; Cordeiro, ZJM.; Lima, MJC.; Amorim, EP. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do mal-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 125-132, 2011a.

Silva, SO.; Morais-Lino, LS.; SEREJO, JAS. Melhoramento genético de bananeira para resistência à Sigatoka-negra. In: CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. de; Silva, S. de O. (Org.). **Recomendações técnicas sobre a Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: Nova Civilização Ltda., v. único, p. 61-70. 2011b.

Simmonds, N. W. **Los platanos**. Barcelona: Blume, 539p. 1973.

Tang, CY.; Hwang, SC. Selection and asexual inheritance of a dwarf variant of Cavendish banana resistant to race 4 of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v.38, p.189- 194, 1998.

Tang, CY.; Tai, CH. Improvement of the horticultural traits of Cavendish banana (*Musa spp*, AAA group) through somaclonal variation. **Tropical Agriculture**, London, v.78, n.1, p.40-47, 2001.

Tulmann-Neto, A.; Latado, RR.; Cesar dos Santos, P.; Boliani, A. Use of *in vitro* mutation induction for resistance to *Fusarium* wilt in the banana. In: **The Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement**. IAEA, Vienna, p.641-642. 1995.

Van Harten, AM. **Mutation breeding**: Theory and practical applications. Cambridge: Cambridge University Press, 353p, 1998.

## Seleção de possíveis mutantes de banana Terra Maranhão obtidos por radiação gama

Ronaldo Viana dos Reis<sup>(1)</sup>, Edson Perito Amorim<sup>(2)</sup>, Carlos Alberto da Silva Ledo<sup>(2)</sup>,  
Sebastião de Oliveira e Silva<sup>(2)</sup>, Zalmar Santana Gonçalves<sup>(3)</sup> e Aluizio Borém<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. CEP 36570-000.  
[ronaldo.viana@ufv.br](mailto:ronaldo.viana@ufv.br), [borem@ufv.br](mailto:borem@ufv.br).

<sup>2</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. [edson@cnpmf.embrapa.br](mailto:edson@cnpmf.embrapa.br), [ledo@cnpmf.embrapa.br](mailto:ledo@cnpmf.embrapa.br), [ssilva@cnpmf.embrapa.br](mailto:ssilva@cnpmf.embrapa.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. [zalmarufrb@hotmail.com](mailto:zalmarufrb@hotmail.com).

**Resumo** - O objetivo deste trabalho foi selecionar possíveis mutantes de banana Terra Maranhão obtidos por radiação gama com boas características agrônômicas e altura reduzida. Foram irradiadas 315 gemas *in vitro* com raio gama nas doses de 20 Gy, as quais foram subcultivadas e posteriormente avaliadas em campo durante dois ciclos de produção. A avaliação dos clones foi realizada com o objetivo principal de selecionar 10% das melhores plantas. O plantio foi feito no espaçamento 3 m x 4 m, e a adubação foi realizada de acordo com as recomendações técnicas para a cultura. Foram avaliadas em campo 233 plantas irradiadas e 41 testemunhas. Dentre as plantas irradiadas selecionadas, observaram-se genótipos que apresentam altura reduzida. Os genótipos Irra 04, Irra 13, Irra 19 e Irra 21 apresentaram altura de 3,6 m, valores abaixo da média das testemunhas selecionadas. Outros genótipos irradiados selecionados como o Irra 14 e Irra 16 com altura de 3,65 m se mostraram promissores, pois além da altura reduzida, apresentaram um bom peso de cacho e menor período de floração em relação à média das testemunhas, fator relevante para as próximas etapas de melhoramento. Estes

resultados confirmam a possibilidade de emprego da indução de mutação em bananeira tipo Terra para a obtenção de características agronômicas desejáveis e altura reduzida.

**Termos para indexação:** *Musa spp.*, porte baixo, seleção de mutantes.

**Abstract** - This work was possible mutant select banana Terra Maranhão obtained by gamma radiation with good agronomic characteristics and reduced height. 315 buds were irradiated in vitro with gamma ray doses of 20 Gy, which were subcultured and subsequently evaluated in the field during two growing seasons. The evaluation of the clones was performed with the main objective of selecting the best plants 10%. The planting was done in 3 mx 4 m spacing, and fertilization was performed according to the technical recommendations for culture. Were assessed in 233 plants irradiated and 41 witnesses. Among the irradiated plants selected were observed genotypes that exhibit reduced height. Genotypes Irra 04, Irra 13, Irra 19 and Irra 21 showed height of 3.6 m, below the average values of selected witnesses. Other genotypes irradiated selected as Irra Irra 14 and 16 with height of 3.65 m were promising, because besides the reduced height, had a good bunch weight and smaller flowering period compared to the average of the witnesses, a factor relevant to the next steps for improvement. These results confirm the possibility of using mutation induction in banana type Terra to obtain desirable agronomic characteristics and reduced height.

**Index terms:** *Musa spp.*, short stature, selection of mutants.

## **Introdução**

Com uma produção aproximada de 7,34 milhões de toneladas em 2011, e uma área cultivada de aproximadamente 528 mil hectares (FAO, 2012), o Brasil se destaca como o quarto produtor mundial de banana e, a Região Nordeste contribui com 40% da produção nacional.

Contudo, a bananicultura nacional enfrenta sérios problemas nas fases de produção e pós-colheita e um dos fatores que levam a perdas é a altura elevada das plantas nas principais cultivares comerciais. Plantas altas dificultam a colheita do cacho (LEDO et. al., 1997) e tendem a apresentar grande tombamento. Por outro lado, plantas de porte baixo, além de facilitar a colheita, possibilitam um maior adensamento e conseqüentemente, maior produtividade por unidade de área (ALVES & LIMA, 2000).

Bananas e plátanos estão entre as mais importantes culturas alimentares em todo o mundo e são cultivados em mais de 80 países tropicais, principalmente por pequenos agricultores. A principal representante do subgrupo plátano, no Brasil, é a cultivar Terra Maranhão. Essa cultivar apresenta suscetibilidade à sigatoka-negra e possui porte alto, características que dificultam o seu cultivo (SILVA et. al., 2002).

Uma estratégia para a solução deste problema é o desenvolvimento de novas cultivares a partir de hibridação seguida de seleção na progênie (SILVA, et. al., 2002; DONATO et. al., 2006). No entanto, no caso da bananeira, existem alguns obstáculos no melhoramento genético por meio dos métodos tradicionais que resultam na inexistência de pólen viável, esterilidade feminina, reduzido número de sementes, (DE GUZMAN et. al., 1982; SHEPHERD, 1987).

Em situações como esta, e no caso onde existem limitações na variabilidade genética natural disponível, ou dificuldades relacionadas às aplicações de métodos tradicionais de melhoramento, uma ferramenta que pode superar estas barreiras é a indução de mutação (PESTANA et. al., 2010).

As mutações são definidas como alterações herdáveis na sequência do DNA, e que não são derivadas de recombinação gênica e ou segregação genética, e representam a base genética das variações, (NIWA, 2006). Estas mutações servem como ferramenta aos programas de melhoramento genético, pois acabam produzindo novas formas alélicas, que podem conferir novas características agronômicas, aumentando os recursos genéticos disponíveis para o melhoramento.

A indução de mutação por raio gama e técnicas de propagação *in vitro* constituem instrumentos de grande utilidade nos programas de melhoramento para a redução do porte em bananeira. Essa técnica de mutação é indicada para cultivares elites e também para a obtenção de resistência a doenças ou características agronômicas governadas por um ou poucos genes, uma vez que conserva as outras características do fenótipo original (BERMUDEZ-CARABALLOSO et. al., 2010).

Por esta razão, a aplicação da mutagênese associada ao uso de outras tecnologias *in vitro* constitui uma promissora alternativa aos programas de melhoramento genético desta espécie, visando à redução do porte da planta, ampliação da variabilidade genética e também para reduzir o tempo até a seleção de mutantes com potencial para lançamento como uma nova cultivar.

Neste contexto, objetivou-se neste trabalho avaliar a variabilidade genética e selecionar genótipos com boas características agronômicas e altura reduzida em um conjunto de possíveis mutantes de banana Terra Maranhão obtidos por radiação gama.

## **Material e Métodos**

### **Irradiação gama de gemas *in vitro***

Foram irradiadas 315 gemas *in vitro*, utilizando  $\text{Co}^{60}$  no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), vinculado a Universidade de São Paulo (USP). A dose utilizada foi de 20 Gy, previamente identificada no teste de sensibilidade (PESTANA et. al., 2010). Cinquenta gemas foram usadas como testemunhas, as quais também foram enviadas ao CENA/USP, porém sem exposição ao  $\text{Co}^{60}$ .

As gemas irradiadas foram transferidas para meio de cultura básico MS, solidificado com  $2,2 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel, e suplementado com 30 g de sacarose e benzilaminopurina (BAP) na concentração de  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 5,8. Em seguida as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente e oito horas de escuro. As mudas foram submetidas a quatro subcultivos, realizados em intervalos de 30 dias.

Após os subcultivos, as plantas foram enraizadas em meio MS, com adição de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido naftaleno acético (ANA) e  $8 \text{ g L}^{-1}$  de ágar como geleificante, com o pH ajustado para 5,8 sendo posteriormente conduzidas a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente com intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e oito horas de escuro com temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , onde permaneceram por um período de 35-40 dias.

As plantas já enraizadas foram levadas para casa-de-vegetação, onde foram aclimatadas em tubetes contendo substrato comercial Plantmax (composto por casca de madeira processada, vermiculita expandida, carvão granulado, turfa processada e enriquecida com macro e micronutrientes) e em telado com sombrite 50 % de luminosidade e irrigação realizada por nebulização automática.

### **Avaliação preliminar dos supostos mutantes em casa-de-vegetação**

Visando determinar o crescimento inicial uma avaliação preliminar dos possíveis mutantes foi realizada em casa-de-vegetação, na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas (BA).

