UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA

PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

CURSO DE MESTRADO

ANÁLISE INTEGRATIVA NA BUSCA POR RESISTÊNCIA À MURCHA DE FUSARIM EM BANANEIRA: ASPECTOS METABÓLICOS, HISTOQUÍMICOS E MOLECULARES

Luiz Carlos de Souza Junior

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2026

ANÁLISE INTEGRATIVA NA BUSCA POR RESISTÊNCIA À MURCHA DE FUSARIUM EM BANANEIRA: ASPECTOS METABÓLICOS, HISTOQUÍMICOS E MOLECULARES

Luiz Carlos de Souza Junior

Bacharel em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2026

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e da Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Drª Claudia Fortes Ferreira

Coorientadora: Drª Fernanda dos Santos Nascimento

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2026

FICHA CATALOGRÁFICA

S729a

Souza Junior, Luiz Carlos de.

Análise integrativa na busca por resistência à murcha de Fusarium em bananeira: aspectos metabólicos, histoquímicos e moleculares / Luiz Carlos de Souza Junior._ Cruz das Almas, BA, 2026.

83f.; il.

(DISSERTAÇÃO) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof. Dra. Claudia Fortes Ferreira.
Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda dos Santos Nascimento.

1.Banana – Doenças. 2.Banana – Melhoramento genético. 3.Expressão gênica – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.772

Ficha elaborada pela Biblioteca Central da UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA

PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

CURSO DE MESTRADO

ANÁLISE INTEGRATIVA NA BUSCA POR RESISTÊNCIA À MURCHA DE FUSARIUM EM BANANEIRA: ASPECTOS METABÓLICOS, HISTOQUÍMICOS E MOLECULARES

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de Luiz Carlos de Souza Junior Aprovada em 25 de março de 2026.

gov.br Documento assinado digitalmente
CLAUDIA FORTES FERREIRA
Data: 24/07/2026 08:42:09-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Drª Claudia Fortes Ferreira- Embrapa Mandioca e Fruticultura (Orientadora)

gov.br Documento assinado digitalmente
MARCELLY SANTANA MASCARENHAS
Data: 24/07/2026 15:32:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Drª. Marcelly Santana Mascarenhas Embrapa Mandioca e Fruticultura (Examinadora)

gov.br Documento assinado digitalmente
WANDERLEY DIACISO DOS SANTOS OLIVEIRA
Data: 23/07/2026 17:34:12-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dr. Wanderley Diaciso dos Santos Oliveira Embrapa Mandioca e Fruticultura (Examinador)

AGRADECIMENTOS

Dedicar este trabalho é um ato de profunda gratidão e reconhecimento a todas as pessoas e instituições que desempenharam um papel fundamental em minha trajetória acadêmica. Esta jornada foi marcada por desafios, descobertas e crescimento, e cada conquista aqui representada reflete o apoio, o incentivo e o cuidado que recebi ao longo do caminho.

Primeiramente, expresso minha sincera gratidão aos meus pais, Luiz e Alessandra, e a minha irmã Luiza cujo amor, apoio e incentivo incondicional foram fundamentais durante toda essa jornada. Vocês sempre foram minha fonte diária de inspiração, força e motivação. Este trabalho é dedicado a vocês, com todo o meu amor e eterna gratidão.

Agradeço também à minha namorada, Amanda Matos, por toda a paciência, compreensão, cuidado e, acima de tudo, confiança. Seu apoio constante me fortaleceu nos momentos mais difíceis da minha vida e me motiva a acreditar em mim mesmo a cada dia.

Aos meus orientadores, Claudia Fortes Ferreira e Fernanda dos Santos Nascimento, minha profunda gratidão por todas as orientações, ensinamentos, paciência, cuidado e feedbacks construtivos ao longo deste trabalho. A dedicação e a paixão de vocês pela ciência e pelo conhecimento foram inspirações constantes e fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço também a todas as amizades construídas no LBM (Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura). Sou grato por todos os momentos compartilhados, pelos aprendizados e pela convivência que contribuíram significativamente para meu crescimento como pesquisador e como pessoa. Em especial, agradeço a Andresa**,** Márcio Leandro**,** Manoela e Taís, pela amizade, companheirismo e, principalmente, por toda ajuda e apoio desde o início desta caminhada. Tenho uma imensa gratidão por cada um de vocês.

Estendo meus agradecimentos às instituições que fizeram parte desta trajetória: à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), à Embrapa Mandioca e Fruticultura e à CAPES, por proporcionarem o ambiente, os recursos, as instalações e as oportunidades que foram essenciais para a construção do conhecimento e para minha formação acadêmica.

Por fim, dedico este trabalho à memória de meus avós. Embora sua presença física já não esteja entre nós, o amor, os ensinamentos e os valores que deixaram continuam presentes em minha vida e contribuíram para a formação de quem sou hoje. Sua memória permanecerá sempre como uma fonte de inspiração.

ANÁLISE INTEGRATIVA NA BUSCA POR RESISTÊNCIA À MURCHA DE FUSARIUM EM BANANEIRA: ASPECTOS METABÓLICOS, HISTOQUÍMICOS E MOLECULARES

RESUMO: A murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), constitui uma das principais ameaças à bananicultura mundial, comprometendo a produtividade e a sustentabilidade do cultivo. Nesse contexto, a Embrapa Mandioca e Fruticultura, por meio do Programa de Melhoramento da Bananeira (PMGB), tem empregado estratégias de melhoramento genético e ferramentas biotecnológicas visando ao desenvolvimento de genótipos mais resistentes à doença. Essa dissertação foi organizada em dois capítulos complementares. No primeiro capítulo, objetivou-se identificar híbridos oriundos do cruzamento de genótipos do subgrupo Cavendish com diploides melhorados com resistência à Foc R1, utilizando marcadores moleculares. As análises foram conduzidas no Centro de Biologia Avançada da Embrapa, sendo os marcadores SSR utilizados para identificação dos possíveis híbridos oriundos dos cruzamentos e os marcadores SSR, IRAP e ISSR para avaliar a diversidade genética entre eles. Os marcadores SSR, mMACIR24 e mMACIR40, foram eficientes na confirmação de dois híbridos entre cinco cruzamentos avaliados. A análise de dissimilaridade genética e a ordenação por PCoA possibilitaram a clara separação entre híbridos e parentais, validando o uso desses marcadores como etapa essencial na seleção precoce de materiais promissores e no aumento da eficiência do programa de melhoramento. O segundo capítulo avaliou o potencial do glicerol como indutor de resistência à Foc em bananeira ‘Prata Anã’. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos de 0%, 3% e 5% de glicerol, além de controle inoculado. Foram realizadas avaliações de severidade da doença, análises histoquímicas e expressão gênica por RT-qPCR de genes relacionados à defesa e à sinalização. Embora o glicerol não tenha impedido a colonização vascular inicial, promoveu redução significativa da severidade da doença. Observou-se ainda maior deposição de calose e compostos fenólicos, além de ativação precoce de genes de defesa, especialmente na concentração de 3%. Os resultados reforçam que a integração de marcadores moleculares na seleção de híbridos e o uso de compostos químicos indutores de defesa constituem uma estratégia promissora para o manejo da murcha de Fusarium. Essa abordagem contribui tanto para o desenvolvimento de genótipos mais resistentes quanto para o fortalecimento dos programas de melhoramento genético da bananeira. Essa abordagem contribui tanto para o desenvolvimento de genótipos mais resistentes quanto para a indução de resistência em plantas suscetíveis a *Foc*.

Palavras-Chave: Musa spp.; Glicerol-3-fosfato; Expressão gênica; Marcadores de DNA, SSR, IRAP, ISSR

INTEGRATIVE ANALYSIS IN THE SEARCH FOR FUSARIUM WILT RESISTANCE IN BANANA: METABOLIC, HISTOCHEMICAL, AND MOLECULAR ASPECTS

ABSTRACT: Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), is one of the main threats to banana production worldwide, compromising cropproductivity and sustainability. In this context, Embrapa Cassava and Fruits, through the Banana Breeding Program (PMGB), has employed genetic improvement strategies and biotechnological tools aimed at developing genotypes with greater resistance to the disease. This dissertation was organized into two complementary chapters. The first chapter aimed to identify hybrids derived from crosses between genotypes of the Cavendish subgroup and improved diploids using molecular markers. The analyses were conducted at Embrapa's Advanced Biology Center. SSR markers were used to identify potential hybrids obtained from the crosses, while IRAP and ISSR markers were applied to assess genetic diversity among them. The SSR markers mMaCIR24 and mMaCIR40 were efficient in confirming two hybrids among the five evaluated crosses. Genetic dissimilarity analysis and PCoA ordination enabled a clear separation between hybrids and parental genotypes, validating the use of these markers as an essential step in the early selection of promising materials and in increasing the efficiency of the breeding program. The second chapter evaluated the potential of glycerol as an inducer of resistance to Foc in 'Prata Anã' banana plants. The experiment was conducted in a completely randomized design with treatments of 0%, 3%, and 5% glycerol, in addition to an inoculated control. Disease severity assessments, histochemical analyses, and RT-qPCR expression analyses of defense- and signaling-related genes were performed. Although glycerol did not prevent initial vascular colonization, it significantly reduced disease severity. Increased deposition of callose and phenolic compounds was observed, along with early activation of defense-related genes, particularly at the 3% concentration. The results reinforce that integrating molecular markers in hybrid selection, combined with the use of chemical defense inducers, constitutes a promising strategy for managing Fusarium wilt. This approach contributes both to the development of more resistant genotypes and to strengthening banana breeding programs.

Keywords: *Musa* spp.; Glycerol-3-phosphate; Gene expression; DNA markers; SSR; IRAP; ISSR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 11
2. REFERENCIAL TEÓRICO 14
REFERÊNCIAS 20
CAPÍTULO I 27
1. INTRODUÇÃO 30
2. MATERIAL E MÉTODOS 31
3. RESULTADOS 37
4. DISCUSSÃO 41
5. CONCLUSÃO 44
6. REFERÊNCIAS 44
CAPÍTULO II 49
1. INTRODUÇÃO 52
2. MATERIAL E MÉTODOS 55
3. RESULTADOS 60
4. DISCUSSÃO 72
8. CONCLUSÃO 77
9. CONCLUSÃO GERAL 78
REFERÊNCIAS 79

1. INTRODUÇÃO GERAL

A bananicultura ocupa uma posição de destaque no cenário agrícola global, sendo a banana (*Musa* spp.) uma das frutas mais consumidas e comercializadas mundialmente. Caracterizada como uma planta herbácea e perene, a bananeira desempenha um papel crucial na segurança alimentar e na dinâmica socioeconômica de países em desenvolvimento, servindo como fonte primária de nutrientes e renda para populações de regiões tropicais e subtropicais. Segundo dados recentes da FAOSTAT (2025), a produção mundial atingiu safras expressivas, superando 139 milhões de toneladas em 2024, cultivadas em cerca de 6,0 milhões de hectares. A distribuição geográfica dessa produção é liderada majoritariamente pelo continente asiático, seguido pelas Américas e pela África, evidenciando a plasticidade adaptativa da cultura em diferentes latitudes (DONATO et al., 2021; FAO, 2025).

No panorama sul-americano, o Brasil consolida-se como um protagonista, figurando entre os cinco maiores produtores mundiais e ocupando a segunda posição na produção do continente, logo após o Equador (FAOSTAT, 2025). A atividade no país não apenas abastece o robusto mercado interno, mas também movimenta uma cadeia produtiva bilionária, sendo um pilar socioeconômico essencial tanto para a agricultura familiar quanto para a empresarial (EMBRAPA, 2024). Dados do IBGE (2025) corroboram essa relevância, apontando que a cultura ocupa a segunda posição na fruticultura nacional, gerando divisas significativas para o agronegócio brasileiro. Embora o consumo doméstico absorva a maior parte da produção dos frutos, o Brasil mantém um fluxo estratégico de exportações, com ênfase no atendimento aos países do bloco Mercosul, o que reforça a relevância geopolítica da bananicultura brasileira no comércio exterior (CEPEA, 2023).

As bananeiras cultivadas são complexas, classificadas conforme seus níveis de ploidia e constituição genômica (diploides, triploides e tetraploides) (Simmonds & Shepherd, 1955). Entretanto, a base genética estreita das variedades comerciais, predominantemente triploides e de propagação vegetativa, torna a cultura altamente vulnerável a estresses tanto bióticos quanto abióticos (PERRIER et al., 2011; TRIPATHI et al., 2019).

Entre os desafios fitossanitários, destaca-se a murcha de Fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Esta doença é caracterizada pela

infecção do sistema radicular, onde o fungo coloniza os vasos do xilema e obstrui o transporte de água e nutrientes, levando ao amarelecimento progressivo das folhas, murcha e eventual morte da planta. A disseminação ocorre principalmente por material de plantio infectado, água e solo aderido à implementos. O controle da doença é extremamente difícil, uma vez que o patógeno produz estruturas de resistência (clamidósporos) capazes de sobreviver no solo por décadas, tornando o controle químico ineficiente e inviável economicamente. Assim, o desenvolvimento de genótipos resistentes consolida-se como a principal estratégia de manejo e controle (PLOETZ, 2015; ALTENDORF, 2019).

O melhoramento genético convencional da bananeira, contudo, enfrenta barreiras biológicas severas, notadamente a partenocarpia e a esterilidade feminina, que resultam na ausência ou baixa produção de sementes, dificultando a hibridação tradicional. Diante desse gargalo, a biotecnologia, por meio da cultura de tecidos vegetais, surge como uma ferramenta indispensável de apoio. Neste contexto, o cultivo *in vitro* (resgate de embriões) é fundamental não apenas para recuperar a variabilidade genética gerada nos cruzamentos, mas principalmente para viabilizar o desenvolvimento de embriões híbridos. Em condições de campo, essas sementes dificilmente germinariam devido a barreiras físicas, baixa viabilidade ou ausência de endosperma funcional (NEVES; SILVA; OLIVEIRA, 2001; UMA *et al.*, 2011). O resgate de embriões permite a obtenção de progênies de cruzamentos complexos, garantindo a sobrevivência de novos genótipos que possuem alelos de resistência e características agronômicas superiores (SILVA et al., 2001; FERREIRA et al., 2023).

Para validar e monitorar a diversidade resultante desses cruzamentos, a caracterização puramente morfológica mostra-se muitas vezes insuficiente, dada a forte influência ambiental sobre o fenótipo. Além disso, existe a complexidade técnica em distinguir híbridos verdadeiros de plantas originadas por apomixia (um processo de reprodução assexual por sementes que gera indivíduos geneticamente idênticos à genitora, sem que ocorra a fusão de gametas). Nesse cenário, as ferramentas moleculares tornam-se indispensáveis. Marcadores de DNA do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) são preferenciais para a certificação de cruzamentos por serem codominante**s**, o que permite identificar o estado heterozigoto e confirmar a herança de alelos de ambos os genitores. Complementarmente, marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e os

baseados em retrotransposons (IRAP) são ferramentas valiosas para análises de dissimilaridade genética, pois geram um elevado número de bandas polimórficas com alta precisão e reprodutibilidade (KALENDAR et al., 2011; ARVAS et al., 2022)

Paralelamente, na busca por metodologias para a mitigação de Foc, o uso do glicerol tem sido apontado como uma estratégia promissora e inovadora. Esse composto atua no estímulo das rotas de sinalização mediadas pela molécula de glicerol-3-fosfato (G3P), reconhecida como um indutor crítico da Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (CHANDA et al., 2011; YU et al., 2016). A conversão metabólica do glicerol em G3P não apenas modula a homeostase de lipídeos — fundamental para a manutenção da integridade das membranas plasmática e organelares (especialmente dos cloroplastos) durante o estresse patogênico —, mas também funciona como um sinal móvel que estabelece o estado de *priming*. Esse fenômeno condiciona o sistema imune da planta para uma resposta mais rápida e robusta a infecções subsequentes (LI et al., 2017). Sendo assim, a integração de ferramentas biotecnológicas ao uso de elicitores, como o glicerol, possui elevado potencial para subsidiar programas de melhoramento no desenvolvimento de genótipos resistentes e na elaboração de estratégias de manejo sustentável para a bananicultura frente à doença.

Nesse contexto, este trabalho tem por objetivo geral integrar ferramentas moleculares e estratégias de indução de resistência para o manejo da murcha de Fusarium. Especificamente, o primeiro capítulo objetivou identificar e validar híbridos oriundos de cruzamentos entre variedades do subgrupo Cavendish (Williams, Nanica e Grande Naine) e diploides melhorados (CNPMF-0731, 0280003-01, PMGB-069 e CNPMF-998). A escolha desses genótipos fundamentou-se em seu histórico de desempenho superior em campo e na necessidade de suporte biotecnológico, como o resgate de embriões *in vitro*, essencial para viabilizar progênies de baixa germinação natural. Para a certificação desses materiais, utilizaram-se marcadores SSR, além de análises de dissimilaridade e estrutura populacional via PCoA com marcadores ISSR e IRAP.