Durante o desenvolvimento das plantas, foram realizadas medições biométricas, aos 30, 60 e 90 dias após o plantio em casa-de-vegetação, das seguintes características agronômicas: altura de plantas (ALP), diâmetro do pseudocaule (DIA) e número de folhas (NFL), e a altura de planta apresentou uma tendência de menor desenvolvimento entre os tratamentos irradiados quando comparados com as testemunhas, (PESTANA et. al., 2010).

### **Avaliação dos supostos mutantes em campo**

O experimento foi conduzido no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura tendo como objetivo selecionar clones de bananeira do tipo Terra com menor porte e boas características agronômicas.

A implantação do experimento foi realizada com o objetivo principal de selecionar cerca de 10% das melhores plantas. O plantio foi feito no espaçamento 3 m x 4 m, e a adubação foi realizada de acordo com as recomendações técnicas para a cultura. A avaliação e seleção foram feitas com as plantas irradiadas e não irradiadas (testemunhas) que completaram os dois ciclos de produção no campo.

As avaliações foram realizadas no período do florescimento nos dois ciclos de produção, quanto às seguintes características agronômicas: [número de dias do plantio a floração, (NPF); número de dias do plantio a colheita, (NPC); número de dias da floração a colheita, (NFC); diâmetro do pseudocaule, (DIA) (cm); altura de planta, (ALT) (m); número de folhas até o florescimento, (NFO); número de filhos, (NFI); peso do cacho, (PCA) (kg); peso de penca, (PPE) (kg); número de frutos, (NFR); peso médio

de frutos, (PMF) (g); comprimento dos frutos da segunda penca, (CFS) (cm); comprimento do fruto da penúltima penca, (CFP) (cm); diâmetro do fruto da segunda penca, (DFS) (mm); diâmetro do fruto da penúltima penca, (CFP) (mm); número de pencas, (NPE); número de folhas vivas na colheita, (NFO); comprimento do pedúnculo, (COP) (cm); diâmetro do pedúnculo, (DIP) (cm); comprimento do engaço, (CEN) (cm); diâmetro do engaço, (DEN) (cm)]

### **Análise dos dados**

Inicialmente avaliou-se a divergência genética dos 111 supostos mutantes utilizando 21 características agronômicas, a matriz de distancia genética foi obtida através do Aplicativo Computacional Genes, (CRUZ, 2006), a análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Mean), utilizando o software Mega-4.1 (TAMAURA et. al., 2007), com base na matriz de distância euclidiana média. O coeficiente de correlação cofenético entre a matriz de distancia genética e a matriz dos valores cofenético, foi calculado usando o software R (2010) a fim de verificar a consistência do agrupamento.

Para selecionar cerca de 10% das plantas com menor altura, utilizou-se a metodologia proposta por Resende (2005).

Inicialmente foi realizada uma classificação individual das plantas da população, para as características consideradas importantes na seleção; como menor porte de planta, menor número de dias do plantio ao florescimento e maior massa do cacho. Os dados obtidos para essas características foram organizados em ordem crescente (para altura de planta e números de dias para emissão do cacho) e decrescente (para massa do cacho), obtendo-se o número da classificação de cada planta.

Em seguida, um índice de seleção baseado no ranking de cada genótipo foi calculado multiplicando-se o número da classificação de cada planta pela massa correspondente a cada característica. Para altura de planta foi dado peso seis por ser considerada a mais relevante e para número de dias do plantio ao florescimento e massa do cacho peso dois. No fim desse processo, obteve-se a pontuação final, para cada planta, resultado do uso do seguinte índice de seleção  $y = [0,6 \times (\text{classificação de altura}) + 0,2 \times (\text{classificação da emissão de cacho}) + 0,2 \times (\text{classificação da massa do cacho})]$ . Em cada ciclo, a pontuação final foi ordenada crescentemente, obtendo-se a classificação final.

## **Resultados e Discussão**

Determinar a diversidade genética entre os indivíduos é um ponto importante e decisivo para o agrupamento e análise da diversidade genética dentro e entre populações (Kosman e Leonard 2005), neste contexto, a variabilidade genética de 111 possíveis mutantes foi analisada usando 21 características quantitativas através da distância euclidiana média e o dendograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Mean) (Figura 1).

A distância entre os possíveis mutantes variou 0,086 a 0,555, com distância média de 0,256 e o coeficiente de correlação cofenético 0,778, valor considerado muito bom nesses estudos (VAZ PATTO et al. 2004; PESTANA et al., 2011).

Os genótipos mais próximos foram Irra 78 e Irra 93, com distância genética de 0,086 e os mais distantes foram Irra 48 e o Irra 54 com 0,555.

Os resultados comprovam a existência de variabilidade entre os possíveis mutantes que pode ser explorada e que esta variabilidade é principalmente devido ao efeito da radiação gama, a variação somaclonal e os subcultivos normalmente não

levam há alterações genéticas em um grande número de clones a partir do mesmo genótipo.

Resultado semelhante foi observado no estudo conduzido por Pestana et. al., (2011) em que os autores trabalhando com banana tipo Prata identificaram distância genética entre os possíveis mutantes que variou de 0,26-0,64, com distância média de 0,459 e o coeficiente de correlação cofenético de 0,7669. Os possíveis mutantes mais próximos foram o Pacovan 65 e Pacovan 67, com 0,26 e a distância genética mais dissimilar foi Pacovan 26 e Pacovan 2 com 0,64.

A contribuição relativa dos caracteres agrônômicos para a divergência dos possíveis mutantes de banana Terra Maranhão é apresentada na Tabela 1.

A variável que mais contribuiu para a divergência genética foi o número de dias do plantio a colheita (NPC) com 36% e em seguida a variável número de dias do plantio a floração (NPF) com 28%. Os caracteres de produção como peso médio dos frutos (PMF) e peso do cacho (PCA), apresentam valores de 21% e 7% de contribuição relativa para a diversidade genética, respectivamente (Tabela 1).

Com a indução de mutação os possíveis mutantes passaram a ter comportamentos distintos que ficou mais evidenciado na avaliação dos ciclos de produção, e confirma que há variabilidade entre os genótipos estudados e que há condições de selecionar possíveis mutantes de ciclo precoce e maior produtividade.

As variáveis, número de frutos (NFR), peso de cacho (PCA), peso médio dos frutos (PMF) e altura de planta (ALT) dos genótipos irradiados e das testemunhas referentes aos dois ciclos de produção são apresentadas na Tabela 2.

Quando se analisa os valores médios, as plantas irradiadas e as testemunhas apresentam valores similares em relação ao número de dias do plantio a colheita (NPC), número de dias do plantio a floração (NPF) e número de dias da floração a colheita (NFC), (Tabela 2).

Se analisar o desempenho individual de cada genótipo, é possível observar que alguns selecionados no segundo ciclo de produção apresentam resultados melhores que às testemunhas em relação às características agrônômicas mais relevantes como, peso de cacho (PCA), número de dias do plantio a colheita (NPC) e também para altura de planta (ALT), portanto, é possível afirmar, que a seleção se mostra promissora. Bermúdez et al. (2000), trabalhando com mutantes da cultivar FHIA-21, observaram já no primeiro ciclo uma variação de 4,8%, e as características mais alteradas foram, altura de planta e número de frutos por cacho. Resultados semelhantes foram encontrados nesse trabalho, em que, alguns genótipos irradiados apresentaram diferenças significativas em relação às testemunhas para as características estudadas.

Jamaluddin (1994) trabalhando com a indução de mutação *in vitro* através da radiação em bananeira com doses que variaram de 10 Gy à 60 Gy e ou etilmetanossulfonato (EMS), levaram a seleção de clones de ‘Grande Naine’ (Fatom-1) e de ‘Pisang Rastali’ (AAB maçã) mais precoces.

As características peso do cacho (PCA), peso de penca (PPE) e o peso médio dos frutos (PMF), apresentaram valores superiores nas plantas selecionadas em relação às testemunhas no primeiro ciclo, entretanto, estas diferenças surtiram pouco efeito (Tabela 3). No entanto, no segundo ciclo, as variáveis PCA, PPE e PMF foram pouco maiores nas testemunhas e a altura de planta (ALT) ficou praticamente com a mesma média. Observa-se também que de um ciclo para o outro ocorreu uma diminuição de 49 cm na média das plantas selecionadas (Tabela 3).

Por meio da seleção realizada utilizando-se o índice de peso segundo a importância das características altura de planta, número de dias do plantio a colheita e peso do cacho selecionaram-se 22 genótipos irradiados.

Dentre as plantas irradiadas selecionadas, têm-se genótipos que apresentam altura reduzida (Figura 2). Os genótipos Irra 04, Irra 13, Irra 19 e Irra 21 com altura de

3,60 metros apresentaram valores abaixo aos da média das testemunhas que tem de 3,74 metros de altura, portanto, após a seleção, é possível inferir que as plantas selecionadas apresentam características agronômicas favoráveis, como altura reduzida, e que o método de seleção aplicado foi eficiente e possibilitou a condição de podermos selecionar genótipos para essa característica. Essa variação foi também observada no trabalho avaliado em campo e conduzido por Resende (2005) em que aplicou radiação gama nas doses de 20 Gy em triplóides AAB (Pacovan) e 30 Gy em tetraplóides AAAB (Pacovan Ken) obtendo ampla variabilidade genética para porte e uma série de mutantes para outras características.

Outros genótipos irradiados selecionados como o Irra 14 e Irra 16 com altura de 3,65 metros se mostraram promissores, além da altura reduzida, apresentaram um bom peso de cacho e menor período de floração em relação à média das testemunhas, fator relevante para as próximas etapas de melhoramento.

Resultado semelhante foi observado por López et. al., (2004) avaliando quatro cultivares de bananeira, 'SH3436-L9 (AAAA), 'Parecido al Rey' (AAA), 'Gran Enano' (AAA) e 'Burro CEMSA' (AAB), em condições de campo, verificaram ampla variação nas características avaliadas. Nove clones provenientes da irradiação com 45 Gy, da cultivar SH3436-L9 apresentaram no primeiro ciclo, menor altura, florescimento mais precoce, maior número de pencas por cacho, mais frutos por cacho e peso de cacho superior em comparação com a média do controle, e, no terceiro ciclo de produção, dois clones provenientes de tratamento com irradiação da 'Parecido al Rey' tiveram altura significativamente menor que as plantas testemunhas.

Os resultados indicam que a aplicação da radiação gama é uma técnica promissora para o propósito de obter plantas com altura reduzida.

## **Conclusões**

Dentre os possíveis mutantes selecionados, há genótipos de altura reduzida e com boas características agronômicas como o Irra 14 e Irra 16.

Estes resultados confirmam o potencial da indução de mutação em bananeira tipo Terra para desenvolvimento de variedades com características agronômicas desejáveis e altura reduzida.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto e pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor.

### **Referências Bibliográficas**

ALVES, E. J.; LIMA, M. B. Tratos Culturais. In: CORDEIRO, Z. J. M. (org.). **Banana. Produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferências de Tecnologia**, p.83-91, 2000.

BERMÚDEZ, I.; ORELLANA, P.; PÉREZ PONCE, J.; CLAVERO, J.; VEITÍA, N.; ROMERO, C.; MUJICA, R.; GARCIA, L. Improvement of the hybrid plantain clone FHIA-21 by mutagenesis in vitro. **Infomusa**, v.9, p.16-19, 2000.

BERMUDEZ-CARABALLOSO, I.; GARCÍA, L.R.; VEITÍA, N.; TORRES, D.; PADRÓN, Y.; ROMERO, C.; ORELLANA, P. Mutant plantains (*Musa* spp.) with height reduction obtained by in vitro mutagenesis. **Euphytica**, v.176, p.105-112, 2010.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2006. 442 p.

DE GUZMAN, E.V.; DEL ROSARIO, A.G.; PAGCALIWAGAN, P.C. Production of mutants by irradiation of in vitro-cultured tissues of coconut and banana and their mass propagation by the tissue culture technique. In: **Final research coordination meeting on induced mutations in vegetatively propagated plants**, Vienna, 1982. Vienna: IAEA, p.113-138. 1982.

DONATO, S.L.R.; SILVA, S. O.; LUCCA FILHO, O.A.; LIMA, M.B.; DOMINGUES, H.; ALVES, J. S. Correlação entre caracteres da planta e do cacho em bananeira (*Musa* spp). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG: UFLA, v. 30, n. 1, p. 21-30, Jan/Fev. 2006.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nations. Disponível em: <[faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567](http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567)>. Acesso em: 6/10/2012.

JAMALUDDIN, S.H. Mutation breeding of banana in Malaysia. In: JONES D.R. (Ed.) **The improvement and testing of Musa: a global Workshop**. Montpellier: INIBAP, p. 228-232. 1994.

KOSMAN E, LEONARD J. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid and polyploidy species. **Molecular Ecology**. v.14, p. 415–424. 2005.

LEDO, A. S.; LEDO, F. J.; SILVA, S.O. Avaliação de cultivares de banana em Rio Branco, Acre. Rio Branco: Embrapa-CPAF/AC, 1997. 16p. (**Boletim de pesquisa, 15**). Disponível em: <<http://www.cpaufac.embrapa.br/pdf/bp15.pdf>> Acesso em: 20 de Out. 2012.

LÓPEZ, J.; STROSSE, H.; DE LA C. VENTURA, J.; SÁNCHEZ, R.; RODRÍGUEZ, S.; SWENNEN, R.; PANIS, B.; AFZA, R. Field evaluation of potential mutants obtained after gamma irradiation of banana and plantain (*Musa* spp.) shoot-tip and embryogenic cell cultures. In: JAIN, S.M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Enfield: Science Publishers, p.87-96. 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

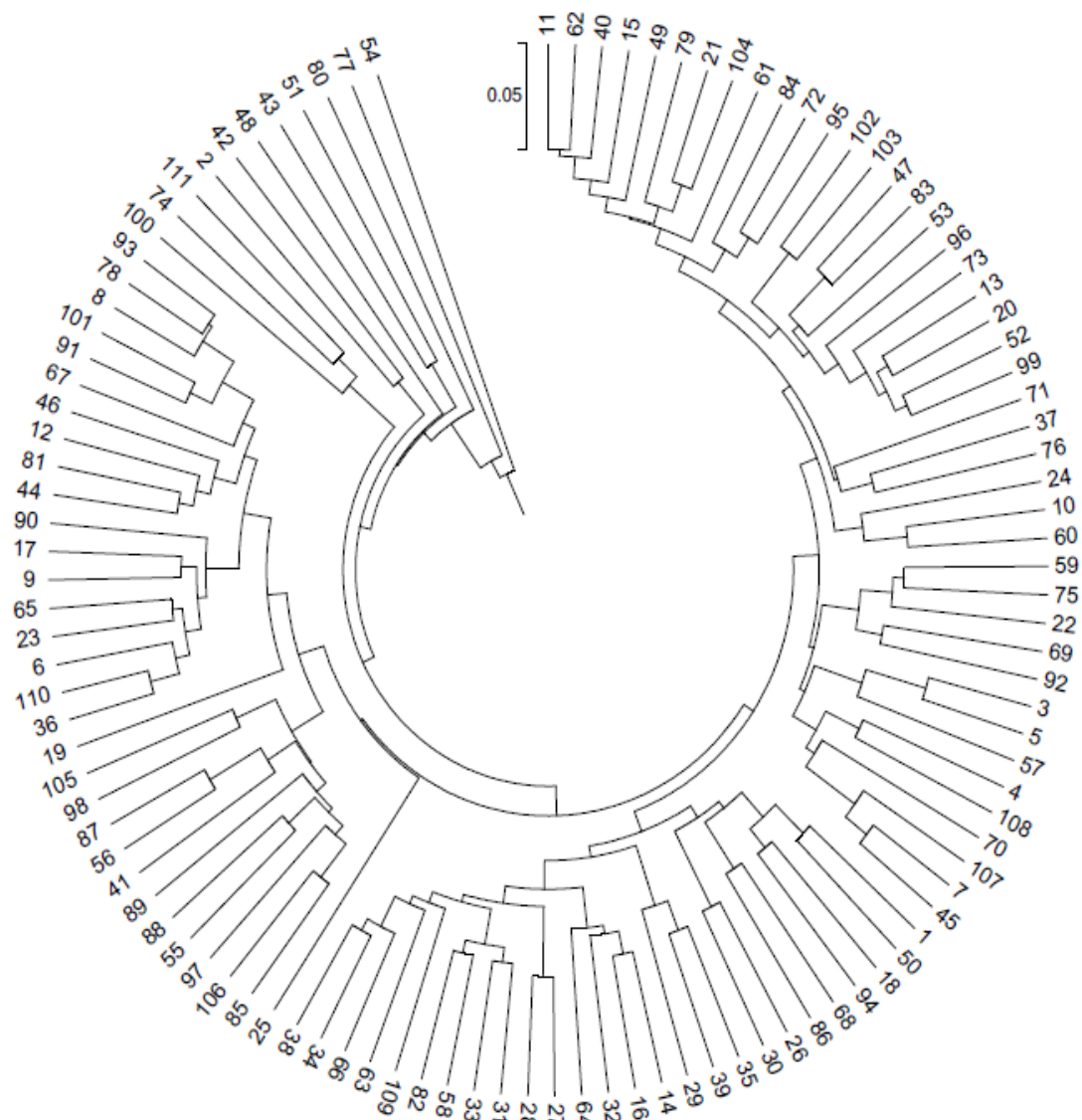
NIWA, O. Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci. **Mutation Research** v. 598, n XX, p.61-72, 2006.

PESTANA, R.K.N.; AMORIM, E.P.; SILVA, S.O.; TULMANN NETO, A. Irradiação gama para mutagênese in vitro em bananeira 'Terra Maranhão'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1328- 1330, 2010.

PESTANA RKP.; AMORIM EP.; FERREIRA, CF.; AMORIM, VBO.; OLIVEIRA, LS.; LEDO, CAS.; SILVA, SO. Agronomic and molecular characterization of gamma

- ray induced banana (*Musa* sp.) mutants using a multivariate statistical algorithm. **Euphytica**. 178:151–158. 2011.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM., **R: A language and environment for statistical computing**. [2.12.1]. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. 2010.
- RESENDE JCF. **Melhoramento da bananeira (*Musa* spp.) utilizando indução de mutação com raios gama e variação somaclonal para a redução da altura de plantas**. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 155p. 2005.
- SHEPHERD, K. Banana breeding: past and present. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.196, p.37-43, 1987.
- SILVA, S. de O.; FLORES, J. C. O.; LIMA NETO, F. P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.11, p.1567-1574, 2002.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics e Plant Breeding**, v.41, p.237-245, 1981.
- TAMAURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 24:1596–1599, 2007.

VAZ PATTO MC, SATOVIC Z, PÊGO S, FEVEREIRO P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasma using microsatellite markers. **Euphytica**, 137:63–67, 2004.



**Figura 1.** Dendrograma obtido de 21 variáveis quantitativas através da matriz de distancia genética de 111 possíveis mutantes de banana Terra Maranhão induzidos por radiação gama com base na distancia euclidiana média.

**Tabela 1.** Contribuição relativa dos caracteres agrônômicos para divergência dos possíveis mutantes de banana Terra Maranhão obtidos por radiação gama pelo método de Singh (1981).