Já o segundo capítulo teve como objetivo avaliar o potencial do glicerol como indutor de resistência na cultivar ‘Prata-Anã’, analisando a severidade da doença, respostas histoquímicas e a expressão de genes relacionados à defesa. Dessa forma, os resultados obtidos visam aumentar a acurácia na seleção precoce de genótipos

promissores no programa de melhoramento e fornecer bases sólidas para uma nova estratégia sustentável de manejo da doença no campo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Cultura da bananeira: origem, morfologia e complexidade genômica

A bananeira (*Musa* spp.) é uma das frutíferas de maior relevância global, sendo cultivada em mais de 130 países de clima tropical e subtropical. Originária do sudeste asiático, sua domesticação é um processo evolutivo complexo iniciado há mais de 7.000 anos. Evidências arqueobotânicas indicam que a dispersão a partir de seu centro de diversidade foi seguida por múltiplos eventos de hibridação entre espécies selvagens diploides, principalmente *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B). Essas hibridações resultaram na vasta diversidade de cultivares triploides e tetraploides hoje existentes (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955; LIN *et al.*, 2024).

No cenário econômico, a bananicultura desempenha um papel estratégico na segurança alimentar e na geração de renda, especialmente em países em desenvolvimento. Segundo dados da FAO (2025), a produção mundial superou 139 milhões de toneladas em 2024, consolidando-se como a fruta mais produzida no mundo. No panorama brasileiro, a cultura ocupa posição de destaque, com uma produção de aproximadamente 6,8 milhões de toneladas em uma área colhida superior a 450 mil hectares (IBGE, 2025; FAO, 2025). O Brasil figura como o quarto maior produtor mundial e o segundo na América do Sul, sendo a atividade essencial para a agricultura familiar, uma vez que a maior parte da produção nacional é destinada ao robusto mercado interno (CEPEA, 2023).

Morfologicamente, a planta é uma monocotiledônea herbácea e perene de grande porte. Seu caule verdadeiro, o rizoma, é uma estrutura subterrânea rica em reservas que sustenta o pseudocaule aéreo (formado pela bainha das folhas) e emite o sistema radicular. As raízes concentram-se predominantemente nas camadas superficiais, com a maior parte da sua biomassa restrita aos primeiros 40 a 60 cm do solo (DOREY *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2022). O ciclo de cultivo da bananeira é contínuo, caracterizado por fases de desenvolvimento vegetativo, florescimento e frutificação, variando de 10 a 15 meses dependendo da cultivar e das condições edafoclimáticas.

Um desafio intrínseco à cultura é o seu sistema de reprodução. A maioria das cultivares de importância comercial é triploide (3x), estéril e apresenta partenocarpia (produção de frutos sem sementes). Essa característica, embora essencial para a palatabilidade e aceitação do mercado, torna a propagação exclusivamente vegetativa, via mudas laterais ou micropropagação (CÔTÉ *et al.*, 2010; FERREIRA, 2011). Consequentemente, a base genética comercial é extremamente estreita, o que torna a cultura altamente vulnerável a estresses bióticos, como a murcha de Fusarium, uma vez que não há recombinação gênica natural para gerar resistência (PERRIER *et al.*, 2011; TRIPATHI *et al.*, 2019).

2.2. A murcha de fusarium: o principal desafio fitossanitário

A Murcha de Fusarium, causada pelo fungo ascomiceto de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), é reconhecida como a maior ameaça à sustentabilidade da bananicultura global. Estima-se que as perdas econômicas diretas e indiretas decorrentes da doença superem os US$ 2 bilhões anuais, impactando não apenas o comércio internacional, mas a subsistência de mais de 400 milhões de pessoas que dependem da banana como alimento básico (DITA *et al.*, 2018; AQUINO *et al.*, 2022). Em países como a Indonésia e Taiwan, a infestação por Foc já resultou na perda de milhares de hectares, forçando o abandono de áreas agrícolas devido à persistência do patógeno no solo (PLOETZ, 2015; MUNHOZ *et al.*, 2024).

2.2.1. Raças Fisiológicas e a Ameaça da Raça Tropical 4 (TR4)

O patógeno apresenta uma complexa especialização patogênica, sendo classificado em raças fisiológicas de acordo com as cultivares que infecta. A Raça 1 (R1) foi responsável pelo histórico "Mal do Panamá" que dizimou a cultivar 'Gros Michel' no século XX e continua a afetar subgrupos essenciais no Brasil, como 'Prata' e 'Maçã'. A Raça 2 atinge bananeiras do tipo triploide 'Bluggoe' (ABB). Entretanto, o cenário fitossanitário atual é dominado pela preocupação com a Raça 4, subdividida em Raça 4 Subtropical (STR4) (que ataca o subgrupo Cavendish sob estresse climático) e a Raça Tropical 4 (TR4) (GARCÍA-BASTIDAS *et al.*, 2020).

A TR4 é considerada um desafio sem precedentes devido à sua agressividade extrema e ao seu amplo espectro de hospedeiros, sendo capaz de infectar não apenas o subgrupo Cavendish (base das exportações mundiais), mas também cerca de 80% de

todas as variedades de banana cultivadas, incluindo as dos subgrupos Prata e Terra (PLOETZ, 2015; DITA *et al.*, 2018). Originalmente restrita ao Sudeste Asiático, a disseminação global da TR4 acelerou-se drasticamente, com detecções confirmadas na Colômbia (2019), Peru (2021) e Venezuela (2023), colocando o continente americano, principal polo exportador do mundo, sob vigilância máxima (MUNHOZ *et al.*, 2024; LIU *et al.*, 2025).

2.2.2. Persistência do Patógeno e Mecanismos de Ataque

O agente causal produz três tipos de esporos: microconídios, macroconídios e clamidósporos. Estes últimos representam o principal mecanismo de resistência do patógeno, possuindo paredes espessas que lhes permitem sobreviver em dormência no solo por mais de 30 anos, independentemente da presença da bananeira (MARYANI *et al.*, 2019). O ciclo inicia-se com a germinação dos esporos estimulada por exsudatos radiculares específicos, seguida pela penetração nas raízes, colonização do córtex e invasão massiva do sistema vascular (COSTA *et al.*, 2013).

A patogênese envolve a produção de enzimas degradadoras de parede celular e toxinas (como o ácido fusárico). A planta, em uma tentativa tardia de conter o fungo, produz gomas e tiloses que acabam por obstruir o xilema, levando ao colapso do transporte hídrico, amarelecimento foliar progressivo e morte da planta (BECKMAN, 1987; WARMAN; AITKEN, 2018). Essa capacidade de oclusão vascular e a persistência no solo tornam o controle químico ineficaz, justificando a necessidade de entender os mecanismos histoquímicos (deposição de calose e lignina) e metabólicos (vias de sinalização hormonal) para fortalecer a imunidade da planta de forma precoce (ZENG *et al.*, 2024).

2.2.3. Desafios do Manejo e a Necessidade de Resistência

Atualmente, o manejo do Foc baseia-se rigidamente na exclusão (quarentena) e contenção, uma vez que não existem fungicidas curativos ou métodos de erradicação viáveis em campo. O controle biológico com *Trichoderma* e microrganismos endofíticos tem demonstrado potencial em escala experimental, mas a expansão do TR4 e a falta de cultivares resistentes com aceitação de mercado continuam sendo os maiores entraves (WANG *et al.*, 2024; LIU *et al.*, 2025). Diante disso, o desenvolvimento de genótipos resistentes via melhoramento e o uso de substâncias elicitores que mimetizem as respostas

naturais de defesa constituem a via mais promissora para o manejo sustentável da cultura (DITA *et al.*, 2018; NOVAES *et al.*, 2024).

2.3. Interação planta–patógeno e mecanismos de resistência

Enquanto o melhoramento genético busca soluções de longo prazo, o manejo fisiológico via indução de resistência surge como uma fronteira promissora e complementar. A interação entre a bananeira e o Foc é regida por um sistema imune inato altamente complexo, que opera em diferentes níveis de percepção e resposta (JONES; DANGL, 2006).

2.4.1. Mecanismos de Reconhecimento e Sinalização Molecular

A primeira linha de defesa é a Imunidade Desencadeada por Padrões (PTI), iniciada pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), como a quitina do fungo. Se o patógeno consegue superar essa fase, a planta ativa a Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI), uma resposta mais específica e robusta mediada por genes de resistência (Genes R) que reconhecem efetores fúngicos (JONES; DANGL, 2006; THORDAL-CHRISTENSEN, 2020).

Essa percepção desencadeia uma rede complexa de respostas moleculares e hormonais. O ácido salicílico (SA) é o principal regulador das respostas contra patógenos biotróficos/hemibiotróficos, como o Foc na fase inicial, ativando genes marcadores como o *PR-1*. Simultaneamente, as vias do ácido jasmônico (JA) e do etileno regulam defesas contra a fase necrotrófica do fungo, modulando genes como as lipoxigenases (*LOX*). O balanço harmônico ou *cross-talk* entre essas vias hormonais determina a eficácia da planta em conter o avanço do patógeno no rizoma (LI *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2024; LIU *et al.*, 2025).

2.4.2. Barreiras Histoquímicas e Metabólicas

Uma vez sinalizada a infecção, a planta mobiliza barreiras físicas e químicas. As respostas estruturais/físicas incluem a deposição rápida de calose nos plasmodesmos e a lignificação das paredes celulares, visando a compartimentalização do fungo no córtex radicular (VELAME *et al.*, 2017). Metabolicamente, ocorre a síntese de compostos fenólicos citotóxicos e a produção de enzimas hidrolíticas, como as quitinases (CHI) e glucanases, que degradam ativamente as estruturas fúngicas (ROCHA *et al.*, 2020).

2.4.3. O Glicerol como Elicitor e sua Ação no Priming

Nesse cenário, o glicerol tem sido reavaliado como um potente imunomodulador vegetal. Ao ser absorvido e convertido em Glicerol-3-Fosfato (G3P), este composto atua como uma molécula sinalizadora crítica associada ao desencadeamento da Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (CHANDA *et al.*, 2011). A hipótese central do seu uso baseia-se no estabelecimento do estado de *priming*, onde o G3P prepara o sistema imune para responder de forma mais rápida e vigorosa sem o custo energético de uma defesa constitutiva ativa (YU *et al.*, 2016; NOVAES *et al.*, 2024).

Adicionalmente, o glicerol exerce uma ação direta e física. Devido às suas propriedades higroscópicas, sua aplicação pode alterar o potencial osmótico na superfície radicular, levando à desidratação de esporos e inibindo a germinação do patógeno no solo (TRIVUNOVIĆ *et al.*, 2022). Essa ação dupla (indutor molecular de defesas sistêmicas e agente fungistático osmótico) posiciona o glicerol como um insumo estratégico para o manejo sustentável da murcha de Fusarium (NOVAES *et al.*, 2024).

2.4. Indução de resistência e o papel do glicerol

O manejo fisiológico, via indução de resistência, surge como uma fronteira promissora e complementar ao melhoramento. Nesse cenário, o glicerol tem sido reavaliado não apenas como um subproduto abundante da indústria de biodiesel ou fonte de carbono para cultura de tecidos (YAPO *et al.*, 2011), mas como um potencial imunomodulador vegetal. Fisiologicamente, o glicerol exógeno é absorvido e convertido em Glicerol-3-Fosfato (G3P), uma molécula sinalizadora crítica associada ao desencadeamento da Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (CHANDA *et al.*, 2011).

A hipótese de uso deste composto no manejo da murcha de Fusarium baseia-se, portanto, em um mecanismo de ação duplo. O G3P modula a homeostase lipídica e sinaliza o sistema imune, preparando a planta para responder de forma mais rápida e robusta à infecção, sem o custo energético excessivo de manter uma defesa constitutiva ativa (YU *et al.*, 2016; NOVAES *et al.*, 2024). Simultaneamente, o composto pode exercer um efeito fungistático direto. Devido às suas propriedades higroscópicas, a aplicação de glicerol tem o potencial de alterar o potencial osmótico na superfície

radicular, causando a desidratação de esporos e inibindo a germinação do patógeno no solo (TRIVUNOVIĆ *et al.*, 2022).

2.5. Melhoramento genético e marcadores moleculares

Para superar a vulnerabilidade das cultivares comerciais, programas de melhoramento genético têm adotado o uso estratégico de diploides melhorados (JESUS *et al.*, 2013; SILVA, 2013; CAMPOS *et al.*, 2020). Esses genótipos possuem a vantagem da fertilidade e atuam como doadores de alelos de resistência em cruzamentos com triploides e tetraploides (REIS, 2017). Contudo, dada a baixa taxa de obtenção de sementes viáveis nesses cruzamentos, o suporte de ferramentas biotecnológicas, como o resgate de embriões e a micropropagação, torna-se indispensável para assegurar a sobrevivência e multiplicação das progênies geradas (ASSANI *et al.*, 2003; CÔTÉ *et al.*, 2010; FERREIRA, 2011).

Nesse cenário, a caracterização molecular assume um papel fundamental para a confirmação da hibridação e a análise da diversidade genética, superando as limitações impostas pela influência ambiental (NADEEN *et al.*, 2018; KALENDAR *et al.*, 2011). Dentre os marcadores, os microssatélites (SSR) consolidaram-se como a ferramenta de referência devido à sua natureza co-dominante, que permite distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos (CRESTE *et al.*, 2004; CHRISTELOVÁ *et al.*, 2011), sendo essenciais para a validação precisa de paternidade (KAEMMER *et al.*, 1997; AMORIM *et al.*, 2012). De forma complementar, os marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) mostram-se eficazes na detecção de variabilidade genética sem a necessidade de sequenciamento prévio (VIANNA *et al.*, 2019). Adicionalmente, os marcadores IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*), baseados em retrotransposons, são úteis para elucidar a constituição genômica e traçar a dissimilaridade entre diferentes cultivares (KALENDAR *et al.*, 2011; NAIR; TEO, 2017).

2.6. Análise de expressão gênica como ferramenta de validação

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) consolidou-se como o método padrão para a validação de respostas de defesa em plantas, devido à sua alta sensibilidade e especificidade na detecção de mudanças mínimas nos níveis de transcritos (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). No contexto da

patologia vegetal, essa ferramenta é indispensável para monitorar os marcos temporais da sinalização celular, uma vez que a eficácia da resistência muitas vezes não reside apenas na ativação de genes, mas na antecipação e intensidade dessa resposta transcricional (LI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2017).

A utilização de genes marcadores específicos permite mapear a ativação das principais vias hormonais de defesa. Genes como o *PR-1* (*Pathogenesis-Related protein 1*) são amplamente utilizados como indicadores da via do Ácido Salicílico (SA), associada à resistência contra patógenos biotróficos. Paralelamente, genes da família das Lipoxigenases (*LOX*) sinalizam a via do Ácido Jasmônico (JA), crucial para o combate a patógenos com fase necrotrófica (ROCHA *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2024). Além das vias de sinalização, o monitoramento de genes estruturais, como os da Calose Sintase (*CALS*), e de degradação fúngica, como as Quitinases (*CHI*), fornece uma leitura quantitativa da capacidade da planta em reforçar suas barreiras físicas e degradar a parede celular do invasor (ZHANG *et al.*, 2022).

Portanto, em estudos de indução de resistência, a análise do perfil transcricional atua como uma ponte diagnóstica. Ela permite identificar o estado de "alerta" (*priming*) induzido por substâncias elicitores, fornecendo a base molecular que sustenta o fenótipo de resistência observado posteriormente em condições de campo ou casa de vegetação (PASTOR *et al.*, 2013; NOVAES *et al.*, 2024).

REFERÊNCIAS

ALTENDORF, S. Banana Fusarium Wilt Tropical Race 4: A mounting threat to global banana markets. **Food Outlook**, Rome, p. 1-8, nov. 2019. FAO.

AMORIM, E. P. et al. Genetic diversity of carotenoid-rich bananas evaluated by Diversity Arrays Technology (DArT). **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 961-968, 2012.

AQUINO, A. et al. Economic impact of Fusarium Wilt Tropical Race 4 on the banana industry: A global assessment. **Agricultural Economics**, v. 53, n. 2, p. 115-128, 2022.

ARVAS, M. N. et al. Molecular characterization of banana genotypes using IRAP and REMAP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 70, p. 1-15, 2022.

ASSANI, A. et al. Influence of embryo rescue and culture media on the germination of banana (*Musa* spp.) hybrid seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 187-190, 2003.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

CEPEA. CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Anuário do agronegócio: hortifrúti**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2023.

CHANDA, B. et al. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 421-427, 2011.