Variáveis	S . j	Valor %
NPF	25656234	28,8268
NFC	2804094	3,1506
NPC	32405948	36,4106
ALT	759,278	0,0009
DIA	78249,43	0,0879
NFF	29330	0,033
NFI	35342	0,0397
CEN	23744	0,0267
DEN	1761390	1,9791
NPE	221062,2	0,2484
NFR	22640	0,0254
PCA	6368264	7,1552
PPE	269971,6	0,3033
PMF	254102	0,2855
CFS	18912263	21,2494
CFP	75126,98	0,0844
DFS	65520,5	0,0736
DFP	3782,76	0,0043
COP	2832,56	0,0032
DIP	10490,38	0,0118

NPF: número de dias do plantio à floração; NFC: número de dias da floração à colheita; NPC: número de dias do plantio à colheita; DIA: diâmetro do pseudocaule (cm); ALT: altura de planta (m); NFF: número de folhas na floração; NFI: número de filhos; NFC: número de folhas vivas na colheita; CEN: comprimento do engaço (cm); DEN: diâmetro do engaço (cm); NPE: número de pencas; NFR: número de frutos; PCA: Peso de cacho (kg); PPE: Peso de pencas (kg); PMF: Peso médio do fruto (g); CFS: comprimento do fruto da segunda penca (cm); CFP: comprimento do fruto da penúltima penca (cm); DFS: diâmetro do fruto da segunda penca (mm); DFP: diâmetro do fruto da penúltima penca (mm); COP: Comprimento do pedúnculo DIP: Diâmetro do pedúnculo.

**Tabela 2.** Médias para as características agronômicas dos possíveis mutantes de banana Terra Maranhão e das testemunhas em dois ciclos de produção.

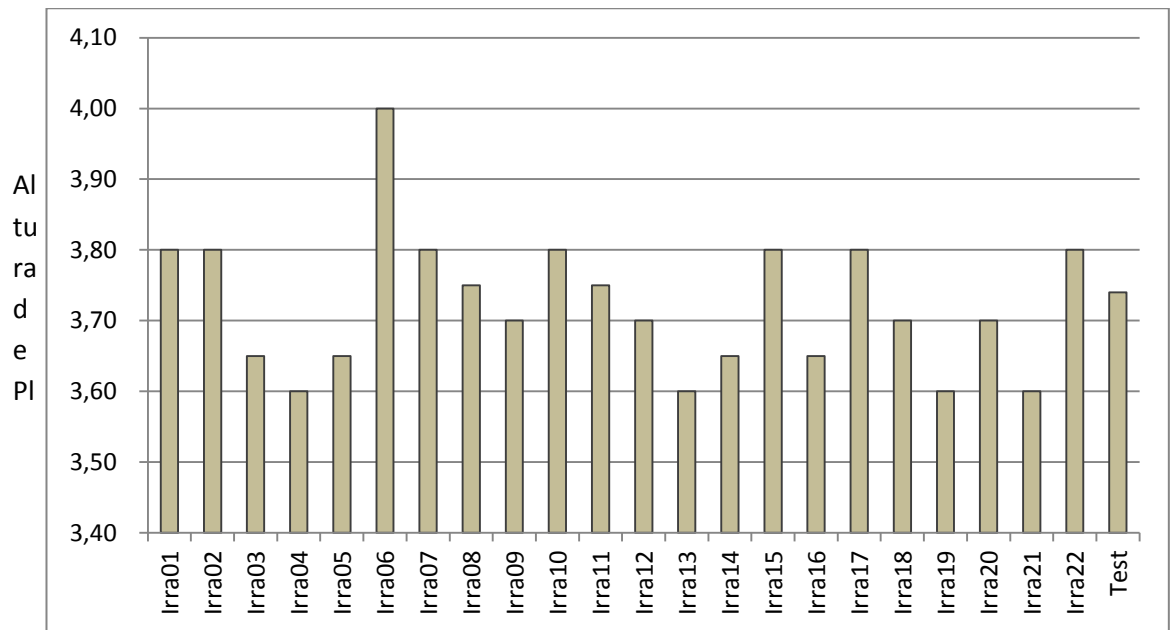
Variáveis	Irradiadas	Testemunhas
NPF	465,9	442,33
NFC	104,79	105,12
NPC	571,06	547,33
ALT	3,97	3,74
DIA	25,09	25,28
NFF	10,18	10,16
NFI	8,34	8,50
CEN	48,27	44,73
DEN	6,02	5,76
NPE	9,75	9,66
NFR	142,27	138,33
PCA	26,92	22,63
PPE	24,84	26,06
PMF	175,12	167,51
CFS	20,23	20,83
CFP	17,69	17,71
DFS	3,99	3,86
DFP	3,39	3,36
COP	4,96	5,45
DIP	1,25	1,25

NPF: número de dias do plantio à floração; NFC: número de dias da floração à colheita; NPC: número de dias do plantio à colheita; DIA: diâmetro do pseudocaule (cm); ALT: altura de planta (m); NFF: número de folhas na floração; NFI: número de filhos; NFC: número de folhas vivas na colheita; CEN: comprimento do engaço (cm); DEN: diâmetro do engaço (cm); NPE: número de pencas; NFR: número de frutos; PCA: Peso de cacho (kg); PPE: Peso de pencas (kg); PMF: Peso médio do fruto (g); CFS: comprimento do fruto da segunda penca (cm); CFP: comprimento do fruto da penúltima penca (cm); DFS: diâmetro do fruto da segunda penca (mm); DFP: diâmetro do fruto da penúltima penca (mm); COP: Comprimento do pedúnculo DIP: Diâmetro do pedúnculo.

**Tabela 3.** Desdobramento da interação tratamentos x ciclos dos possíveis mutantes de banana terra selecionados e das testemunhas avaliados em dois ciclos de produção.

Variáveis	Ciclo 1		Ciclo 2	
	Selecionadas	Testemunhas	Selecionadas	Testemunhas
PCA	32,42	22,63	21,44	24,76
PPE	30,12	29,10	19,56	23,03
PMF	189,51	158,23	160,73	176,8
ALT	4,21	3,79	3,72	3,70

PCA: Peso de cacho (kg); PPE: Peso de pencas (kg); PMF: Peso médio do fruto (g); ALT: altura de planta (m).



**Figura 2.** Distribuição dos possíveis mutantes selecionados de banana Terra Maranhão e média das testemunhas (Test) para a variável altura de planta em metros (ALT).

## Dissimilaridade genética e seleção de possíveis mutantes de banana Terra Maranhão utilizando a estratégia Ward-MLM

Ronaldo Viana dos Reis<sup>(1)</sup>, Edson Perito Amorim<sup>(2)</sup>, Bruno Portela Brasileiro<sup>(1)</sup>,  
Sebastião de Oliveira e Silva<sup>(2)</sup>, Rosa Karla Nogueira Pestana<sup>(1)</sup> e Aluizio Borém<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa. CEP 36570-000. Viçosa – MG.  
[ronaldo.viana@ufv.br](mailto:ronaldo.viana@ufv.br), [borem@ufv.br](mailto:borem@ufv.br).

<sup>2</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Caixa Postal 007, CEP 44380-000. Cruz das Almas, BA. [edson@cnpmf.embrapa.br](mailto:edson@cnpmf.embrapa.br), [ssilva@cnpmf.embrapa.br](mailto:ssilva@cnpmf.embrapa.br).

**Resumo** - O cultivo da bananeira é uma importante atividade e possui relevante papel econômico e social no mundo. O estudo da diversidade genética é importante para programas de melhoramento, especialmente na elucidação da variabilidade genética disponível para os melhoristas. As características agronômicas e os marcadores moleculares têm sido utilizados para determinar essa diversidade em muitas espécies. Objetivou-se nesse trabalho avaliar a variabilidade genética e selecionar possíveis mutantes de banana do tipo Terra (genoma AAB, Subgrupo Terra) submetidos à radiação gama com base em dados agronômicos e perfis de marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) utilizando a estratégia Ward-MLM. Foram avaliadas em campo 233 plantas irradiadas e 41 testemunhas. Os dados agronômicos e moleculares foram submetidos ao algoritmo estatístico Ward-MLM no programa SAS. A análise de agrupamento foi realizada pelo método da distância média ou também denominado de método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA) com base na matriz de distância do algoritmo Gower e o coeficiente de correlação cofenético foi calculado usando o software R. A distância entre os possíveis mutantes variou 0,26 a

0,55, com distância média de 0,426 e o coeficiente de correlação cofenético 0,79. Os três supostos mutantes que foram selecionados com base nas melhores características agronômicas e altura baixa serão submetidos a novas avaliações nas próximas etapas do programa de melhoramento da Embrapa. Esta é a primeira tentativa de utilização de dados combinados em bananeira do tipo Terra com o intuito de selecionar mutantes e avaliar a variabilidade genética.

**Termos para indexação:** *Musa* spp., seleção de mutantes, variabilidade genética.

**Abstract** - The cultivation of banana is an important activity and has significant social and economic role in the world. The study of genetic diversity is important for breeding programs, especially in the elucidation of the genetic variability available to plant breeders. The agronomic traits and molecular markers have been used to determine this diversity in many species. The objective of this study was to evaluate the genetic variability and select mutants of possible Terra-type banana (AAB genome, Sub Terra) subjected to gamma radiation based on agronomic data and profiles of molecular markers *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) using the strategy Ward -MLM. Were assessed in 233 plants irradiated and 41 witnesses. The agronomic and molecular data were subjected to statistical algorithm Ward-MLM program in SAS. Cluster analysis was performed by the method of the average distance or also called clustering method midway between groups (UPGMA) based on the distance matrix algorithm Gower cofenético and the correlation coefficient was calculated using the software R. The distance between the possible mutants ranged from 0.26 to 0.55, with an average distance of 0.426 and correlation coefficient cofenético 0.79. The three putative mutants were selected based on best agronomic characteristics and low altitude will undergo further evaluation in the next stages of the breeding program of Embrapa. This is the

first attempt to use the combined data of the type in banana Earth in order to select mutants and assess genetic variability.

**Index terms:** *Musa* spp., selection of mutants, genetic variability.

## **Introdução**

O cultivo da bananeira é uma importante atividade do agronegócio mundial e possui relevante papel econômico e social no mundo, com uma área de plantio estimada de 4,1 milhões de hectares, em 107 países, e uma produção de 70 milhões de toneladas. Com uma produção aproximada de 7,34 milhões de toneladas em 2011, e uma área cultivada de aproximadamente 528 mil hectares, o Brasil se destaca como o quarto produtor mundial de banana e, a Região Nordeste contribui com 40% da produção nacional, onde se estima que a produção dessa fruta empregue 960 mil pessoas, (FAO, 2012).

O estudo da diversidade genética é muito importante em programas de melhoramento, especialmente na elucidação da variabilidade genética disponível para os melhoristas. E os marcadores moleculares têm sido utilizados para determinar essa diversidade em muitas espécies (JOSHI et. al., 2000; GAUDEUL et. al., 2000 QIAN et. al., 2001; GUASMI et. al., 2008).

Os marcadores moleculares surgiram como importantes ferramentas para a detecção dos efeitos da radiação gama, uma vez que, com o advento de técnicas modernas, detectam polimorfismo genético ao nível de DNA (OLIVEIRA et. al., 1996).

Estes marcadores, especialmente aqueles baseados em métodos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), incluindo, AFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites ou

SSRs (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), têm sido amplamente usados para estimar a diversidade genética, estabilidade genética e estudos filogenéticos em bananas (CRESTE et al., 2004; LAKSHMANAN & VENKATARAMAREDDY 2007; NING et. al., 2007; AMORIM et. al., 2008, 2009a, 2009b; EL-KHISHIN et. al., 2009; MIRI et. al., 2009; MATTOS et. al., 2010; OPARA et. al., 2010).

A técnica baseada em ISSR é uma dentre muitas que utiliza *primers* de sequência simples repetitivas para amplificar regiões entre sequências alvo. Essa técnica tem a capacidade de gerar um grande número de marcadores multiloci, e ainda, pode ser aplicada para analisar praticamente qualquer organismo, mesmo aqueles para os quais se dispõe de pouca ou nenhuma informação genética prévia (ARCADE et. al., 2000).

Além disso, os ISSRs são úteis para estudos genéticos, especialmente na detecção clonal e na revelação de indivíduos proximamente relacionados (SALIMATH et. al., 1995; OLIVEIRA et. al., 1996). Tais marcadores são dominantes e reproduzíveis, com a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo amplamente distribuídos ao longo do genoma de eucariontes (FANG & ROOSE, 1997; GUPTA et. al., 1994). Cada faixa corresponde a uma sequência de DNA delimitada por dois microssatélites invertidos. A amplificação não requer informações de sucessão do genoma e de padrões altamente polimórficos (ZIETKIEWICZ et. al., 1994).

Neste contexto, objetivou-se nesse trabalho avaliar a variabilidade genética e selecionar possíveis mutantes de banana do tipo Terra (genoma AAB, Subgrupo Terra) submetidos à radiação gama com base no conjunto de dados morfológicos, agronômicos e moleculares através da estratégia Ward-MLM.

## **Material e Métodos**

## **Irradiação gama de gemas *in vitro***

Foram irradiadas 315 gemas *in vitro*, utilizando  $\text{Co}^{60}$  no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), vinculado a Universidade de São Paulo (USP). A dose de raio gama utilizada foi de 20 Gy, previamente identificada no teste de sensibilidade (PESTANA et. al., 2010). Cinquenta gemas foram usadas como testemunhas, as quais também foram enviadas ao CENA/USP, porém sem exposição ao  $\text{Co}^{60}$ .

As gemas irradiadas foram transferidas para meio de cultura básico MS, solidificado com  $2,2 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel, e suplementado com 30 g de sacarose e benzilaminopurina (BAP) na concentração de  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 5,8. Em seguida as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente e oito horas de escuro. As mudas foram submetidas a quatro subcultivos, realizados em intervalos de 30 dias.

Após os subcultivos, as plantas foram enraizadas em meio MS, com adição de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido naftaleno acético (ANA) e  $8 \text{ g L}^{-1}$  de ágar como geleificante, com o pH ajustado para 5,8 sendo posteriormente conduzidas a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente com intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e oito horas de escuro com temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , onde permaneceram por um período de 35-40 dias.

As plantas já enraizadas foram levadas para casa-de-vegetação, onde foram aclimatadas em tubetes contendo substrato comercial Plantmax (composto por casca de madeira processada, vermiculita expandida, carvão granulado, turfa processada e enriquecida com macro e micronutrientes) e em telado com sombrite que controla 50 % da luminosidade e irrigação realizada por nebulização automática.

## **Avaliação preliminar dos mutantes em casa-de-vegetação**

Visando determinar o crescimento inicial uma avaliação preliminar dos possíveis mutantes foi realizada em casa-de-vegetação, na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas (BA).

Durante o desenvolvimento das plantas, foram realizadas medições biométricas, aos 30, 60 e 90 dias após o plantio em casa-de-vegetação, das seguintes características agronômicas: altura de plantas (ALP), diâmetro do pseudocaule (DIA) e número de folhas (NFL), e a altura de planta apresentou uma tendência de menor desenvolvimento entre os tratamentos irradiados quando comparados com as testemunhas, (PESTANA et. al., 2010).

### **Avaliação dos mutantes em campo**

O experimento foi conduzido no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura tendo como objetivo selecionar clones de bananeira do tipo Terra com menor porte e boas características agronômicas.

A implantação do experimento foi realizada sem adoção de delineamento experimental, e o objetivo principal do trabalho foi selecionar 10 % das melhores plantas em um grupo grande de bananeiras. O plantio foi feito no espaçamento 3 m x 4 m, e a adubação de fundação e cobertura foi realizada de acordo com as recomendações técnicas para a cultura. A avaliação e seleção foram feitas com as plantas irradiadas e não irradiadas (testemunhas) que completaram os dois ciclos de produção no campo.

As avaliações foram realizadas no período do florescimento em dois ciclos de produção, quanto às seguintes características agronômicas: número de dias do plantio ao florescimento, do plantio à colheita e do florescimento à colheita; diâmetro do pseudocaule (cm); altura da planta (m); número de folhas vivas na floração, número de

filhos; e na colheita dos cachos: peso do cacho (kg) e das pencas (kg), peso médio dos frutos (g); número de frutos por cacho; comprimento do fruto da segunda e da penúltima penca (cm); diâmetro do fruto da segunda penca e da penúltima penca (mm); número de pencas e de folhas vivas na colheita; comprimento do engaço (cm); diâmetro de engaço (mm).

### **Seleção dos mutantes para porte baixo**

Para selecionar 10% das plantas com menor porte, utilizou-se a metodologia proposta por Resende (2005).

Inicialmente foi realizada uma classificação individual das plantas da população, para as características consideradas importantes na seleção; como menor porte de planta, menor número de dias do plantio ao florescimento e maior massa do cacho. Os dados obtidos para essas características foram organizados em ordem crescente (para altura de planta e números de dias para emissão do cacho) e decrescente (para massa do cacho), obtendo-se o número da classificação de cada planta.

Em seguida, um índice de seleção baseado no ranking foi calculado multiplicando-se o número da classificação de cada planta pelo coeficiente correspondente a cada característica. Para altura de planta foi dado peso seis por ser considerada a mais relevante e para número de dias do plantio ao florescimento e massa do cacho peso dois. No fim desse processo, obteve-se a pontuação final, para cada planta, resultado do uso do seguinte índice de seleção  $y = [0,6 \times (\text{classificação de altura}) + 0,2 \times (\text{classificação da emissão de cacho}) + 0,2 \times (\text{classificação da massa do cacho})]$ . Em cada ciclo, a pontuação final foi ordenada crescentemente, obtendo-se a classificação final.

As plantas selecionadas foram aquelas que estavam presentes entre as 10% melhores classificadas, nos dois ciclos de produção (Figura 1).

### ***Primers* ISSR**

Foram utilizados um total de 14 *primers* ISSR. Informações sobre as suas respectivas sequências, temperaturas de anelamento (Ta) e número total de bandas (NTB) podem ser obtidas na Tabela 1.

### **Extração de DNA e condições de PCR**

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens, utilizando-se o método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990). A avaliação da quantidade e qualidade do DNA foi efetuada mediante análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, sendo as amostras diluídas em água ultrapura e padronizadas em 10 ng mL<sup>-1</sup>.

Para as reações de amplificação via ISSRs as amostras tinham um volume final de 15 µL, contendo: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 100 mM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,4 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 Perkin Elmer modelo 9700, e constaram de uma etapa a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 40s, (temperatura de anelamento de 48°C) por 40s, 72°C por 1 min, com extensão final 72°C por 2 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0%.

## **Análise estatística dos dados combinados**

Os dados morfológicos, agronômicos e moleculares foram submetidos ao algoritmo estatístico Ward-MLM (FRANCO et. al., 1998) usando procedimento CLUSTER e MLM no programa SAS (2002), considerando-se um total de sete características multicategóricas [cor do pseudocaule, (CPS); cor da nervura do pecíolo, (CNP); forma da roseta, (FRO); cor dos brotos, (CBR); cor da borda do pecíolo, (CBP); abertura do pecíolo, (ABP) e posição das folhas, (POF)], 21 características quantitativas [número de dias do plantio a floração, (NPF); número de dias do plantio a colheita, (NPC); número de dias da floração a colheita, (NFC); diâmetro do pseudocaule, (DIA) (cm); altura de planta, (ALT) (m); número de folhas até o florescimento, (NFO); número de filhos, (NFI); peso do cacho, (PCA) (kg); peso de penca, (PPE) (kg); número de frutos, (NFR); peso médio de frutos, (PMF) (g); comprimento dos frutos da segunda penca, (CFS) (cm); comprimento do fruto da penúltima penca, (CFP) (cm); diâmetro do fruto da segunda penca, (DFS) (mm); diâmetro do fruto da penúltima penca, (CFP) (mm); número de pencas, (NPE); número de folhas vivas na colheita, (NFO); comprimento do pedúnculo, (COP) (cm); diâmetro do pedúnculo, (DIP) (cm); comprimento do engaço, (CEN) (cm); diâmetro do engaço, (DEN) (cm)] e 14 Primers ISSR (96 bandas polimórficas) de modo a avaliar a diversidade genética. Os fragmentos amplificados foram avaliados como presente (1) e ausente (0) bandas.