CHRISTELOVÁ, P. et al. Molecular characterization of the banana (*Musa* spp.) L. germplasm collection using SSR markers. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, p. 3013–3024, 2011.

COSTA, J. L. **Estudos histológicos e moleculares da interação entre Musa acuminata e Fusarium oxysporum f. sp. cubense**. 2013. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CÔTÉ, F. X. et al. Propagation by Somatic Embryogenesis. In: **Banana Breeding: Progress and Challenges**. Boca Raton: CRC Press, 2010.

CRESTE, S. et al. Genetic diversity of Musa diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 723-733, 2004.

DITA, M. et al. Fusarium wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, art. 1468, 2018.

DONATO, S. L. R. et al. Ecophysiology and phytotechny of banana. In: PILLAY, M. (Ed.). **Banana breeding: progress and challenges**. Boca Raton: CRC Press, 2021.
DOREY, T. et al. Root architecture and growth in banana plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 110, 2015.

EMBRAPA. **Banana: Produção e Mercado**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2024. Disponível em: https://www.embrapa.br.

EYLAND, D. et al. Banana root system architecture and its role in plant stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 2022.

FAO. **FAOSTAT Database**. Rome: FAO, 2025. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/.

FERREIRA, C. F. Melhoramento genético da bananeira. In: FERREIRA, C. F. et al. (Ed.). **O agronegócio da banana**. Brasília: Embrapa, 2011.

FERREIRA, C. F. et al. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília: Embrapa, 2023.

GARCÍA-BASTIDAS, F. A. et al. First report of Fusarium wilt Tropical Race 4 in the Americas. **Plant Disease**, v. 104, n. 10, p. 2756, 2020.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE, 2025.

JESUS, O. N. de et al. Genetic diversity and population structure of Musa accessions in ex situ conservation. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 41, 2013.
JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.

KAEMMER, D. et al. Molecular breeding in the genus Musa: a strong case for STMS marker technology. **Euphytica**, v. 96, p. 49-63, 1997.

KALENDAR, R. et al. JavaWebLab: a Java-based software for the analysis of DNA fingerprinting data. **Methods in Molecular Biology**, v. 7, p. 24-34, 2011.

LI, B. et al. Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in systemic acquired resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 174, n. 4, p. 2486-2498, 2017.

LI, C. et al. Analysis of *Musa acuminata* transcriptome in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 infection. **BMC Genomics**, v. 14, art. 57, 2013.

LIN, Y. et al. Pangenome analysis of *Musa* highlights structural variation and resistance gene evolution. **Plant Biotechnology Journal**, v. 22, p. 150-165, 2024.

LIU, Y. et al. *Trichoderma virens* XZ11-1 promotes growth and controls Fusarium wilt in banana. **Microbial Cell Factories**, v. 24, p. 1-15, 2025.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MARYANI, N. et al. Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian center of origin. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 155-194, 2019.

MUNHOZ, T. et al. Fusarium Tropical Race 4 in Latin America and the Caribbean: status and global research advances towards disease management. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 2024.

NADEEN, M. A. et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 261-285, 2018.

NAIR, A.; TEO, C. H. Screening for genetic variation in tissue culture-derived banana plants using IRAP markers. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 19, p. 55-60, 2017.

NEVES, Y. C. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento de embriões de bananeira (*Musa* spp.) *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2001.

NOVAES, E. et al. Glycerol as an Inducer of Disease Resistance in Plants: A Systematic Review. **Horticulturae**, v. 10, n. 1, p. 45, 2024.

PASTOR, V. et al. Priming plants against pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 216, 2013.

PERRIER, X. et al. Multidisciplinary perspectives on bananas (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 28, p. 11311-11318, 2011.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana. **Phytopathology**, v. 105, n. 12, p. 1512-1521, 2015.

REIS, R. V. **Caracterização agronômica e molecular de diploides de bananeira (Musa spp.)**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2017.

ROCHA, A. J. et al. Transcriptome profiling of ‘Prata-Anã’ (AAB) and ‘Grand Naine’ (AAA) bananas reveals different defense responses to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 infection. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, art. 7096, 2020.

SANTOS, J. B. et al. Root system architecture traits associated with sodium tolerance in banana (*Musa* spp.). **Scientia Horticulturae**, v. 325, 2022.

SILVA, S. O. **Melhoramento genético da bananeira: estratégias e resultados**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013.

SILVA, S. O. et al. Melhoramento genético da bananeira. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 333-339, 2001.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society of London, Botany**, v. 55, p. 302-312, 1955.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. A holistic view on plant effector-triggered immunity. **Molecular Plant Pathology**, v. 21, p. 939-952, 2020.

TRIPATHI, L. et al. Improvement of banana (*Musa* spp.) for disease resistance. In: **Genomics of Tropical Crop Plants**. New York: Springer, 2019.

TRIVUNOVIĆ, S. et al. Antimicrobial activity of glycerol against phytopathogenic fungi. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, p. 488, 2022.

UMA, S. et al. **Embryo rescue in banana**. Trichy: NRCB, 2011.

VELAME, K. V. C. et al. **Genes de Bananeira Candidatos à Resistência a Murcha de Fusarium e Caracterização da Agressividade e Virulência do Fungo**. 2017. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2017.

VIANNA, J. P. G. et al. Diversity and genetic structure of a germplasm collection of *Musa* spp. using ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 66, p. 123-135, 2019.

WANG, X. et al. Efficacy of *Bacillus velezensis* EB1 against banana Fusarium wilt. **BMC Microbiology**, v. 24, p. 1-12, 2024.

WARMAN, N. M.; AITKEN, E. A. B. The movement of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (subtropical race 4) in susceptible and resistant banana cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

YAPO, S. et al. Effect of carbon source on somatic embryogenesis and regeneration in banana (*Musa* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 335–344, 2011.

YU, Y. et al. Glycerol-Induced Powdery Mildew Resistance in Wheat by Regulating Plant Fatty Acid Metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

ZENG, H. et al. Transcriptomic analysis reveals key defense mechanisms in *Musa* spp. against Fusarium wilt. **BMC Genomics**, v. 25, p. 1-14, 2024.

ZHANG, J. et al. Identification and validation of reference genes for qRT-PCR analysis in banana under Fusarium wilt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, art. 1315, 2017.

ZHANG, L. et al. MaWRKY26 activates the expression of defense-related genes in banana. **Horticulture Research**, v. 9, art. uhac012, 2022

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE DE HÍBRIDOS DE BANANEIRA ORIUNDOS DE CRUZAMENTOS ENTRE VARIEDADES DO SUBGROUPO CAVENDISH E DIPLOIDES MELHORADOS

IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE DE HÍBRIDOS DE BANANEIRA ORIUNDOS DE CRUZAMENTOS ENTRE VARIEDADES DO SUBGROUPO CAVENDISH E DIPLOIDES MELHORADOS

RESUMO: A identificação precisa de híbridos é uma etapa crítica no melhoramento genético da bananeira em função da complexidade genômica da espécie e de sua propagação vegetativa. Este capítulo objetivou identificar híbridos oriundos de cruzamentos entre variedades do subgrupo Cavendish (Williams, Nanica e Grande Naine) e diploides melhorados. A certificação foi conduzida prioritariamente por marcadores do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*), que são codominantes e, portanto, a ferramenta mais adequada para confirmar a paternidade, pois permitem visualizar simultaneamente a herança de alelos de ambos os genitores. Das 12 combinações de *primers* SSR testadas, duas (mMACIR24 e mMACIR40) confirmaram os híbridos Pol5439 (Williams x CNPMF0731) e Pol5662/22 (Nanica x 0280003-01). Complementarmente, utilizou-se uma análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada em uma matriz de dissimilaridade composta por marcadores SSR, ISSR e IRAP. Os dois primeiros eixos da PCoA explicaram 42,0% da variação genética total, valor considerado satisfatório para representar a estrutura dos cruzamentos, indicando que as principais tendências de agrupamento foram capturadas, enquanto os 58% restantes referem-se a variações menores e complexidades dimensionais inerentes aos marcadores dominantes. A análise conjunta sugere que o genótipo Pol7154 também é um híbrido verdadeiro, enquanto Pol008228 e Pol00571 demandam validação adicional. Os valores de dissimilaridade variaram de 0,64 a 0,93, o que indica uma elevada variabilidade genética e uma base divergente entre os parentais utilizados. A integração de marcadores SSR para identificação e PCoA para estudo de diversidade mostra-se fundamental na *pipeline* do PMGB para assegurar a acurácia na seleção de genótipos promissores.

Palavras-chave: *Musa* spp.; Marcadores Moleculares; SSR; ISSR; IRAP; Melhoramento Genético.

IDENTIFICATION AND DIVERSITY OF BANANA HYBRIDS DERIVED FROM CROSSES BETWEEN CAVENDISH SUBGROUP VARIETIES AND IMPROVED DIPLOIDS

ABSTRACT: Accurate hybrid identification is a critical step in banana breeding due to the species' genomic complexity and its vegetative propagation. This chapter aimed to identify hybrids derived from crosses between Cavendish subgroup varieties (Williams, Nanica, and Grande Naine) and improved diploids. Certification was primarily conducted using SSR (Simple Sequence Repeats) markers, which are codominant and, therefore, the most suitable tool for confirming paternity, as they allow the simultaneous visualization of allele inheritance from both parents. Out of 12 SSR primer combinations tested, two (mMACIR24 and mMACIR40) confirmed the hybrids Pol5439 (Williams x CNPMF0731) and Pol5662/22 (Nanica x 0280003-01). Additionally, a Principal Coordinate Analysis (PCoA) was performed based on a dissimilarity matrix comprising SSR, ISSR, and IRAP markers. The first two axes of the PCoA explained 42.0% of the total genetic variation, a value considered satisfactory for representing the crossing structure, indicating that the main grouping trends were successfully captured, while the remaining 58% account for minor variations and dimensional complexities inherent to dominant markers. The combined analysis suggests that genotype Pol7154 is also a true hybrid, whereas Pol008228 and Pol00571 require additional validation. Dissimilarity values ranged from 0.64 to 0.93, indicating high genetic variability and a divergent genetic base among the parental lines. The integration of SSR markers for identification and PCoA for diversity studies is a fundamental step within the PMGB pipeline to ensure accuracy in the selection of promising genotypes.

Keywords: *Musa* spp.; Molecular Markers; SSR; ISSR; IRAP; Breeding.

1. INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) consolidou-se como uma das frutíferas de maior relevância global, sendo cultivada em mais de 130 países de clima tropical e subtropical. Atua como base alimentar estratégica e principal fonte de renda para milhões de pessoas, especialmente em países em desenvolvimento. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2025), a banana é a fruta mais produzida mundialmente, com um volume anual superior a 139 milhões de toneladas. No cenário brasileiro, a cultura desempenha papel fundamental na segurança alimentar e na economia, com o país figurando como o quarto maior produtor mundial. Dados recentes indicam que a produção nacional atingiu aproximadamente 6,8 milhões de toneladas em uma área superior a 450 mil hectares (IBGE, 2025; FAO, 2025). Essa robustez produtiva sustenta a agricultura de pequenos e médios produtores e integra complexas cadeias da agroindústria nacional.

Apesar de sua importância, a bananicultura enfrenta sérios entraves fitossanitários, destacando-se a murcha de Fusarium, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Esta enfermidade é uma das mais destrutivas da cultura, tendo ganhado proporções alarmantes com a emergência da Raça Tropical 4 (TR4), variante de alta virulência que tem causado perdas severas na Ásia, África e, recentemente, na América Latina (PLOETZ, 2015; GARCÍA-BASTIDAS et al., 2020). A ameaça ao Brasil é agravada pela inexistência de fungicidas eficazes em campo e pela alta suscetibilidade das cultivares comerciais plantadas no país, o que coloca em risco a viabilidade econômica do setor (DITA et al., 2018; BUBICI et al., 2019).

Nesse cenário, o melhoramento genético clássico é essencial para o desenvolvimento de genótipos resistentes e produtivos. Entretanto, o processo tradicional encontra limitações biológicas significativas, visto que a maioria das cultivares comerciais é triploide (3x) e estéril, o que inviabiliza a produção natural de sementes e dificulta a recombinação gênica (FERREIRA, 2011; SILVA, 2013). Para superar esse gargalo, utiliza-se o cruzamento estratégico entre triploides e diploides melhorados — genótipos férteis que reúnem resistência a doenças, porte reduzido e alta produtividade (JESUS et al., 2013; CAMPOS et al., 2020). Essa abordagem permite restabelecer o ciclo reprodutivo e realizar a introgressão de alelos de interesse (SILVA, 2013).

Contudo, um desafio crítico após a hibridação controlada é que nem todos os descendentes obtidos são necessariamente híbridos verdadeiros. Ocorrências como a autofecundação indesejada da planta-mãe, polinização acidental por fontes externas ou o fenômeno da apomixia (reprodução assexual por semente) podem gerar progênies que não carregam a herança genética do genitor masculino selecionado. Por essa razão, a validação molecular torna-se indispensável para assegurar a integridade do material genético (REIS, 2017; FERREIRA et al., 2023).

Técnicas baseadas em PCR, como os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), são as ferramentas de referência nesse processo devido à sua natureza codominante, que permite visualizar a contribuição alélica de ambos os pais e confirmar o sucesso do cruzamento (AMORIM et al., 2011; MOGES et al., 2022). Complementarmente, os marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) e IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) permitem estimar a diversidade e posicionar os genótipos por meio de análises de agrupamento e estrutura populacional (KALENDAR et al., 2011; ARVAS et al., 2022).

A hipótese deste capítulo é que o emprego de marcadores moleculares, com ênfase nos SSR, integrados a análises de dissimilaridade genética e PCoA, seja capaz de identificar e diferenciar com precisão híbridos verdadeiros de materiais não híbridos em populações oriundas de cruzamentos de bananeira. Portanto, o objetivo deste trabalho consistiu em identificar e validar possíveis híbridos entre variedades do subgrupo Cavendish e diploides melhorados utilizando marcadores SSR. Adicionalmente, buscou-se, por meio de matrizes de diversidade e análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando marcadores ISSR e IRAP, posicionar os genótipos em relação aos cruzamentos e avaliar a dissimilaridade genética geral a ser explorada dentro do Programa de Melhoramento Genético da Bananeira (PMGB).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, pertencente ao Núcleo de Biologia Avançada (NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas, BA (12°40'19"S; 39°06'22"W; 220 m acima do nível do mar). O clima do município é quente e úmido, classificado como tropical (Af), com temperatura

média de 23,7 °C, índice pluviométrico médio anual de 1.161 mm e 2.327,88 horas de luz solar anual (AGRITEMPO, 2025).

2.2. Material vegetal

Foram avaliadas três cultivares triploides (AAA) de bananeiras pertencentes ao subgroupo Cavendish, a citar: Williams, Nanica, Grande Naine, além de quatro diploides melhorados e cinco possíveis híbridos oriundos dos cruzamentos entre variedades triploides e diploides melhorados (Tabela 1). Os diploides melhorados foram escolhidos por serem resistentes às principais doenças da bananeira, murcha de Fusarium, Sigatoka negra, Sigatoka Amarela. Todo o material genético pertence ao Banco de Germoplasma de Banana da Embrapa-CNPMF.

Tabela 1. Identificação dos genótipos utilizados em cruzamentos, possíveis híbridos e estudo de diversidade genética em bananeira

Nome	Ploidia	Identidade	Origem	Resistência a doenças
Pol5439	AA	Williams x CNMPF-0731	BAG-PMGB	-
Williams	AAA	Variedade comercial	BAG-PMGB	Foc R1
CNPMF-0731	AA	Diplóide melhorado	BAG-PMGB	Foc R1, SN, SA
Pol5662/22	AA	Nanica x 028003-01	BAG-PMGB	-
Nanica	AAA	Variedade comercial	BAG-PMGB	FocR1
0280003-01	AA	Diplóide melhorado	BAG-PMGB	Foc R1, SN, SA
Pol7154	AA	Williams x CNMPF-0731	BAG-PMGB	-
Pol008/22	AA	PMGB 069 x Nanica	BAG-PMGB	-
PMGB-069	AA	Diplóide melhorado	BAG-PMGB	Foc R1, SN, SA
Pol0057	AA	CNPMF-998 x GN	BAG-PMGB	-
CNPMF-998	AA	Diplóide melhorado	BAG-PMGB	Foc R1, SN, SA
Grande Naine	AAA	Variedade comercial	BAG-PMGB	FocR1

Banco Ativo de Germoplasma do Programa de Melhoramento Genético da Bananeira; Foc R1**:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raça 1; SN**:** Sigatoka-negra; SA**:** Sigatoka-amarela; CNPMF**:** Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (Embrapa).

2.3. Extração e quantificação do DNA genômico

Para a extração e amplificação do DNA, foram coletadas folhas jovens, imediatamente armazenadas em ultra-freezer a -80 °C, garantindo a conservação da integridade do DNA até o momento do uso. O DNA genômico foi extraído a partir das

folhas utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1990), adaptado conforme Ferreira et al. (2019). Porções de tecido foliar foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido, em presença de 1 mL de tampão de extração CTAB (2.4 %) contendo EDTA (20 mM), NaCl (1.7 M), Tris-HCl pH 8.0 (0.1 M), PVP (2 %) e β-mercaptoetanol (0.4%).

A qualidade e integridade do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com GelRed®, sob tensão de 80 V por 1 hora. A quantificação foi realizada comparando-se as amostras a padrões de DNA lambda com massas conhecidas (100 ,150 e 300 ng), permitindo padronizar as concentrações para as reações de PCR subsequentes. As amostras de DNA extraído foram padronizadas na concentração de 10 ng. µL-1 e armazenadas a -20 °C até o uso.

2.3. Análise SSR (*Simple Sequence Repeats*) na identificação de possíveis híbridos de bananeira

Foram usados 6 primers SSR (Lagoda et al. 1998, Hypolite et al. 2010) (Tabela 2) para a análise dos acessos. As reações foram conduzidas em um volume final de 20 µL para cada amostra, contendo 1.5 µL de MgCl (25 mM), 2.0 µL de tampão PCR 10x, 1.0 µL de dNTP (2.5 mM), 0.8 µL de cada primer (5 mM), 0.3 µL de Taq DNA polimerase comercial (5U. µL-1), 3.0 µL de DNA (30 ng) e água livre de nuclease. A programação da amplificação consistiu em 2 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, seguida de 39 ciclos consistindo em 60 segundos de desnaturação a 94 °C, 60 segundos na temperatura de anelamento (Tabela 4), seguida por 60 segundos de extensão em 72 °C e 10 minutos de extensão final em 72 °C.

Tabela 2. Relação dos primers *Simple Sequence Repeats* (SSR) utilizados no estudo de identificação de possíveis híbridos de bananeiras

Marcador	Ta (°C)	Motif	Acesso GenBank	Sequência (5'→3')	Referência
mMACIR24	52°C	$(TC)_7$	X87262	R:TTTGATGTCACAATGGTGTTCC F:TTAAAGGTGGGTTAGCATTAGG	Lagoda et al., 1998
mMACIR40	54C	$(GA)_{13}$	X87258	R:CATCTTCACCCCCATTCTTTTA F:GGCAGCAACAACATACTACGAC	Lagoda et al., 1998

mMACIR231	55°C	$(TC)_{10}$		R:ACCCAGGTCTATCAGGTCA	
			Z85972	F:GCAAATAGTCAAGGGAATCA	Lagoda et al., 1998
mMACIR45	56°C	$(TA)_4CA(CTCGA)_4$		R:ACCGCACCTCCACCTCCTG	
			Z85977	F:TGCTGCCTTCATCGCTACTA	Lagoda et al., 1998
mMACIR01	55°C	$(GA)_{20}$		R:TTTGATGTCACAATGGTGTTCC	
			Z85968	F:TTAAAGGTGGGTTAGCATTAGG	Lagoda et al., 1998
mMACIR07	53°C	$(GA)_{13}$		R:GATCTGAGGATGGTTCTGTTGG AGTG	
			AM950497	F:AACAACTAGGATGGTAATGTGT GGAA	Hippolyte et al., 2010

Ta = Temperatura de anelamento: temperatura utilizada para amplificar a combinação dos primers em termociclador durante a PCR – *Polymerase Chain Reaction*

2.4. Análise IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)*

Os procedimentos PCR-IRAP foram realizados com base em Teo et al. (2005) e e Baumel et al. (2002) com adaptações na programação da amplificação. Marcadores baseados em retrotransposons LTR, das famílias Nikita, Bare 1, Sabrina e Stowaway, especificamente os primers originados em sorgo (*Hordeum vulgare* L.), Nikita, LTR6150, LTR6149 (Tabela 3), foram usados de forma combinada para a análise de IRAPs. As reações PCR-IRAP foram realizadas com volume final de 15µL por amostra, contendo 4 µL de DNA molde (40 ng), 0.75 µL de MgCl2 (50 mM), 1.5 µLde tampão PCR 10 x, 1.2 µL de dNTP (2.5 mM), 1.5 µL de cada primer (10 mM) pareado, 0.3 µL de Taq DNA polimerase comercial (5 U µL-1) e água livre de nuclease.

Tabela 3: Relação dos primers *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism* (IRAP) utilizados na análise de dissimilaridade genética e PCoA.

Primer	**Famíliade Origem**	**Ta (°C)**	**Sequência (5'→3')**	**Referência**
LTR6149	BARE 1	44 °C	5'-CTCGCTCGCCCACTACAT	Teo et al.

			CAACCGCGTTTATT-3’	(2005)
C0945	Sabrina	44 °C	5’-GCAAGCTTCCGTTTCCGC-3’	Baumel et al. (2002)
5’LTR2	BARE 1	44°C	5’-ATCATTGCCTCTAGGGCA TAATTC-3’	Teo et al. (2005)
LTR6150	BARE 1	44 °C	5’-CTGGTTCGGCCCATGTCT ATGTATCCACACATGTA-3’	Teo et al. (2005)
C0699	Nikita	44 °C	5’-CGCTCCAGCGGTACTGCC-3’	Baumel et al. (2002)
Stowaway	Stowaway	44 °C	5-CACCACCACCACCACCACYC- 3’	Baumel et al. (2002)

Ta = Temperatura de anelamento: temperatura utilizada para amplificar a combinação dos primers em termociclador durante a PCR – *Polymerase Chain Reaction*

O protocolo de amplificação consistiu na programação de uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento (45 °C a 48 °C) por 60 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos por ciclo; seguindo para extensão final com manutenção em 72 °C por 5 minutos e finalização da reação com redução da temperatura até 10 °C, para manutenção até a retirada das amostras do termociclador.

2.4. Análise ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats***)** usados na análise de dissimilaridade genética e PCoA

Oito primers ISSR (Tabela 4), foram selecionados para a análise dos acessos. O mix de reação PCR consistiu em um volume final de 25 µL contendo 2.5 µL de MgCl (25 mM), 2.5 µL de tampão PCR 10x, 2.0 µL de dNTP (2.5 mM), 3.5 µL de primer (2 mM), 0.2 µL de Taq DNA polimerase comercial (5U. µL-1), 4.0 µL de DNA (40 ng) e água livre de nuclease. A programação da amplificação consistiu em 3 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, seguida de 39 ciclos consistindo em 40 segundos de desnaturação a 94 °C, 40 segundos na temperatura de anelamento, seguida por 60 segundos de extensão em 72° C e 5 minutos de extensão final em 72° C

Tabela 4: Relação dos primers *Inter-Simple Sequence Repeats* (ISSR) utilizados na análise de dissimilaridade genética e PCoA.

Marcador	Nome	Ta (°C)	Sequência (5'➞3')	Referência
ISSR11	DiGA3'C	46 °C	5'GAGAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	Embrapa
ISSR95	TriGTT 3'RC	46 °C	5'-GTTGTTGTTGTTGTTGTRC-3'	Embrapa
ISSR47	TriTGT5 'CY	46 °C	5'-CYTGTTGTTGTTGTTGTTG- 3'	Embrapa
ISSR92	TriGAC 3'RC	46 °C	5'-GACGACGACGACGACGACRC-3'	Embrapa
ISSR72	TriTCC 3'RC	46 °C	5'-TCCTCCTCCTCCTCCTCCRC-3'	Embrapa
ISSR30	TriCAC3 'YC	46 °C	5'-CACCACCACCACCACCACYC-3'	Embrapa
ISSR29	TriCAC3 'RC	46 °C	5'-CACCACCACCACCACCACRC-3'	Embrapa
ISSR57	TriACC 3'RC	46 °C	5'-ACCACCACCACCACCACRC-3'	Embrapa

Ta = Temperatura de anelamento: temperatura utilizada para amplificar a combinação dos primers em termociclador durante a PCR – *Polymerase Chain Reaction*

2.5. Análise de Dados

Após a conclusão das reações de PCR, os produtos amplificados correram em eletroforese mediante a mistura de 15 µL do produto de PCR com 3 µL de solução tampão de corrida contendo o intercalante Gel Red®. A separação dos fragmentos de DNA ocorreu em géis de agarose com concentrações distintas, ajustadas conforme a resolução necessária para cada tipo de marcador: utilizou-se agarose a 3% para os marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) e agarose a 2% para os marcadores IRAP

(Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats). A corrida eletroforética foi conduzida em cuba contendo tampão TBE 5x, sob voltagem constante de 70 V, por um período aproximado de três horas.

A documentação dos géis foi realizada sob luz ultravioleta (UV), utilizando o sistema de captura de imagens Loccus L-PIX EX 25x30. Para a estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados, foram utilizados como referência os marcadores de peso molecular (Ladder) Invitrogen Plus 100 pb para os géis de SSR e Invitrogen Plus 1 Kb para os géis de IRAP e ISSR. A leitura dos perfis eletroforéticos dos possíveis híbridos via SSR, considerou perfis discriminantes entre P1, P2 e F1 (possível híbrido) e para os marcadores SSR, IRAP e ISSR, scores de zero (0) ausência de banda e um (1) presença de banda. Para a análise de diversidade, gerou-se uma matriz binária de dados com base no índice de Jaccard (Jaccard, 1901), atribuindo-se o valor (1) para a presença e (0) para a ausência de bandas para cada primer avaliado (ARVAS et al., 2023). A matriz foi construída utilizando o software R (R Core Development Team, 2024) com o pacote "*prabclus*". O dendrograma foi construído a partir da matriz de dissimilaridade genética e o agrupamento pelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).* Esse método de aglomeração foi selecionado por minimizar distorções na representação das distâncias originais, conforme recomendado por Sneath et al. (1973).

De forma complementar, realizou-se a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), utilizando a mesma matriz de dissimilaridade, com o objetivo de projetar as distâncias genéticas em um plano bidimensional e representar a alocação espacial dos possíveis híbridos em relação aos seus parentais. A análise de PCoA foi conduzida utilizando o software R e o pacote "*vegan*".

3. RESULTADOS

3.1. Identificação dos possíveis híbridos provenientes do cruzamento entre variedades do subgrupo Cavendish e diploides melhorados.

Para a identificação de possíveis híbridos de bananeira provenientes do cruzamento entre variedades do subgrupo Cavendish e diploides melhorados, foram testadas 6 combinações de iniciadores (*primers*) SSR. Dentre as combinações avaliadas, os marcadores MaCIR24 e MaCIR40 mostraram-se eficientes na confirmação da

hibridização, permitindo a identificação de dois híbridos verdadeiros a partir dos cinco cruzamentos analisados (Figura 1).

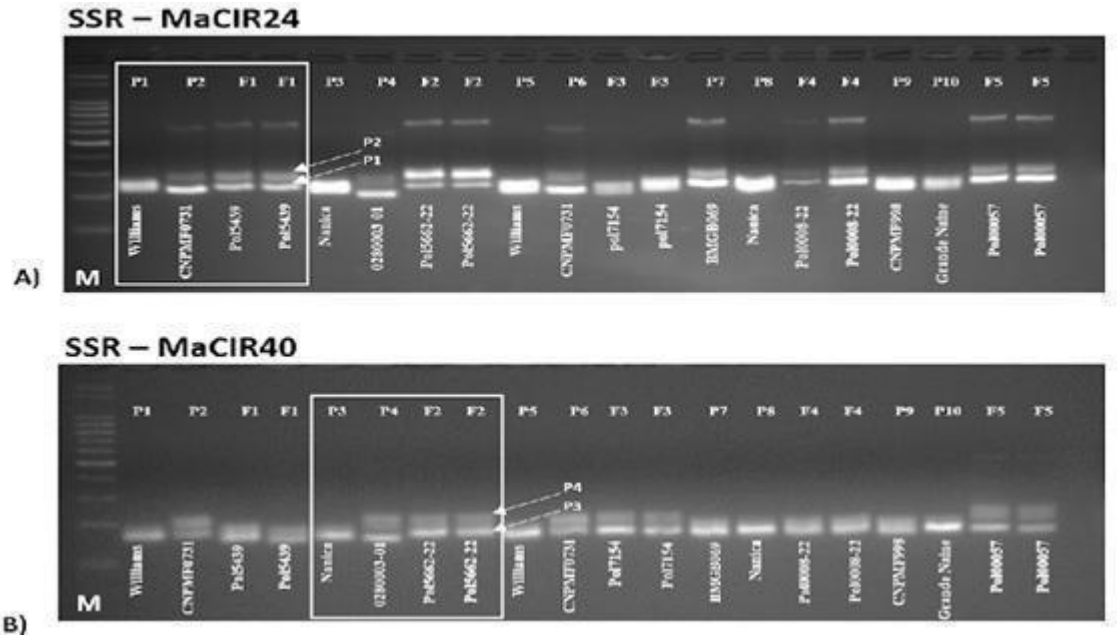


Figura 1 (A e B): Gel de agarose 3% representando os parentais e possíveis híbridos utilizados no estudo via marcadores SSR. A) P1 a P10: Parentais de cada cruzamento e F1 a F5: duas repetições de cada possível cruzamento utilizando a combinação de primers (MaCIR24.

No perfil eletroforético gerado pelo marcador MaCIR24 (Figura 1A), observa-se que a progênie F1 (Pol5439), oriunda do cruzamento entre P1 (Williams) e P2 (CNPMF-0731), apresenta um padrão de bandas co-dominante. As setas no gel indicam a presença simultânea de bandas diagnósticas herdadas de ambos os genitores no possível híbrido, validando sua origem por via sexual.

De forma análoga, o marcador MaCIR40 (Figura 1B) confirmou o sucesso da hibridização para o cruzamento entre P3 (Nanica) e P4 (0280003-01). O genótipo F2 (Pol5662-22) exibiu a reunião de alelos provenientes dos genitores materno e paterno, conforme sinalizado pelas setas, o que descarta a ocorrência de apomixia ou erros de amostragem para este material.

3.2. Análise de dissimilaridade genética e PCoA

A caracterização molecular fundamentou-se na análise de 56 bandas polimórficas, obtidas via marcadores IRAP (17 bandas de 5 iniciadores), ISSR (23 bandas de 6 iniciadores) e SSR (16 bandas de 2 iniciadores), visando cobrir diferentes regiões do

genoma. Entre os ISSRs, o iniciador ISSR 30 destacou-se como o mais informativo (5 bandas), seguido pelos iniciadores ISSR 47, 95 e 72 (4 bandas cada) e pelos iniciadores 29 e 11 (3 bandas cada). O perfil eletroforético representativo de cada marcador encontra-se na Figura 2 (A, B e C).