A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Mean), utilizando o software STATISTICA produzido pela [StatSoft](http://www.statsoft.com), com base na matriz de distâncias do algoritmo de Gower, (GOWER, 1971). O coeficiente de correlação cofenético entre a matriz de similaridades genéticas e a matriz dos valores cofenético, foi calculado usando o software R (2010) a fim de

verificar a consistência do agrupamento. O número ideal dos grupos foi definido de acordo com os critérios do Pseudo-*F* (SAS, 2002).

## **Resultados e Discussão**

Foram utilizados dados qualitativos e quantitativos selecionados no segundo ciclo de produção. A possibilidade de combinar dados multicategóricos, quantitativos e moleculares na identificação do número de clusters abre novas perspectivas nos estudos de dissimilaridade.

A estratégia de *Ward-Modified Location Model* foi proposta pela primeira vez por Franco et al. (1998). Trata-se de um método útil para analisar a divergência genética para comparação genealógica (BARBÉ et. al., 2009) é eficiente na seleção de genótipos com o mínimo de perda da diversidade genética (CROSSA e FRANCO, 2004), no entanto, não há muitos relatos sobre esta metodologia na literatura.

Este método foi utilizado em poucas culturas, como feijão vagem (BARBÉ et. al., 2009), *Capsicum* spp. (SUDRÉ et. al., 2010), em tomate (GONÇALVES et. al., 2008), couve (PADILHA et. al., 2007) e em banana Pacovan do subgrupo prata (PESTANA et. al., 2011), nestes estudos a utilização do algoritmo de Gower mostrou-se muito eficaz.

No intuito de determinar a correlação entre os dados multicategóricos, quantitativos e binários, um estudo preliminar foi realizado, o cálculo da distância das matrizes compreendendo os dados multicategóricos e quantitativos e a matriz de distância dos dados binários usando o índice da simples coincidência. A correlação entre estas duas matrizes foi de  $r = 0,0218$ , que é bastante baixo e demonstra que os dados podem ser analisados numa forma combinada, e que a maior parte da variabilidade observada pode ser atribuída a fatores genéticos.

Na sequência, a variabilidade genética de 21 possíveis mutantes e duas testemunhas foi analisada usando 21 características quantitativas, sete multicategóricas (Descritas na metodologia) e 14 marcadores ISSR que originaram 96 bandas polimórficas pelo método Ward-MLM (Figura 2).

A distância entre os possíveis mutantes variou 0,321 a 0,524, com distância média de 0,426 e o coeficiente de correlação cofenético 0,79, valor considerado muito bom nesses estudos (VAZ PATTO et al. 2004; PESTANA et, al., 2011).

Os genótipos mais próximos foram Test 22 e Test 23, com distância genética de 0,321 e os mais distantes foram Irra 09 e o Irra 11 com 0,524.

Os resultados comprovam a existência de variabilidade entre os possíveis mutantes que pode ser explorada e que esta variabilidade é principalmente devido ao efeito da radiação gama, a variação somaclonal e os subcultivos normalmente não levam há alterações genéticas em um grande número de clones a partir do mesmo genótipo.

De acordo com a classificação realizada nos dois ciclos de produção em relação às características: altura de planta, peso de cacho e número de dias do plantio ao florescimento, selecionou-se três possíveis mutantes (Figura 3).

As três plantas selecionadas Irra 12; Irra 14 e Irra 16 apresentaram os maiores valores de peso de cacho quando comparados com as testemunhas. Com destaque para o genótipo Irra 16 com um peso de cacho de 29 kg, superou o peso médio dos cachos das testemunhas em 6,37 kg.

Quanto ao número de dias do plantio à floração, os possíveis mutantes selecionados Irra 12, Irra 14 e Irra 16 apresentaram valores inferiores em relação à média das testemunhas, o genótipo Irra 16 iniciou a floração 400 dias após o plantio, 42,33 dias mais precoce que a média das testemunhas que iniciaram a floração 442,33 dias após o plantio. Resultado semelhante a este estudo foi observado no trabalho

desenvolvido por Pestana et, al., (2011) os autores desenvolveram o trabalho com banana Pacovan tipo prata e selecionaram após o segundo ciclo de produção quatro genótipos com destaque para o Pacovan 40 que floresceu 44 dias a menos que a média dos controles e está entre os que apresentaram maior peso de cacho (Figura 3).

A altura das três plantas selecionadas entre as 23 avaliadas após o segundo ciclo de produção foi menor do que a média das testemunhas. A menor altura entre as plantas selecionadas 3,65m no genótipo Irra 16, com uma diferença de 3,2%, em comparação com a média dos controles (Altura média = 4,02 m  $\pm$  0,29), Além disso, este possível mutante Irra 16 foi 42,33 dias mais precoce que a média das testemunhas e também estava entre aqueles com maior peso de cacho (Figura 3).

Resultado semelhante foi observado no estudo conduzido por Bermudez et al. (2000) os autores trabalhando com banana FHIA-21, relataram no primeiro ciclo de produção uma variação de 4,78%, e que as características mais alteradas foram altura da planta e o número de frutos.

Para a análise ISSR com 14 *primer*, 21 possíveis mutantes e duas testemunhas um total de 96 bandas polimórficas foram geradas com uma média de 6,86 bandas por *primer*. O maior número de bandas foi observado no iniciador TriAAG3'RC (11 bandas) e o menor no TriTGC3'RC (4 bandas).

Os critérios do Pseudo-*F* mostraram que o número de grupos ótimo esta entre 2 e 3, (Figura 4).

Adotando a formação de três grupos, a menor distância genética 0,321, foi detectada entre as duas testemunhas. Esta pequena distância mostra que as testemunhas estão intimamente relacionadas e, e estão dispostas no dendograma no mesmo grupo (G2), portanto, podem servir como uma boa base para serem utilizadas, em comparação com o material irradiado, pois, essas variações são atribuídas aos efeitos ambientais.

Em relação aos três mutantes selecionados, o Irra 12 alocou-se no grupo 1 (G1), o Irra 14 e Irra 16 no grupo 2 (G2), e neste caso, o uso dos dados combinados permitiu o estudo da variabilidade genética com uma abordagem mais confiável e demonstram que nos possíveis mutantes de banana Terra selecionados há variabilidade que pode ser explorada.

Os três possíveis mutantes selecionados agora serão submetidos a avaliações de campo nas próximas etapas do programa de melhoramento da bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura com o intuito de lançar em breve, uma nova variedade, mais precoce, produtiva e de altura reduzida.

Esta é a primeira tentativa de utilização de dados combinados em bananeira do tipo Terra com o intuito de selecionar possíveis mutantes e avaliar a variabilidade genética.

## **Conclusão**

Estes resultados demonstram que existe variabilidade genética nos possíveis mutantes selecionados e que pode ser utilizada em programas de melhoramento genético, visando à obtenção de plantas de altura reduzida, mais precoces e produtivas.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto e pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor.

## **Referências Bibliográficas**

Amorim EP, Reis RV, Santos-Serejo JA, Amorim VBO, Silva SO. Variabilidade genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites.

**Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43 (8): 1045–1052. 2008.

Amorim EP, Lessa LS, Ledo CAS, Amorim VBO, Reis RV, Santos-Serejo JA, Silva SO. Caracterização agronômica e molecular de genótipos diplóides melhorados de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31(1): 154–161. 2009a.

Amorim EP, Vilarinhos AD, Cohen KO, Amorim VBO, Santos-Serejo JA, Silva SO, Petana KN, Santos VJ, Paes NS, Monte DC, Reis RV. Genetic diversity of carotenoid-rich bananas evaluated by Diversity Arrays Technology (DArT). **Genetics and Molecular Biology**, 32(1):96–103. 2009b.

Arcade, A. F.; Anselin, P.; Faivre, R. M. C.; Lesage, L. E.; Prat, D. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.100, p.299- 307, 2000.

Barbé TC, Amaral-Júnior AT, Gonçalves LSA, Rodrigues R, Scapim CA. Association between advanced generations and genealogy in inbred lines of snap bean by the Ward-Modified Location Model. **Euphytica**. doi:10.1007/ s10681-009-0089-z. 2009.

Bermudez I, Orellana P, Pérez Ponce J, Clavelo J, Veitia N, Romero C, Mujica R, Garcia RL Improvement of the hybrid plantain clone FHIA-21 by mutagenesis in vitro. **Infomusa**, 9(1):16–19, 2000.

Creste S, Tulman-Neto A, Vencovsky R, Silva SO, Figueira A. Genetic diversity of Musa diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 51:723–733, 2004.

Crossa J, Franco J. Statistical methods for classifying genotypes. **Euphytica**, 137:19–37, 2004.

Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12(1):13–15, 1990.

El-Khishin D, Belatus EL, El-Hamid AA, Radwan KH. Molecular characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Egypt using AFLP. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 5(3): 271–279, 2009.

FAO. <http://www.fao.org>

FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. Identification of closely related citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.95, p.408-417, 1997.

Franco J, Crossa J, Villasenõr J, Taba S, Eberhart AS. Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. **Crop Science**, 38:1688–1696, 1998.

Gaudeul M, Taberlet P, Bottraud-Till I. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Ryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. **Molecular Ecology**, 9:1625–1637, 2000.