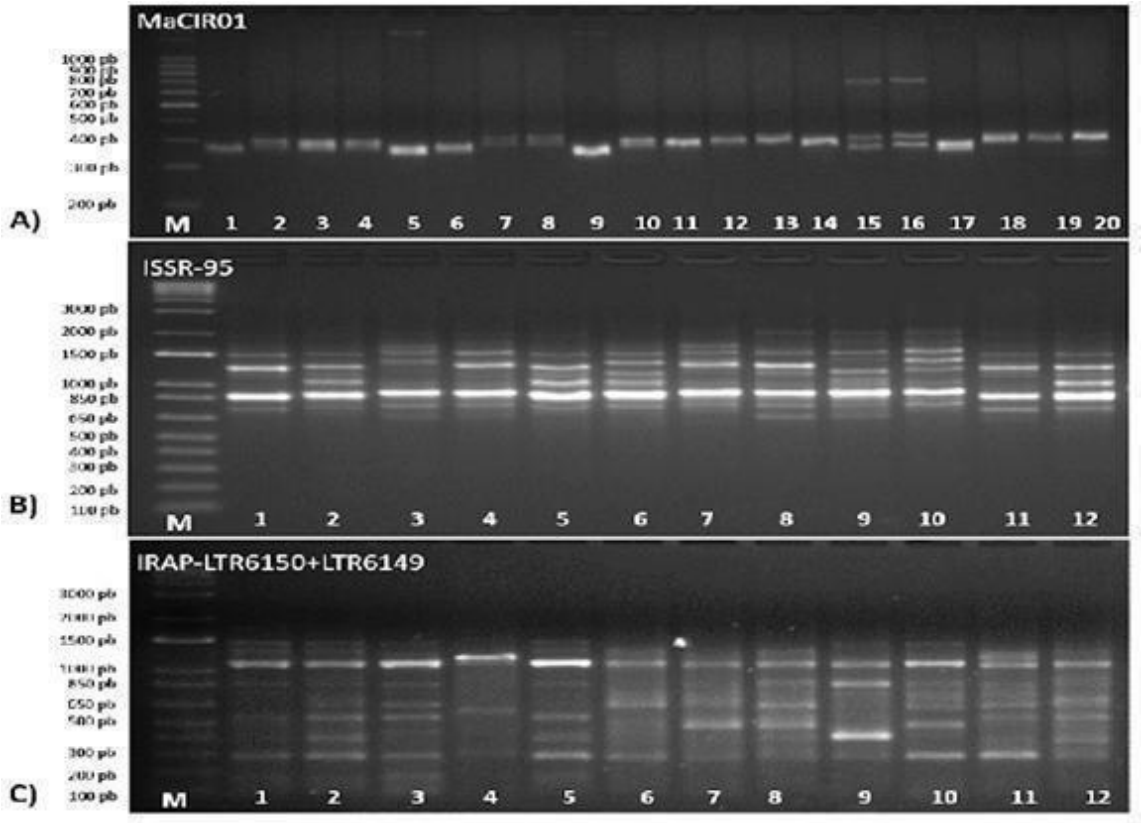
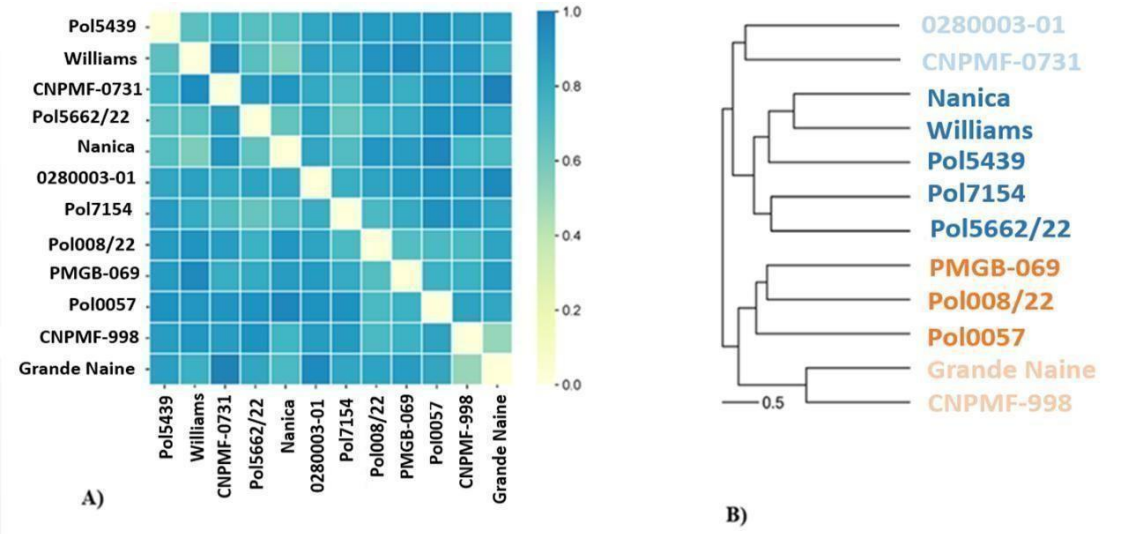


Figura 2. (A, B, C): A) perfil eletroforético de 20 entre parentais e possíveis híbridos (duas repetições) em estudo em gel de agarose 3% usando marcador SSR (mMaCIR 01); B) perfil eletroforético de 12 amostras entre parentais e possíveis híbridos em estudo em gel de agarose 2% usando marcador ISSR (ISSR 95) e C) perfil eletroforético de 12 amostras entre parentais e possíveis híbridos em estudo em gel de agarose 2% usando marcador IRAP LTR6150+LTR6149. M = Marcador ladder (Invitrogen®).

Simultaneamente, para a análise via marcadores IRAP, as cinco combinações de primers gerou um total de 17 bandas polimórficas. Dentre as combinações testadas, a interação 3'LTR+NIKITA destacou-se pela maior contribuição, com cinco bandas polimórficas, seguida pelas combinações LTR6149+6150 e STOWAWAY+CO699; ambas com quatro bandas. As combinações LTR6149+CO945 e 5'LTR2+CO945 contribuíram com duas bandas cada. Adicionalmente, o estudo integrou dados de dezesseis locos de microssatélites (SSR: mMaCIR 01, 07, 24, 40, 45 e 231), compondo uma matriz de dados robusta que permitiu o refinamento das análises de agrupamento e ordenação espacial apresentadas nas seções subsequentes.

3.2. Análise de agrupamento e PCoA

A matriz de dissimilaridade genética (Figura 3: A, B, C, D e E) foi construída utilizando um total de 56 bandas polimórficas provenientes dos marcadores SSR, ISSR e IRAP com base no complemento do coeficiente de Jaccard, onde a magnitude das distâncias entre os pares de genótipos é representada por um gradiente colorimétrico. As tonalidades mais claras (amarelo/verde-claro) indicam maior similaridade genética (menor distância), enquanto as tonalidades escuras (azul) indicam maior dissimilaridade (Figura 3A).



Sample	Pol5439	Williams	CNPMF-0731	Pol5662/22	Nanica	0280003-01	Pol7154	Pol008/22	PMGB-069	Pol0057	CNPMF-998	Grande Naine
Pol5439	0.00	0.67	0.76	0.68	0.69	0.83	0.88	0.89	0.89	0.93	0.88	0.87
Williams	0.67	0.00	0.95	0.68	0.57	0.86	0.81	0.92	0.96	0.91	0.91	0.78
CNPMF-0731	0.76	0.95	0.00	0.88	0.90	0.82	0.71	0.88	0.79	0.92	0.88	1.00
Pol5662/22	0.68	0.68	0.88	0.00	0.65	0.84	0.64	0.77	0.81	0.93	0.93	0.83
Nanica	0.69	0.57	0.90	0.65	0.00	0.83	0.70	0.91	0.88	0.97	0.75	0.72
0280003-01	0.83	0.86	0.82	0.84	0.83	0.00	0.79	0.85	0.89	0.93	0.88	0.96
Pol7154	0.88	0.81	0.71	0.64	0.70	0.79	0.00	0.72	0.81	0.93	0.89	0.83
Pol008/22	0.89	0.92	0.88	0.77	0.91	0.85	0.72	0.00	0.69	0.72	0.72	0.84
PMGB-069	0.89	0.96	0.79	0.81	0.88	0.89	0.81	0.69	0.00	0.77	0.77	0.88
Pol0057	0.93	0.91	0.92	0.93	0.97	0.93	0.93	0.72	0.77	0.00	0.85	0.83
CNPMF-998	0.88	0.91	0.88	0.93	0.75	0.88	0.89	0.72	0.77	0.85	0.00	0.50
Grande Naine	0.87	0.78	1.00	0.83	0.72	0.96	0.83	0.84	0.88	0.83	0.50	0.00

D)

Sample	Pol5439	Williams
Williams	0.75	
CNPMF-0731	0.40	1.00

E)

Sample	Nanica	0280003-01
0280003-01	0.75	
Pol5662/22	0.40	1.00

Figura 3. A) Matriz de dissimilaridade genética (heatmap) entre 12 genótipos de Musa spp., baseada no complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. A matriz foi construída a partir da integração de dados de marcadores moleculares (SSR, IRAP e ISSR). A escala de cores representa a distância genética, variando de amarelo (baixa dissimilaridade/maior similaridade) a azul escuro (alta dissimilaridade). B) Dendrograma com a representação dos grupos construído com base no UPGMA (*Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean*), C) Matriz de disslimilaridade genética via marcadores SSR, ISSR e IRAP de todos os parentais e possíveis híbridos, D) matriz de dissimilaridade genética obtida apenas via marcadores SSR entre o possível híbrido Pol5439 e E) entre o possível híbrido Pol5662/22 e seus parentais, obtidas pelo software R, pacote *prabclus*.

A análise visual do mapa de calor (*heatmap*) revela que a maioria das interações entre os acessos apresenta alta dissimilaridade, predominando a coloração azul na matriz (Figura 3A). Contudo, observa-se "ilhas" de similaridade que corroboram o parentesco entre determinados materiais. Destaca-se a baixa dissimilaridade entre os híbridos e suas respectivas genitoras do subgrupo Cavendish.

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi conduzida para projetar a dispersão espacial dos possíveis híbridos em relação aos seus genitores. Os dois primeiros eixos principais explicaram, conjuntamente, 42.0% da variação total dos dados, sendo 22.94% atribuídos ao primeiro eixo (PCoA1) e 19.06% ao segundo eixo (PCoA2) (Figura 4).

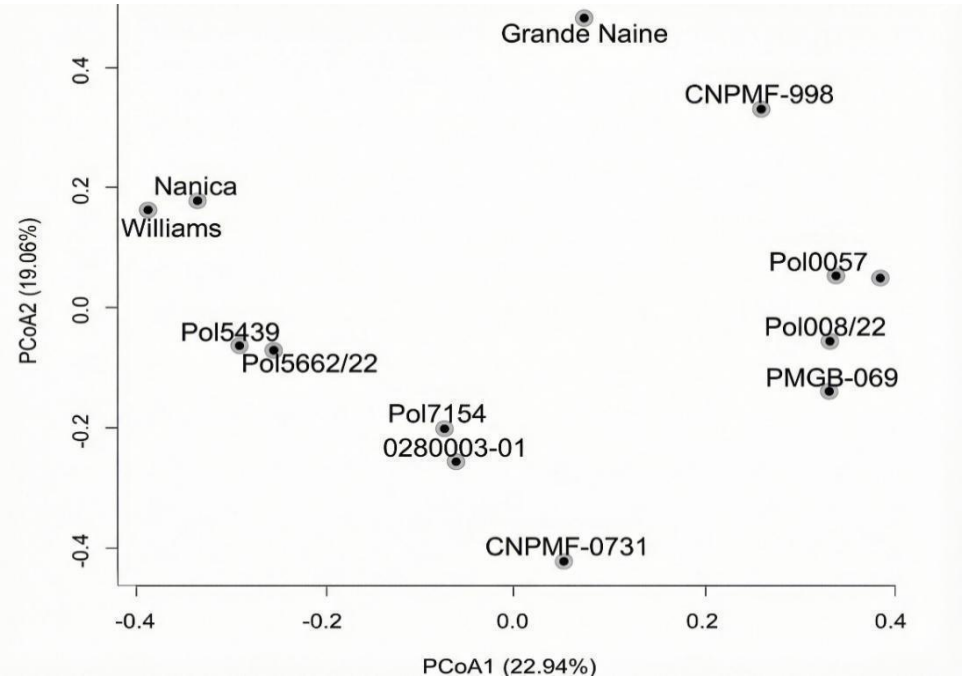


Figura 4. Dispersão gráfica dos possíveis híbridos de bananeira em relação a seus genitores baseados na Análise de Coordenadas Principais (PCoA).

4. DISCUSSÃO

A cultura da bananeira, dadas as limitações biológicas como a esterilidade e a partenocarpia, depende de ferramentas biotecnológicas que auxiliem os cruzamentos e garantam o sucesso do PMGB. Em nosso estudo, os marcadores moleculares SSR confirmaram a hibridação dos genótipos Pol5439 (Williams x CNPMF-0731) e

Pol5662/22 (Nanica x 0280003-01) através da detecção de alelos codominantes herdados de ambos os genitores (Figura 1).

Essa confirmação precoce é fundamental para a logística de um programa de melhoramento. Como demonstrado por MENDOZA *et al.* (2022), o uso de microssatélites específicos permite uma distinção precisa entre híbridos verdadeiros e plantas oriundas de autofecundação ou apomixia, fenômenos comuns em *Musa* spp. A elevada capacidade discriminatória desses marcadores para caracterizar a variabilidade e validar parentesco também foi corroborada por SHIVAKUMAR *et al.* (2022), reforçando o SSR como a ferramenta de referência para a certificação de progênies.

A validação de cruzamentos controlados exige uma interpretação rigorosa das análises multivariadas. A fundamentação estatística para essas interpretações, discutida por MOHAMMADI e PRASANNA (2003), destaca que, em um espaço multidimensional, espera-se que distâncias intermediárias indiquem a natureza híbrida do indivíduo. Sob herança codominante, o híbrido compartilha alelos com ambos os genitores, satisfazendo a relação geométrica onde a distância total entre os pais é decomposta pelas distâncias do híbrido para cada um deles.

Em nossa análise, o híbrido Pol5439 ficou alocado entre seus progenitores, com distâncias genéticas de 0,75 para a mãe (Williams) e 0,40 para o pai (CNPMF-0731). Da mesma forma, Pol5662/22 apresentou posição intermediária exata na dispersão gráfica. Essa topologia intermediária, validada na prática por MENDOZA *et al.* (2022), é o indicador biológico mais relevante da hibridação bem-sucedida e da introgressão gênica, confirmando que as progênies carregam a herança combinada de produtividade e resistência.

Embora a análise de PCoA tenha explicado 42,0% da variação total nos dois primeiros eixos, os resultados foram robustos o suficiente para separar espacialmente os híbridos. Esse nível de variância é condizente com estudos em genomas complexos de bananeira. ARVAS *et al.* (2022) observaram que a abundância de regiões repetitivas e retrotransposons em *Musa* distribui a variância genética por múltiplos eixos da matriz. Portanto, valores moderados nos eixos principais não comprometem a análise quando há uma separação clara dos grupos biológicos. A integração de 56 bandas polimórficas (17 IRAP, 23 ISSR e 16 SSR) permitiu capturar a natureza dinâmica do genoma de *Musa*. Conforme destacado por MOGES *et al.* (2022), a alocação de híbridos em agrupamentos

distintos dos parentais confirma a eficácia da matriz integrada em assegurar a diversidade das progênies que avançarão para as etapas de campo.

Nem todos os genótipos avaliados apresentaram comportamento esperado de híbridos F1. O genótipo Pol008/22, por exemplo, apresentou maior proximidade com o parental feminino (distância de 0,69) e afastamento do masculino (0,91), sugerindo que possa ser fruto de apomixia ou autofecundação. Caso semelhante ocorreu com Pol0057, que pode ter sido produto de polinização aberta.

Esses resultados reforçam a necessidade de validação molecular rigorosa. Como destacado por CHRISTELOVÁ *et al.* (2017), a detecção precoce de "falsos híbridos" evita o desperdício de tempo e recursos em avaliações agronômicas de materiais sem ganho genético. Para esses casos duvidosos, o uso de painéis adicionais de SSR ou a transição para marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) proporcionaria uma resolução ainda mais refinada, como sugerido por BRITO *et al.* (2020) para a certificação de pureza genética.

Um aspecto particular observado foi o comportamento do cultivar ‘Grande Naine’, que se agrupou de forma distinta de ‘Williams’ e ‘Nanica’, apesar de pertencerem ao mesmo subgrupo Cavendish. Essa divergência pode ser atribuída ao acúmulo de mutações somáticas espontâneas, frequentes na propagação vegetativa e micropropagação da bananeira (LAKHANI *et al.*, 2010).

A sensibilidade dos marcadores integrados, especialmente ISSR e IRAP, em detectar alterações em regiões intergênicas e de retrotransposons, permitiu capturar essa variação intra-varietal. PEIXOTO *et al.* (2015) ressaltam que tais polimorfismos são comuns em coleções de germoplasma e refletem a evolução somaclonal, o que reforça a importância de utilizar marcadores moleculares para o monitoramento constante da fidelidade genética das cultivares comerciais.

A integração dos marcadores SSR, ISSR e IRAP atua como um rigoroso controle de qualidade para o PMGB. A combinação de marcadores codominantes (para paternidade) e dominantes (para diversidade) oferece uma cobertura genômica ampla, conforme defendido por NAIR e TEO (2017).

Essa estratégia de seleção assistida por marcadores (SAM) é apontada por SOARES *et al.* (2024) e NYINE *et al.* (2017) como o caminho mais promissor para reduzir o ciclo de seleção de novas variedades. Ao validar genótipos únicos e recombinantes como Pol5439 e Pol5662/22, o programa assegura que apenas materiais com real potencial de resistência à murcha de Fusarium e superioridade agronômica sigam para as onerosas etapas de validação em campo, otimizando a eficiência operacional e técnica da Embrapa.

5. CONCLUSÃO

A integração dos marcadores ISSR, IRAP e SSR validou com precisão os cruzamentos de *Musa* spp., confirmando a identidade híbrida dos genótipos Pol5439 e Pol5662/22. As análises de agrupamento (UPGMA) e ordenação (PCoA) demonstraram que, apesar da alta similaridade com o subgrupo Cavendish, os híbridos possuem distinção genética suficiente para identificação. A metodologia permitiu separar eficientemente diploides melhorados de cultivares comerciais, ampliando a base genética do programa. Estes materiais estão aptos para validação em campo e avaliação de resistência à murcha de Fusarium

6. REFERÊNCIAS

AGRITEMPO. **Sistema de Monitoramento Agrometeorológico**. Disponível em: http://www.agritempo.gov.br. Acesso em: jan. 2025.

AMORIM, E. P. et al. Genetic diversity of carotenoid-rich bananas evaluated by SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 2378-2385, 2011.

AMORIM, E. P. et al. Molecular diversity in Musa spp. germplasm. **Acta Horticulturae**, n. 986, p. 119-124, 2012.

AMORIM, T. B. **Bananicultura e a ameaça da Raça 4 Tropical (R4T).** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2023.

ARVAS, J. et al. Analysis of genetic diversity in banana using molecular markers. **Journal of Plant Science**, 2023.

BAUMEL, P. et al. Retrotransposon-based repetitive markers for plant genotyping: a new class of markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 6-7, p. 1185-1190, 2002.

BRITO, F. A. L. et al. Genetic diversity of the main banana genotypes cultivated in Brazil. **Bragantia**, Campinas, v. 79, n. 4, p. 517-527, 2020.

CAMPOS, J. S. et al. Improvement of diploid banana parents. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 20, n. 2, e293320215, 2020.

CHRISTELOVÁ, P. et al. Molecular characterization of the banana (Musa spp.) L. germplasm collection using SSR markers. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, p. 3013–3024, 2011.

CHRISTELOVÁ, P. et al. Molecular and cytological characterization of the global Musa germplasm collection provides insights into the treasure of banana diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 4, p. 801-824, 2017.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EMBRAPA. **A cultura da banana**. 3. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. (Coleção Plantar, 56).

EMBRAPA. **Produção Brasileira de Banana. Brasília: Embrapa**, 2024. Disponível em: https://www.embrapa.br. Acesso em: 2025.

EPAGRI. **Dados da bananicultura em Santa Catarina e no Brasil**. Florianópolis: Epagri/Cepa, 2021.

FERREIRA, C. F. **Melhoramento genético da bananeira**. In: FERREIRA, C. F. et al. (Ed.). O agronegócio da banana. Brasília: Embrapa, 2011.

FERREIRA, C. F. et al. **Protocolo para extração de DNA de bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2019. (Comunicado Técnico).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1998. 220 p.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1073-1084, 2007.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, v. 37, p. 547-579, 1901.

HIPPOLYTE, I. et al. Development of high-throughput SSR markers for banana (Musa spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, n. 6, p. 1067-1077, 2010.

JESUS, O. N. de et al. Genetic diversity and population structure of Musa accessions in ex situ conservation. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 41, 2013.

LAGODA, P. J. L. et al. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 657-666, 1998.

LAKHANI, H. N. et al. Somaclonal variation is a major problem in micropropagated banana: A comprehensive review. International **Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 4, p. 1-13, 2010.

LI, F. et al. Hybrid identification for Glycine max and Glycine soja with SSR markers and analysis of salt tolerance. **PeerJ**, v. 7, e6483, 2019. DOI: 10.7717/peerj.6483.

MENDOZA et al. Newly developed genomic SSR markers revealed the population structure and genetic diversity of abaca (*Musa textilis* Nee). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, art. 858820, 2022.

MOGES, A. et al. Genetic diversity analysis of banana (Musa spp.) utilizing SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 69, p. 1-15, 2022.

NAGAWADE, D. R. et al. Identification of SSR markers for hybridity and genetic purity testing of pearl millet [Pennisetum glaucum (L.) R. BR.] hybrid. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 8, n. 1, p. 239-243, 2017. DOI: 10.5958/0975-928X.2017.00034.5.

NAIR, A.; TEO, C. H. Molecular markers in Musa breeding and genetics. Banana Breeding: **Progress and Challenges**, p. 150-170, 2017.

PEIXOTO, M. da S. et al. Genetic diversity of banana germplasm. Genetics and Molecular Research, v. 14, p. 1234-1245, 2015.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: https://www.R-project.org/.

RAMOS, D. P. **Variação somaclonal em bananeira**. 2009. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

REIS, R. V. **Estratégias de melhoramento genético de bananeira**. 2017. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

RODRIGUES, F. A. et al. Somaclonal variation in micropropagated banana plants. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 41, n. 5, p. 745-752, 2006.

SILVA, S. O. e. **Melhoramento genético da bananeira: estratégias e resultados**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.

SU, M.; ZHANG, C.; FENG, S. Identification and genetic diversity analysis of hybrid offspring of azalea based on EST-SSR markers. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15239, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-18907-0.

TENKOUANO, A. (Ed.). **Banana Breeding: Progress and Challenges**. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 3-26.

TEO, C. H. et al. Retrotransposon-based markers: IRAP and REMAP in Musa spp. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, n. 1, p. 119-128, 2005.

TIWARI, A.; MISHRA, D. K. Application of SSR Markers for Purity Testing of Hybrid Wheat (Triticum aestivum L.). **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 31-40, 2020. DOI: 10.9734/irjpac/2020/v21i2230294.

VANDEGHEYNST, S. et al. Fusarium wilt in banana: Current knowledge and future perspectives. **Plant Pathology**, v. 72, p. 1-15, 2023.

CAPÍTULO II

GLICEROL COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA À MURCHA DE FUSARIUM (FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. CUBENSE) EM BANANEIRA ‘PRATA-ANÃ’: ANÁLISES HISTOLÓGICAS E EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

GLICEROL COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA À MURCHA DE FUSARIUM (*FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE*) EM BANANEIRA 'PRATA-ANÃ': ANÁLISES HISTOLÓGICAS E EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

RESUMO: A murcha de Fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), representa a principal ameaça fitossanitária à bananicultura mundial. No Brasil, a cultivar 'Prata-Anã', de grande importância socioeconômica, é altamente suscetível à doença. Diante da necessidade de estratégias de controle sustentáveis, o presente trabalho avaliou o potencial do glicerol aplicado via pulverização foliar como possível indutor de resistência sistêmica em bananeira 'Prata-Anã' contra o Foc raça subtropical 4 (STR4). Mudas foram submetidas a tratamentos com soluções de glicerol a 0%, 3% e 5%, inoculadas no substrato com o patógeno e avaliadas quanto à severidade da doença, respostas histopatológicas e perfil de expressão gênica em raízes (24, 48 e 72 horas após inoculação - HAI) por meio de RT-qPCR. Os resultados demonstraram uma redução significativa na severidade da murcha, com o Índice de McKinney caindo de 78% (controle inoculado) para 46% (glicerol 3%) e 54% (glicerol 5%). Análises histoquímicas e histopatológicas revelaram que o glicerol, especialmente a 3%, antecipou e intensificou a deposição de barreiras de defesa nas raízes, como compostos fenólicos e calose, principalmente nas regiões da endoderme e ao redor dos feixes vasculares, indicando um eficiente *priming* (condicionamento) fisiológico. O perfil de expressão gênica elucidou os mecanismos moleculares subjacentes. O glicerol a 3% induziu uma resposta coordenada e sequencial: ativação precoce da via do ácido salicílico (gene PR1), seguida pela indução tardia de genes de reforço estrutural da parede celular (CALS3 para calose e PI206, uma proteína dirigente de lignificação). Em contraste, o glicerol a 5% desencadeou inicialmente uma resposta de estresse abiótico, que reprimiu essas defesas, seguida por uma ativação tardia e potente, porém menos coordenada, da via do ácido jasmônico (gene LOX) e de quitinases (CHI). Conclui-se que a pulverização foliar com glicerol a 3% atua como um "elicitor" eficaz de resistência sistêmica, promovendo um estado de *priming* que coordena defesas químicas e estruturais nas raízes, resultando na supressão da doença. Esse composto apresenta-se, portanto, como uma alternativa sustentável e promissora para integração em programas de manejo integrado da murcha de Fusarium na bananicultura.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*; Indução de Resistência; G3P, Expressão Gênica; *Musa* spp.

GLYCEROL AS AN INDUCER OF RESISTANCE TO FUSARIUM WILT (FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. CUBENSE) IN ‘PRATA-ANÃ’ BANANA PLANTS: HISTOLOGICAL ANALYSES AND GENE EXPRESSION BY RT-QPCR

ABSTRACT: Fusarium wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) represents the main phytosanitary threat to global banana production. In Brazil, the 'Prata-Anã' cultivar, of great socioeconomic importance, is highly susceptible to the disease. Given the need for sustainable control strategies this study evaluated the potential of glycerol applied via foliar spraying as a systemic resistance inducer in 'Prata-Anã' banana plants against Foc subtropical race 4 (STR4). Seedlings were treated with 0%, 3% and 5% glycerol solutions, inoculated in the substrate with the pathogen, and assessed for disease severity, histopathological responses, and gene expression profiles in roots (24, 48, and 72 hours after inoculation - HAI) using RT-qPCR. The results demonstrated a significant reduction in wilt severity, with the McKinney Index decreasing from 78% (inoculated control) to 46% (3% glycerol) and 54% (5% glycerol). Histochemical and histopathological analyses revealed that glycerol, especially at 3%, accelerated and intensified the deposition of defense barriers in the roots, such as phenolic compounds and callose, particularly in the endodermis and around vascular bundles indicating efficient physiological priming. The gene expression profile elucidated the underlying molecular mechanisms. Glycerol at 3% induced a coordinated and sequential response: early activation of the salicylic acid pathway (PR1 gene), followed by late induction of genes related to structural reinforcement of the cell wall (CALS3 for callose and PI206, a key protein involved in lignification). In contrast, glycerol at 5% initially triggered an abiotic stress response which repressed these defenses, followed by a late and potent yet less coordinated activation of the jasmonic acid pathway (LOX gene) and chitinases (CHI). It is concluded that foliar spraying with 3% glycerol acts as an effective elicitor of systemic resistance, promoting a priming state that coordinates chemical and structural defenses in the roots resulting in disease suppression. This compound thus presents itself as a sustainable and promising alternative for integration into integrated management programs for Fusarium wilt in banana cultivation.

Keywords: *Fusarium oxysporum*; Resistance Induction; G3P; Gene Expression; Musa spp.

1. INTRODUÇÃO

A bananicultura brasileira enfrenta um desafio fitossanitário persistente e de grande magnitude econômica: a murcha de Fusarium, causada pelo fungo habitante do solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). No Brasil, a cultivar 'Prata-Anã' (grupo genômico AAB) desempenha um papel central na cadeia produtiva da fruta, sendo responsável por grande parte da renda de pequenos e médios produtores e detendo a preferência nacional de consumo (LICHTEMBERG, 2011; DITA et al., 2018). O subgrupo Prata domina o mercado interno devido à sua maior durabilidade pós-colheita e sabor apreciado pelo brasileiro (SILVA et al., 2008; LICHTEMBERG, 2010), contudo, a vulnerabilidade desta cultivar a diferentes raças do patógeno exige uma distinção clara para o manejo e o melhoramento genético.

Historicamente, o controle da doença focou na Raça 1 (R1), à qual cultivares do grupo Cavendish (como Williams e Nanica) apresentam resistência, mas que ainda impõe a necessidade de busca por híbridos resistentes em outros subgrupos (Ferreira, 2011; SILVA, 2013). No cenário contemporâneo, embora a Raça Tropical 4 (TR4) seja a principal ameaça à bananicultura mundial de exportação, ela permanece como uma praga quarentenária ausente em áreas comerciais no país. Em contrapartida, a cultivar 'Prata-Anã' no Brasil sofre perdas severas causadas pela Raça 4 Subtropical (STR4), que já está presente e adaptada às condições subtropicais e tropicais brasileiras (PLOETZ, 2015).

Portanto, a escolha de um isolado STR4 para este estudo é fundamental para mimetizar o cenário real de desafio fitossanitário enfrentado pelos produtores nacionais. Essa especificidade, somada à capacidade do fungo de produzir clamidósporos (estruturas de resistência que sobrevivem no solo por década), torna o manejo da doença extremamente complexo, evidenciando que as estratégias convencionais de controle são limitadas e reforçando a urgência de abordagens integrativas que unam o melhoramento genético à indução de resistência (DITA et al., 2018; NOVAES et al., 2024).

O uso de fungicidas sistêmicos ou de contato é um manejo economicamente inviável em grandes áreas, além de apresentar baixa eficiência curativa devido à localização vascular do patógeno, podendo gerar impactos ambientais negativos (PLOETZ, 2015). Por outro lado, a obtenção de variedades resistentes a Foc via melhoramento genético, embora considerada a solução ideal, enfrenta barreiras

intrínsecas à cultura, como a esterilidade feminina e a poliploidia. Esses fatores resultam em um processo complexo e moroso para o desenvolvimento de novas cultivares que reúnam resistência e as características sensoriais exigidas pelo mercado (SILVA et al., 2013; ORTIZ; SWENNEN, 2014; AMORIM et al., 2016).

Diante desse cenário, a adoção do manejo integrado consolida-se como uma estratégia indispensável, uma vez que o enfrentamento da murcha de Fusarium exige táticas combinadas que superem as limitações de métodos isolados. A busca por soluções alternativas que possam ser integradas ao manejo da 'Prata-Anã' é urgente, com destaque para a indução de resistência. Esta técnica baseia-se no estímulo do sistema imune vegetal através da aplicação prévia de elicitores, sejam eles bióticos ou abióticos, visando ativar mecanismos de defesa latentes e preparar a planta para responder de forma mais eficiente a uma infecção subsequente. Esse “estado de alerta”, conhecido como *priming*, permite que a planta responda de maneira mais rápida e robusta ao ataque através da expressão antecipada de genes de defesa, síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e reforço de barreiras estruturais, como a deposição de calose e compostos fenólicos (CONRATH, 2011; ZENG et al., 2024).

Nesse contexto de manejo integrado, o glicerol surge como uma molécula candidata inovadora e sustentável. Como um subproduto abundante da indústria de biodiesel, seu uso como indutor de resistência sistêmica alinha-se aos princípios da economia circular e oferece um baixo custo operacional (NOVAES et al., 2024). A integração desta ferramenta ao Programa de Melhoramento Genético da Bananeira (PMGB) permite uma abordagem em duas frentes: a certificação molecular precoce de novos híbridos resistentes às raças R1 e STR4 e, simultaneamente, o fortalecimento imunológico de variedades comerciais já estabelecidas. Assim, o manejo integrado não apenas otimiza a produtividade, mas também garante a sustentabilidade da bananicultura frente à constante evolução das raças do patógeno (DITA et al., 2018; ZAKARIA et al., 2024).

Nesse contexto, o glicerol ($C_3H_8O_3$) surge como uma molécula candidata inovadora e sustentável. Subproduto abundante da indústria de biodiesel, setor em expansão no Brasil, o glicerol tem sido historicamente tratado como um resíduo excedente. No entanto, pesquisas recentes reposicionaram essa molécula como um potente regulador metabólico e indutor de defesa em plantas (NOVAIS et al., 2024). A

justificativa para o uso do glicerol no patossistema bananeira-Fusarium fundamenta-se em três mecanismos fisiológicos e bioquímicos principais descritos na literatura recente (NOVAIS et al., 2024).

Primeiramente, o glicerol exógeno, ao ser absorvido pela planta, é metabolizado e convertido em Glicerol-3-Fosfato (G3P). Trabalhos de referência demonstraram que o G3P é uma molécula sinalizadora crítica para a imunidade sistêmica em plantas (KACHROO, 2009; CHANDA et al., 2011). Níveis elevados de G3P estão associados à regulação negativa dos níveis de ácido oleico (18:1); um ácido graxo que reprime a expressão de genes de defesa dependentes da via do ácido salicílico (SA) (KACHROO, 2009; CHANDA et al., 2011). Portanto, a hipótese central é que a aplicação de glicerol em bananeira, aumente o pool de G3P, desbloqueando as vias de defesa e permitindo a ativação de genes marcadores como *PR-1* e *Chitinases*.

Em segundo ponto, o glicerol atua na homeostase redox e osmótica. A sua aplicação pode induzir um estresse osmótico leve e controlado, suficiente para disparar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como sinalizadores, sem causar dano oxidativo severo (Novaes et al. 2024). Esse estresse ativa a maquinaria de defesa basal, preparando a planta para resistir a estresses subsequentes, tanto bióticos quanto abióticos (LI et al., 2022).

Além do efeito indutor, o glicerol possui propriedades higroscópicas que exercem ação direta sobre o patógeno. A alteração do potencial osmótico na rizosfera e nos tecidos vegetais compromete a turgidez dos esporos de *Fusarium*, inibindo sua germinação e o desenvolvimento do tubo germinativo (TRIVUNOVIĆ et al., 2022). Essa dupla atividade (antifúngica direta e elicitora indireta) qualifica o glicerol como um insumo promissor para o manejo integrado da cultura (NOVAES et al., 2024).