Gonçalves LSA, Rodrigues R, Amaral-Júnior AT, Karasawa M, Sudré CP. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**, 7(4):1289–1297, 2008.

Gower JC. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics** 27:857-874, 1971.

Guasmi F, Touil L, Féres K, Efelah W, Triki T, Ferchichi A. Genetic diversity of Tunisian barley accessions based on microsatellites markers. **Biotechnology**, 7(4):781–786, 2008.

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**, Berlin, v. 89, p. 998-1006, 1994.

Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK, Brar DS. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**. 100: 1311–1320, 2000.

Lakshmanan V, Venkataramareddy SR. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, 10(1):106–113, ISSN: 0717-3458, 2007.

Mattos LA, Amorim EP, Amorim VBO, Cohen KO, Ledo CAS, Silva SO. Agronomical and molecular characterization of banana germplasm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45(2):146–154, 2010.

Miri SM, Mousavi A, Naghavi MR, Talaei MAR, Khiabani BN. Analysis of induced mutants of salinity resistant banana (*Musa acuminata* cv. Dwarf Cavendish) using morphological and molecular markers. **Iranian Journal Biotechnology**, 7(2):86–92, 2009.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

Ning SP, Xu LB, Luy, Huang BZ, Ge XJ. Genome composition and genetic diversity of *Musa* germplasm from China revealed by PCR-RFLP and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, 114:281–288, 2007.

Oliveira, AC.; Richter, T.; Bennetzen, JL. Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers. **Genome**, v.39, p.579-587, 1996.

Opara UL, Jacobson D, Al-Saady NA. Analysis of genetic diversity in banana cultivars (*Musa* cvs.) from the south of Oman using AFLP markers and classification by

phylogenetic, hierarchical clustering and principal components analyses. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 11(5):332–341, 2010.

Padilha G, Cartea M, Ordás A. Comparison of several clustering methods in grouping kale landraces. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132:283-436, 2007.

Pestana, RKN.; Amorim, EP.; Silva, SO.; Tulmann-Neto, A. Irradiação gama para mutagênese in vitro em bananeira ‘Terra Maranhão’. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1328- 1330, 2010.

Pestana RKP.; Amorim EP.; Ferreira, CF.; Amorim, VBO.; Oliveira, LS.; Ledo, CAS.; Silva, SO. Agronomic and molecular characterization of gamma ray induced banana (*Musa sp.*) mutants using a multivariate statistical algorithm. **Euphytica**. 178:151–158. 2011.

Qian W, Ge S, Hong DY. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**. 102:440–449, 2001.

R Development Core Team., **R: A language and environment for statistical computing**. [2.12.1]. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. 2010.

Resende JCF. **Melhoramento da bananeira (*Musa spp.*) utilizando indução de mutação com raios gama e variação somaclonal para a redução da altura de**

**plantas**. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 155p. 2005.

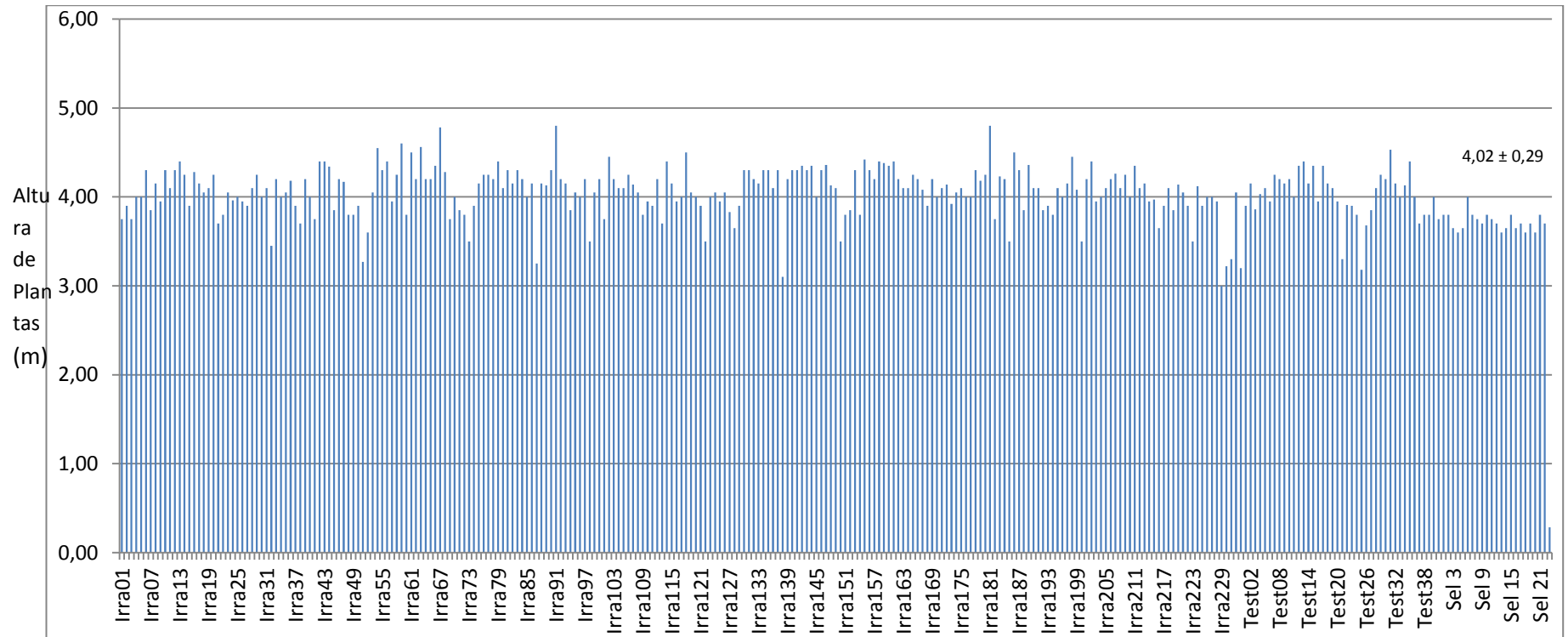
Salimath, SS.; Oliveira, AC.; Godwin, I.O.A.C.; Bennetzen, JL. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *eleusine* with DNA markers. **Genome**, v.38, p.757-763, 1995.

SAS Learning Edition Programa SAS - Getting started with the SAS Learning Edition. **Cary SAS Publishing**, 200p. 2002.

Sudré CP, Gonçalves LSA, Rodrigues R, Amaral-Júnior AT, Riva-Souza EM, Bento CS. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp. as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, 9(1):283-294, 2010.

Vaz Patto MC, Satovic Z, Pêgo S, Fevereiro P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasma using microsatellite markers. **Euphytica**, 137:63–67, 2004.

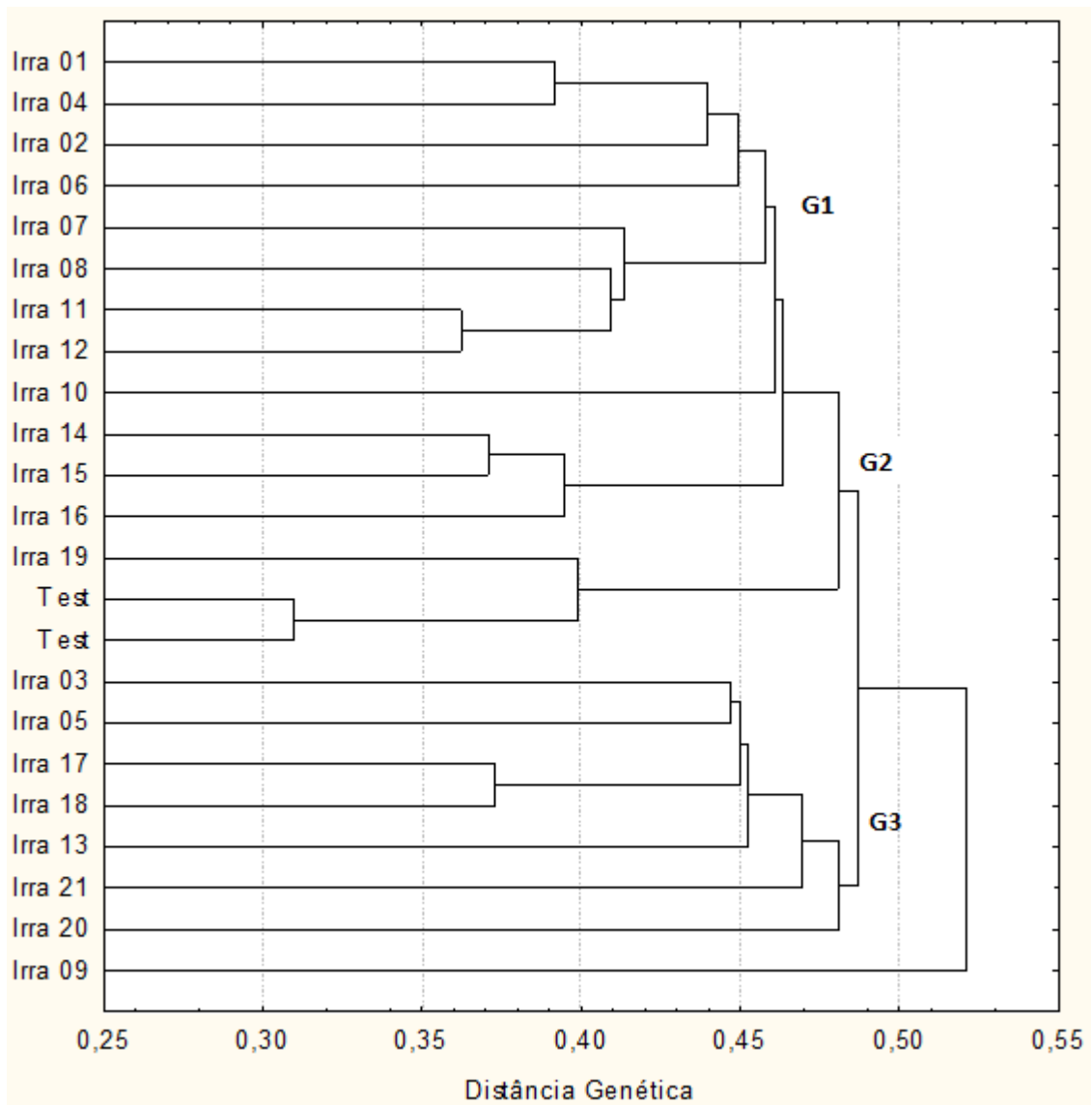
Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183,1994.



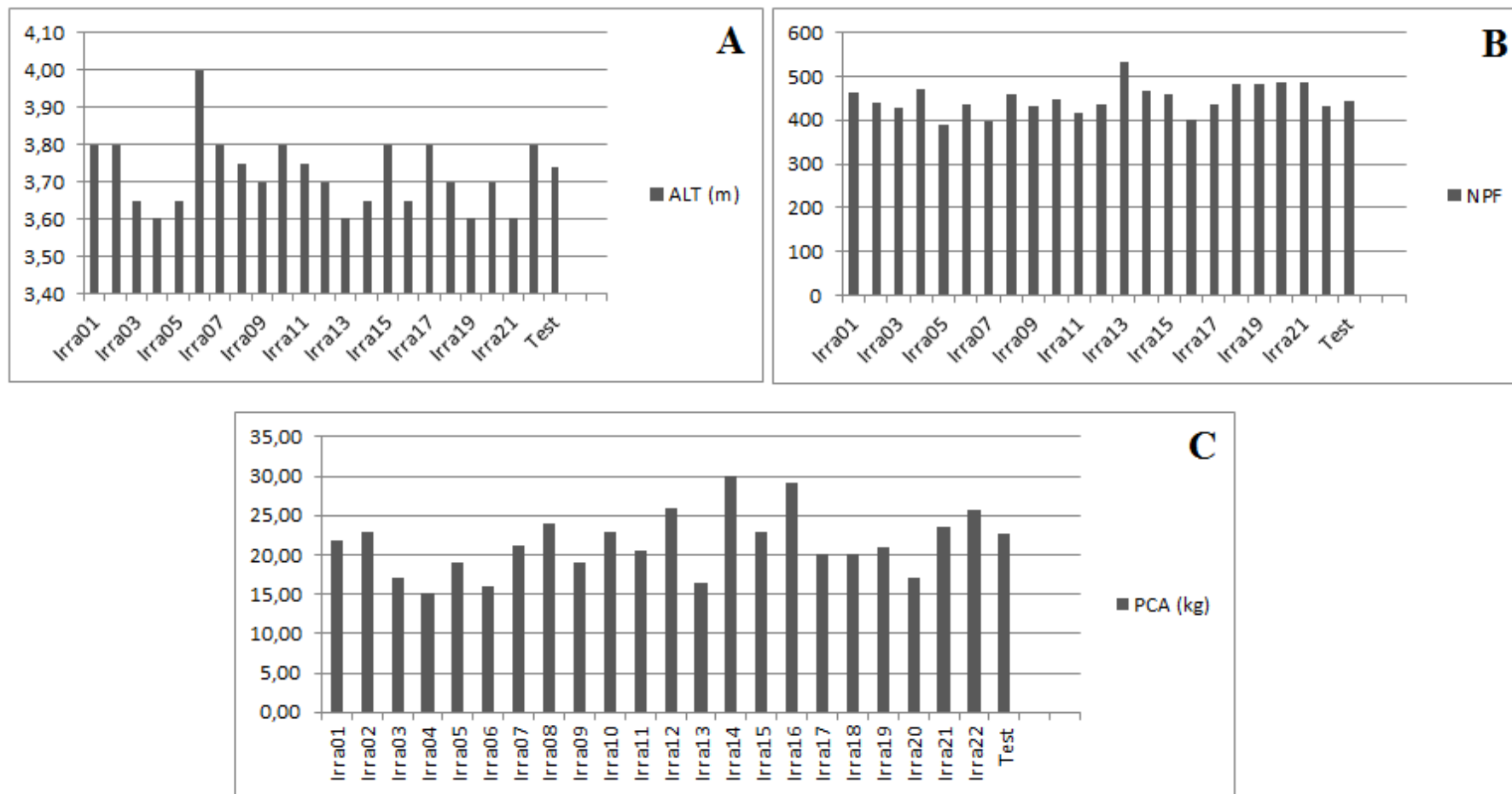
**Figura 1.** Distribuição dos genótipos de banana Terra Maranhão irradiados, testemunhas e os possíveis mutantes selecionados para a variável altura de plantas (ALT), em dois ciclos de produção.

**Tabela 1.** Iniciadores ISSR utilizados na amplificação de possíveis mutantes de bananeira Terra Maranhão, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (Ta) e número total de bandas (NTB).

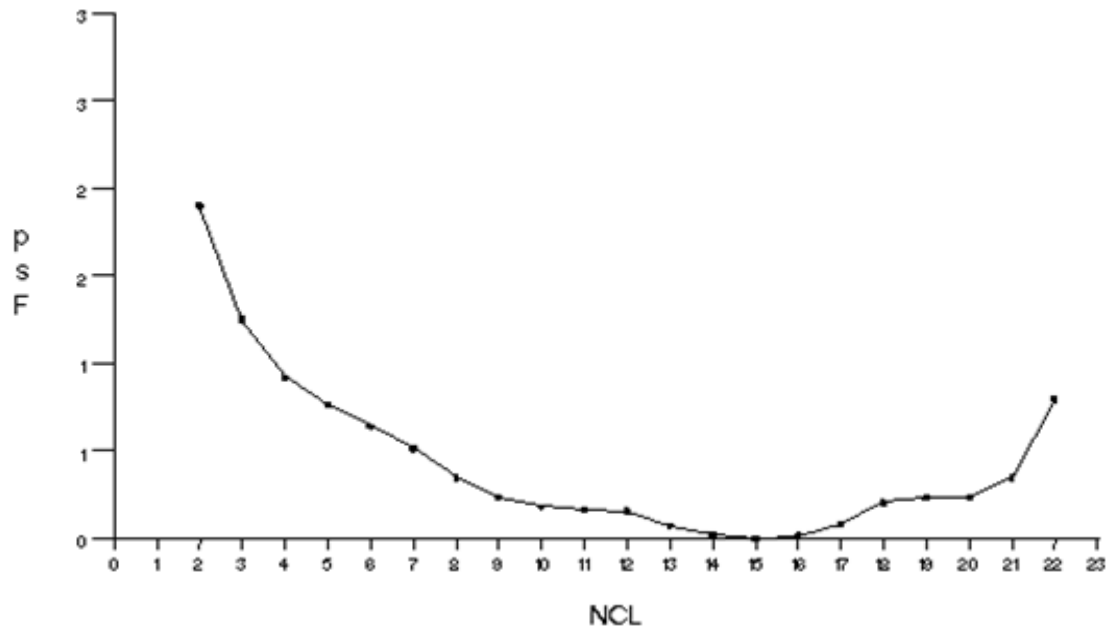
Primer	Sequência	Ta	NTB
DiGA 3'C	(GA)8C	48	5
DiGA3'RC	(GA)8RC	48	6
DiGA3'YC	(GA)8YC	48	7
DiGT3'A	A(GT)8	48	8
DiGT5'CY	CY(GT)8	48	11
TriCAG5'CR	CR(CAG)5	48	8
TriAAG3'RC	(AAG)5RC	48	9
TriAGA3'RC	(AGA)5RC	48	4
TriTGA3'RC	(TGA)5RC	48	6
TriTGC3'RC	(TGC)5RC	48	5
TriCTC3'RC	(CTC)5RC	48	8
TriCTG3'RC	(CTG)5RC	48	8
TriGAT3'RC	(GAT)5RC	48	5
TriGAG3'RC	(GAG)5RC	48	6



**Figura 2.** Dendrograma construído com 21 possíveis mutantes de banana do tipo Terra e duas testemunhas através dos dados conjuntos utilizando o algoritmo de Gower e a estratégia Ward-MLM.



**Figura 3.** Distribuição dos possíveis mutantes de banana Terra Maranhões selecionados obtidos por radiação gama e da média das testemunhas (Test) em relação às variáveis, altura de planta em metros (A), número de dias do plantio a floração (B) e peso do cacho em kg (C).



**Figura 4.** Critérios *Pseudo-F* com o ótimo número de clusters (NCL) de 2-3 utilizando o algoritmo de Ward-MLM do software SAS (SAS Institute, 2002).

## Conclusões Gerais

### *Artigo 1:*

Os resultados desse trabalho permite concluir que:

- A aplicação da radiação gama é uma técnica promissora para o propósito de obter plantas com altura reduzida e ainda confirmam o potencial da indução de mutação em bananeira tipo Terra para desenvolvimento de variedades com características agronômicas desejáveis.
- Dentre as plantas irradiadas selecionadas, há genótipos de baixa altura e com boas características agronômicas.

### *Artigo 2:*

- A análise combinada forneceu um melhor resumo da variabilidade real, enquanto que se considerássemos apenas os dados quantitativos e/ou qualitativos, a influência ambiental poderia ter um maior efeito nos resultados da análise, esta metodologia forneceu um modelo de ajuste melhor para a análise de agrupamento.
- Estes resultados demonstram que existe uma variabilidade genética que pode ser utilizado no programa de melhoramento genético da banana visando à obtenção de plantas com altura reduzida, mais precoce e produtiva.
- Os possíveis mutantes selecionados serão utilizados nas próximas etapas do programa de melhoramento da bananeira tipo Terra da Embrapa Mandioca e Fruticultura com o intuito de lançar em breve uma nova variedade, mais precoce, produtiva e de altura reduzida.