Embora a indução de resistência via glicerol-3-fosfato (G3P) esteja documentada em plantas modelo como *Arabidopsis* (CHANDA et al., 2011) e em culturas anuais como trigo (YU et al., 2016) e tomate (NOVAES et al., 2024), faltam registros na literatura sobre sua eficácia na interação específica entre bananeira e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. A validação desta técnica converte um passivo ambiental da indústria de biodiesel em um insumo de baixo custo e alta eficiência (MANDAL et al., 2021).

Assim, este estudo objetivou avaliar o potencial do glicerol no controle de Foc em bananeiras, visando mitigar os impactos da fusariose e promover práticas agrícolas sustentáveis na bananicultura.

A utilização do glicerol como possível indutor de resistência e agente antimicrobiano representa uma abordagem inovadora que pode contribuir significativamente para a sustentabilidade ambiental e a viabilidade econômica da cadeia produtiva da bananeira dado ao seu modo de uso e seu baixo custo. Além disso, ao explorar o potencial desse composto, esse trabalho abre caminho para futuras pesquisas sobre o uso de subprodutos industriais na agricultura, promovendo uma integração entre diferentes setores econômicos e melhor proteção do meio ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de Cultivo

O experimento foi conduzido utilizando mudas de bananeira (*Musa* spp.) da cultivar 'Prata-Anã' (AAB), provenientes de micropropagação e devidamente aclimatadas. As plantas com cerca de 15 cm e 30-40 dias foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para dois litros, preenchidos com substrato comercial à base de fibra de coco esterilizada (Golden Mix®, Amafibra, Grupo Sococo), e mantidas em casa de vegetação sob condições controladas de irrigação e temperatura.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), constituído por quatro tratamentos: T1 (Controle absoluto), que consistiu na incorporação de arroz autoclavado não colonizado ao substrato e aplicação de água destilada via foliar; T2 (Água), com inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) via arroz colonizado, seguida de pulverização foliar com água destilada; T3, com inoculação de Foc e pulverização com glicerol a 3%; e T4, com inoculação de Foc e pulverização com glicerol a 5%. Para as análises moleculares e histológicas, que demandam coleta destrutiva de raízes, foram utilizadas 12 repetições por tratamento, enquanto 10 plantas adicionais por tratamento foram mantidas exclusivamente para a avaliação final da sintomatologia interna e externa, totalizando 88 unidades experimentais.

2.2. Preparo do inóculo CNPMF 218 subtropical Raça 4 (STR4)

Para a infestação do substrato, utilizou-se o isolado monospórico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (CNPMF 218) obtido da Coleção Biológica de Microrganismos da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA). O fungo foi inicialmente reativado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA: 200 g L^{-1} de batata, 20 g L^{-1} de dextrose e 20 g L^{-1} de ágar), incubadas em câmara de crescimento do tipo B.O.D. a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias.

A produção do inóculo foi realizada via colonização em arroz. Para tanto, preparou-se uma suspensão inicial de 1×10^6 conídios mL^{-1}, ajustada em câmara de Neubauer após adição de água deionizada estéril e raspagem superficial das colônias. Alíquotas de 10 mL desta suspensão foram inoculadas em sacos de polipropileno contendo 500 g de arroz (previamente lavado e autoclavado a 120 °C por 20 min). O material foi incubado a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 15 dias, sendo revolvido manualmente a cada 48 h para garantir a homogeneidade da colonização.

A padronização do inóculo nos grãos foi realizada por diluição seriada e contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Suspendeu-se 1 g de arroz colonizado em 9 mL de água deionizada estéril, seguido de diluições sucessivas até a determinação da concentração de 1×10^6 UFC g^{-1}. Confirmada a densidade de propágulos, as unidades experimentais foram infestadas mediante a incorporação de 40 g do arroz colonizado ao substrato, com distribuição uniforme próxima ao sistema radicular das plantas.

2.3 Aplicações do glicerol em bananeira ‘Prata-Anã’

As soluções indutoras foram preparadas a partir da diluição de glicerol P.A. (99,5%) em água deionizada, ajustando-se para as concentrações finais de 3% e 5% (v/v). A aplicação foi realizada via pulverização foliar, com auxílio de um pulverizador manual, padronizando-se o volume de 5 mL de calda por planta.

O procedimento foi conduzido de modo a assegurar o molhamento uniforme de toda a superfície foliar, abrangendo as faces adaxial e abaxial, até o ponto de escorrimento. O protocolo de indução consistiu em três aplicações consecutivas, com intervalo de 48 horas entre elas, visando favorecer a absorção gradual do composto e minimizar potenciais efeitos fitotóxicos. As plantas do tratamento controlem foram

submetidas ao mesmo regime, recebendo pulverização apenas com água deionizada, a fim de isolar os efeitos físicos da aspersão.

2.4. Coleta e preservação do material

As coletas de tecidos radiculares foram realizadas nos tempos 0 (pré-inoculação), 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) para monitoramento da interação planta-patógeno. Uma coleta adicional foi realizada aos 90 dias para avaliação de sintomas internos e confirmação da infecção. Em cada intervalo, as raízes foram lavadas em água destilada, selecionando-se tecidos íntegros que foram seccionados em fragmentos de 1 cm.

As amostras destinadas à expressão gênica foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (N-), envoltas em papel alumínio e armazenadas a -80 °C. Para as análises histológicas, os fragmentos foram imersos em solução fixadora de Karnovsky modificada [1% de glutaraldeído, 4% de formaldeído e $0{,}1M$de $CaCl_2$em tampão cacodilato de sódio $0{,}2M$ (pH 7,2)] por 48 horas a 4 °C.

2.5. Análise histoquímica

Após a fixação, o material foi desidratado em série etanólica crescente (30 a 100%), com intervalos de três horas, e incluído em historesina (Historesin Kit, Leica Heidelberg, Alemanha). Cortes de $8\mu m$ foram obtidos em micrótomo rotativo (Leitz, Modelo 1516) e montados em lâminas histológicas.

Para detecção de compostos fenólicos, as lâminas foram coradas com cloreto férrico ($FeCl_3$) por três horas. A identificação de calose e constituintes da parede celular foi realizada com Calcofluor White a 0,01%. As seções foram analisadas e documentadas em microscópio de epifluorescência BxS1 (Olympus).

A colonização fúngica foi caracterizada via clareamento e coloração (adaptado de PHILLIPS; HAYMAN, 1970). Os fragmentos foram clareados em KOH a 10% por 48 horas e acidificados em HCl a 1% por 30 minutos. As estruturas fúngicas foram coradas com Azul de Tripan a 0,05% (em solução de ácido lático, glicerol e água, 2:1:1) por uma hora. As amostras foram analisadas e microfotografadas em microscópio de campo claro.

2.6. Extração total de RNA e expressão gênica

O RNA total das amostras radiculares foi extraído a partir de tecido macerado em nitrogênio líquido, utilizando o método CTAB com modificações descritas por Ferreira et al. (2019). A integridade e a concentração das amostras foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TAE 1x (Tris, ácido acético glacial e água deionizada), sendo os géis fotodocumentados.

Após a extração, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C. Para a eliminação de DNA genômico residual, o RNA total foi tratado com o kit TURBO DNA-free™ (Ambion®), seguindo as instruções do fabricante

A síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems).. A transcrição reversa foi conduzida em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) com incubação a 37 °C por 60 minutos, seguida de inativação enzimática a 95 °C por 5 minutos e resfriamento a 4 °C. Os CDNAs foram armazenados a -20 °C.

Para a análise de expressão gênica via RT-qPCR, foram selecionados genes-alvo previamente descritos na literatura como responsivos a vias de sinalização e defesa na interação planta-patógeno, além de dois genes de referência de *Musa* spp. para normalização dos dados (Tabela 1).

Tabela 1- Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica na interação Prata Anã spp. x *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*

ID	Gene	Descrição	Sequência	Amplicon	Referência
GSMUA_Achr 3T093 60_001	TRAD	Transduçãode sinais	**F:**CAACCTCCCCCATCAA **R:**TTGCTGCGCGCTGTGT	128	Costa, 2013
GSMUA_Achr 1G15040_001	CALS3	Callose Synthase 3	**F:**CACCGAGAACATGTGTGTGA **R:**GTGCTCAGGCTCCTCAGAG	80	Castañeda NEN et al., 2017
GSMUA_Achr 8T15700_001	PI206	Putative Disease resistance response protein 206	**F:**AGTACAACGGGAGCAGCTTC **R:**GATGAGCCTGCTGATGGTGT	128	Costa, 2013

XM_009417035.2	PR1	Pathogenesis-related proteins 1	**F:**AGTTATGGACGAGCTACCCG **R:**GTAGCTGAAGTACTTCCCCTC	77	Costa, 2013
XM_008803483.2	LOX	Lipoxygenases	**F:**ACGATGCAGACGGTATTGGAGT **R:**GGTACTGTCCGAAGTTGACG	94	Costa, 2013
XM_009415745.2	CHI	Chitinase	**F**:TACTGGAACTACAACTACGGAGC **R:**CGTTCTGCTCGAGGTACTC	82	Costa, 2013
GSMUA_Achr11T00590_001	PIP2-3	Aquaporin PIP2-3	**F:**CTTCGTCCTCGTCTACACCG **R:**TCGCCAAGTGGACCATGAAA	122	Costa, 2013
GSMUA_AchrUn_randomT09050_001	RPS2*	Ribosomal protein S	**F:**TAGGGATTCCGACGATTTGTTT **R:**AGCGTCATCATTGGCTGGGAT	84	Zhang et al., 2017

*Genes de referência em *Musa* spp.

As reações de amplificação foram conduzidas no sistema *ABI 7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), em volume final de 10 µL contendo: 1 µL de cDNA (diluição 1:100), 0,3 µL de cada iniciador (*primer*) a 0,3 µM, 5 µL de *SYBR® Select Master Mix* e 3,4 µL de água livre de nucleases. As condições de ciclagem consistiram em 50 °C por 2 min e 95 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s, com aquisição de fluorescência ao final da extensão. A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada pela análise da curva de dissociação (*melting curve*) entre 72 e 95 °C. Foram realizadas três réplicas biológicas e três técnicas para cada gene, utilizando as amostras do tempo 0 H (pré-inoculação) como calibrador basal.

2.6.1. Processamento e Normalização dos Dados

A quantificação inicial baseou-se nos valores brutos do Ciclo de Quantificação (*Quantification Cycle* - Cq) obtidos para os genes-alvo (*TRAD, PR1, CHI, PIP2-3, CALS3, PI206, AUX* e *LOX*) e para o gene de referência *RPS2*, selecionado devido à sua estabilidade constitutiva nas condições experimentais avaliadas. A primeira etapa de normalização consistiu no cálculo do ΔCq para cada amostra biológica, subtraindo-se o Cq do gene normalizador do Cq do gene-alvo (ΔCq = Cq alvo - Cq ref); procedimento que corrige variações técnicas inerentes à eficiência da extração de RNA e da transcrição reversa.

Para a determinação da expressão relativa, aplicou-se o método matemático comparativo $2^{-}\Delta\Delta Cq$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), estabelecendo-se as amostras do grupo "Controle" (Tempo 0 h) como calibrador biológico. O valor de ΔΔCq foi obtido

subtraindo-se a média aritmética dos ΔCq do grupo calibrador do valor de ΔCq de cada réplica experimental. Subsequentemente, os dados de *Fold Change* foram transformados para a escala logarítmica de base 2 ($Log_2FC = -\Delta\Delta Cq$). Essa transformação é adotada para linearizar a escala de variação, permitindo uma comparação proporcional entre genes induzidos (*up-regulated*) e reprimidos (*down-regulated*) (Quackenbush, 2002).

2.6.2. Representação Gráfica dos Perfis de Expressão Individual

O processamento dos dados e a elaboração das representações gráficas foram realizados na linguagem de programação Python (versão 3.10). Utilizaram-se as bibliotecas Pandas para manipulação dos dados e Seaborn em conjunto com Matplotlib para a confecção dos gráficos. As figuras apresentam a média da expressão relativa (Log2FC) acrescida do Erro Padrão da Média (± EPM) para os tratamentos (Água, Glicerol 3% e Glicerol 5%) ao longo das horas após a inoculação (24, 48 e 72 h).

2.7. Análise de Sintomas

A avaliação da sintomatologia interna da murcha de Fusarium foi realizada aos 90 dias após a inoculação, utilizando-se as 10 plantas adicionais reservadas para cada tratamento (n=40). Os rizomas foram seccionados transversalmente e a severidade da doença foi quantificada com base na escala de notas para sintomas internos proposta por Dita et al. (2018), que varia de 1 (rizoma sadio, sem descoloração) a 5 (descoloração vascular total ou morte da planta). A partir das notas atribuídas, foram calculados os índices fitopatológicos: incidência (percentual de plantas sintomáticas), severidade média

O processamento de dados e as análises estatísticas foram realizados em Python, utilizando as bibliotecas Pandas, SciPy e Seaborn. Após verificação da não normalidade (Shapiro-Wilk), aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), seguido do teste post-hoc de Mann-Whitney U com correção de Bonferroni. A visualização dos dados inclui gráficos de barras para o Índice de McKinney e mapas de calor (*heatmaps*) para a distribuição de frequências.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização histopatológica e bioquímica

A análise histopatológica qualitativa das raízes, realizada por meio da técnica de clareamento e coloração com Azul de Tripan, permitiu monitorar a colonização de

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (Foc) nos tecidos da cultivar 'Prata-Anã' ao longo de 72 horas. No tratamento Controle Absoluto (T1), observou-se a preservação da integridade anatômica dos tecidos radiculares e a total ausência de estruturas fúngicas coradas, validando a eficácia do protocolo de assepsia e a sanidade do material vegetal utilizado (Figura 1A-J).

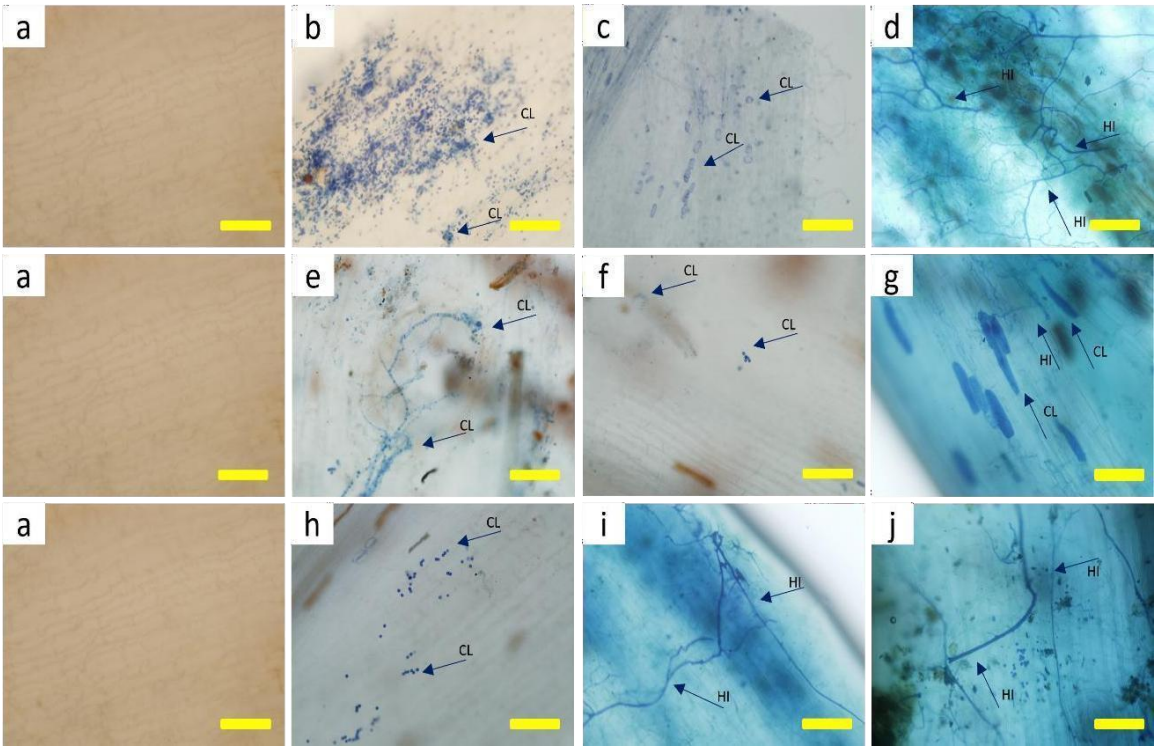


Figura 1 (A-J). Micrografias transversais de raízes da cultivar de bananeira 'Prata Anã'. Colonização radicular de plantas inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), observada em diferentes tempos após a inoculação (24, 48 e 72 horas após a inoculação – HAI). A) Controle (sem inoculação); B, C e D) Plantas tratadas com água destilada e inoculadas com Foc (24H, 48H e 72H, respectivamente); E, F e G) Plantas tratadas com glicerol 3% e inoculadas com Foc (24H, 48H e 72H, respectivamente); H, I e J) Plantas tratadas com glicerol 5% e inoculadas com Foc (24H, 48H e 72H, respectivamente). A coloração azul indica estruturas fúngicas coradas com azul de Tripan. Barra de escala = 200 µm. As setas azul-escuro indicam aparecimento de HI: Hifas e CL: Clamidósporos.

Nos tratamentos submetidos à inoculação, a presença do patógeno foi confirmada em todos os períodos avaliados, validando a eficácia do método de infestação. No tratamento Água (T2), observou-se uma rápida progressão da colonização fúngica. Às 24 HAI (Painel B), a infecção caracterizou-se predominantemente pela presença de clamidósporos aderidos à superfície epidérmica e nas camadas mais externas do córtex. Com o avanço para 48 e 72 HAI (Painéis C e D), a colonização tornou-se mais extensa, evidenciada por uma rede densa de hifas ramificadas progredindo através do parênquima

cortical em direção ao cilindro vascular. Esse padrão de desenvolvimento indica o estabelecimento efetivo do patógeno nos tecidos radiculares do hospedeiro

Padrão de colonização semelhante foi observado nos tratamentos que receberam aplicação de glicerol. Nas raízes tratadas com Glicerol 3% (T3; E, F, G) e Glicerol 5% (T4; H, I, J), detectou-se a presença de estruturas fúngicas dispersas nas primeiras 24 horas. Nos tempos subsequentes (48 e 72 HAI), observou-se o desenvolvimento micelial percorrendo o tecido radicular longitudinalmente. A comparação visual qualitativa entre os tratamentos indicou que a aplicação de glicerol, nas concentrações testadas, não impediu a penetração e o estabelecimento inicial das hifas de Fusarium até às 72 horas após a inoculação, uma vez que a densidade de estruturas fúngicas coradas em azul nos tecidos vasculares e corticais mostrou-se visualmente comparável à do controle inoculado.

A análise histoquímica de cortes transversais das raízes evidenciou a deposição diferencial de compostos fenólicos, caracterizada pela coloração marrom-avermelhado nos tecidos em resposta aos diferentes tratamentos. No controle absoluto (T1), a estrutura radicular apresentou organização anatômica preservada e coloração basal discreta, indicando a ausência de indução significativa de defesa ou oxidação tecidual (Figura 2A).

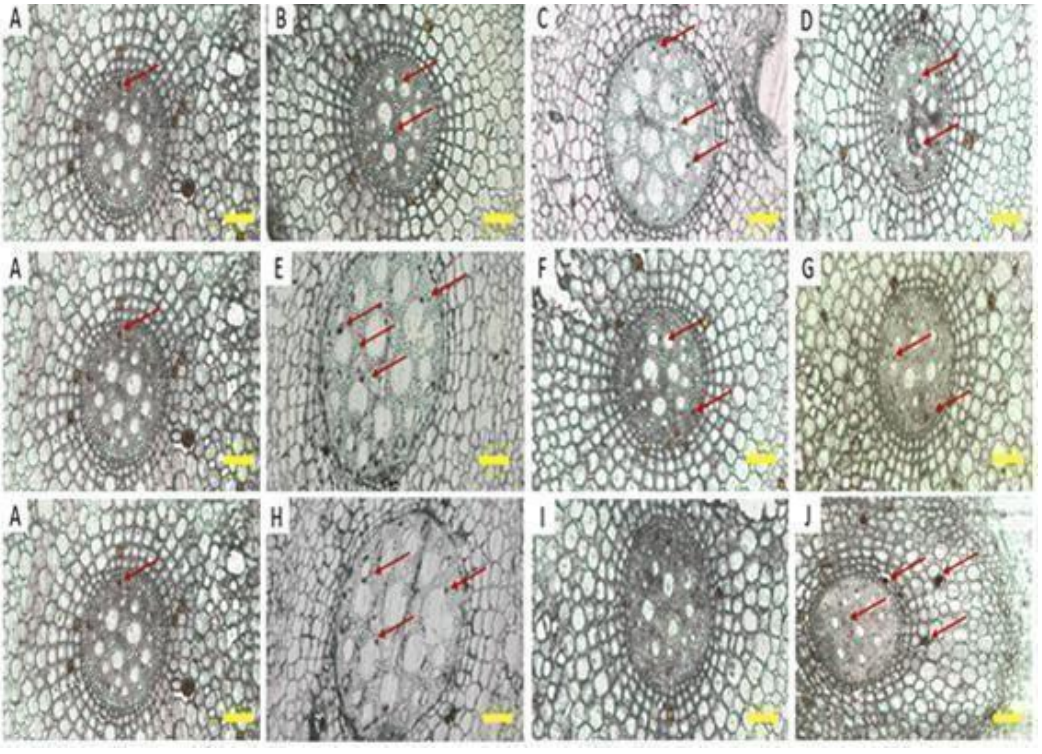


Figura 2. Micrografias transversais de raízes da cultivar de bananeira ‘Prata Anã’. As setas vermelhas indicam seções com acúmulo de compostos fenólicos observada em diferentes tempos após a inoculação (24, 48 e 72 horas após a inoculação – HAI). A) Controle Absoluto (sem inoculação); B, C e D) Plantas tratadas com água destilada e inoculadas com Foc seria interessante colocar qual a raça, nessa figura e nas outras (24H, 48H e 72H, respectivamente); E, F e G) Plantas tratadas com glicerol 3% e inoculadas com Foc (24H, 48H e 72H, respectivamente); H, I e J) Plantas tratadas com glicerol 5% e inoculadas com Foc (24H, 48H e 72H, respectivamente). Barra de escala = 200 µm.

Nas plantas do controle inoculado (T2), submetidas apenas à inoculação com Foc, observou-se um aumento gradual na intensidade da coloração ao longo do tempo. Aos 24 HAI (Painel B), a deposição de fenóis foi incipiente, tornando-se mais evidente aos 48 HAI (Painel C) e atingindo maior intensidade aos 72 HAI (Painel D), com acúmulo preferencial nas células do parênquima cortical adjacentes ao cilindro vascular e na endoderme.

Nos tratamentos que receberam aplicação de glicerol, o padrão de deposição foi alterado. Nas raízes tratadas com Glicerol 3% (T3), observou-se uma marcação histoquímica intensa já às 24 HAI (Painel E), superior à observada no controle inoculado no mesmo período. Essa intensidade manteve-se elevada até as 48 HAI (Painel F) e 72 HAI (Painel G), com ampla distribuição no córtex. O tratamento com Glicerol 5% (T4) resultou na resposta visual mais acentuada entre todos os grupos, apresentando forte coloração acastanhada desde às 24 HAI (Painel H), que persistiu de forma difusa e intensa pelos tecidos radiculares até as 72 HAI (Painéis I e J).

A análise histoquímica das seções transversais permitiu identificar a deposição de calose, evidenciada pela fluorescência azul-brilhante intensa em contraste com a autofluorescência basal do tecido (Figura 3). No Controle Absoluto (T1), observou-se apenas a fluorescência constitutiva (fisiológica), restrita às placas crivadas do floema e elementos vasculares, indicando níveis normais de desenvolvimento sem indução por estresse (Figura 3A).

Nas plantas inoculadas com Foc, houve nítida indução de calose, caracterizada por depósitos pontuais (setas brancas) distribuídos no parênquima cortical e endoderme. Nas plantas tratadas apenas com água (Figura 3B-D), a deposição foi verificada de forma discreta ao longo das 24, 48 e 72 HAI, sugerindo uma resposta defensiva tardia ou insuficiente para conter o avanço do patógeno.

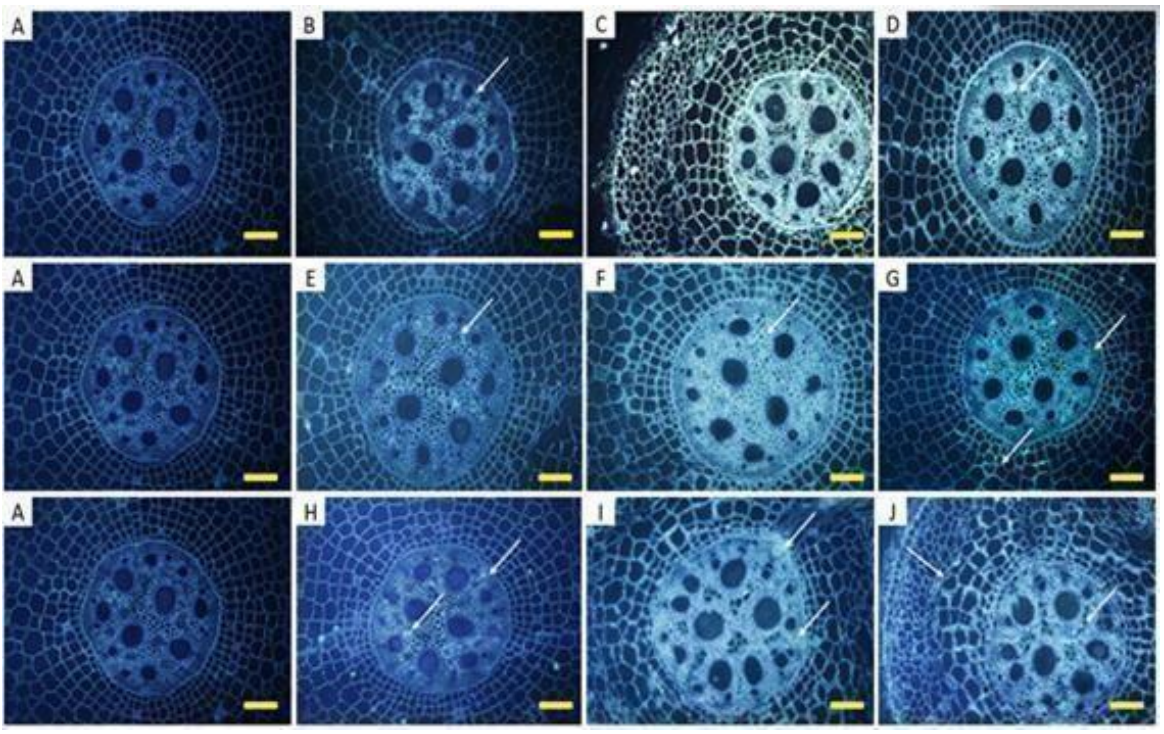


Figura 3. Micrografias transversais de raízes da cultivar de bananeira 'Prata Anã' avaliando a deposição de calose em resposta à inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Observações realizadas em diferentes tempos após a inoculação (24, 48 e 72 horas após a inoculação – HAI). A**)** Controle (sem inoculação); B, C e D) Plantas tratadas com água destilada e inoculadas com Foc (24H, 48H e 72H, respectivamente); E, F e G) Plantas tratadas com glicerol 3% e inoculadas com Foc (24H, 48H e 72H, respectivamente); H, I e J) Plantas tratadas com glicerol 5% e inoculadas com Foc (24H, 48H e 72H, respectivamente). As setas brancas indicam os sítios de deposição de calose (fluorescência).

Em contraste, os tratamentos com glicerol promoveram uma alteração visível no padrão de deposição. Tanto na concentração de 3% (Fig. 3 E-G) quanto de 5% (Fig. 3H-J), notou-se um aumento na intensidade da fluorescência e na frequência de células com acúmulo de calose, comparativamente ao tratamento com água. A deposição ocorreu predominantemente nas células do parênquima cortical e nas regiões adjacentes à endoderme.

3.2. Análise de Sintomas

A avaliação dos sintomas internos da murcha de Fusarium, realizada aos 90 dias após a inoculação, confirmou a patogenicidade do isolado e a validação do ensaio experimental. As plantas do grupo Controle Absoluto permaneceram assintomáticas, apresentando médias de incidência e severidade nulas, diferindo estatisticamente de todos os tratamentos inoculados ($p < 0,001$). Nos grupos submetidos à inoculação, a incidência da doença foi de 100%, caracterizada pela descoloração vascular típica no rizoma (Figura

9), indicando que a aplicação dos tratamentos não impediu a penetração e infecção inicial (Tabela 2).

Tabela 2. Índices fitopatológicos de Incidência (%), Severidade Média e Índice de McKinney da Murcha de Fusarium em bananeira 'Prata-Anã' submetida a diferentes tratamentos, avaliados aos 90 dias após a inoculação.

Tratamento	Incidência (%)	Severidade Média	Índice McKinney (%)
Água	100.0	3,90 ± 0,32 a	78,0
Glicerol 3%	100.0	2,30 ± 0,82 b	46,0
Glicerol 5%	100.0	2,70 ± 0,82 b	54,0
Controle	0.0	0.0 ± 0,00	0.0

(1) Média ± Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (HSD) a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) ;(2) Índice de McKinney calculado pela fórmula: IM (%) = [Σ (nota x frequência) / (n total x nota máxima)] x 100.

A Análise de Variância (ANOVA) confirmou a existência de diferenças significativas entre os grupos experimentais ($F(3,36) = 73,17$; $p < 0,001$). O desdobramento das médias pelo teste de Tukey HSD (Tabela 2) permitiu a estratificação dos tratamentos em classes estatísticas distintas. O tratamento com Água (Controle Inoculado) isolou-se no grupo 'a', apresentando médias de severidade estatisticamente superiores às observadas nos demais tratamentos, o que confirma a agressividade do patógeno na ausência de controle.

No entanto, a intensidade da colonização vascular variou significativamente em função do tratamento aplicado. Enquanto o grupo tratado apenas com água apresentou a maior agressividade da doença (Índice de McKinney de 78,0%), a aplicação de glicerol resultou na atenuação visível dos sintomas (Figura 4). As concentrações de Glicerol 3% e 5% formaram um grupo homogêneo ('b'), indicando que não houve diferença estatística entre as doses, mas que ambas foram eficazes em reduzir a intensidade da doença. Em termos quantitativos, essa supressão representou um decréscimo na severidade média de aproximadamente 1,6 pontos para a dose de 3% e 1,2 pontos para a dose de 5% na escala de avaliação.

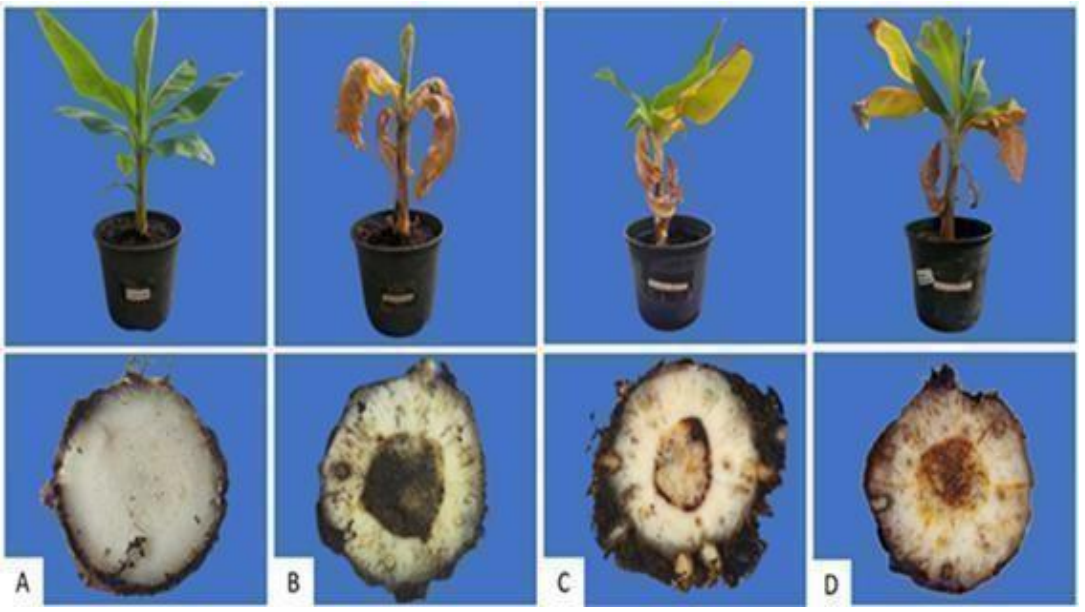


Figura 4 Aspecto visual da parte aérea (linha superior) e sintomas internos no rizoma (linha inferior) de bananeiras aos 90 dias após a inoculação. **(A)** Controle Absoluto (plantas sadias); **(B)** Controle Inoculado (tratado com Água), **(C)** Tratamento com Glicerol 3%; **(D)** Tratamento com Glicerol 5%.

3.3. Análise de Expressão Gênica

A especificidade dos iniciadores utilizados para a análise de expressão via RT-qPCR foi confirmada pela análise das curvas de dissociação (*melting curves*). Para todos os genes avaliados (*RPS2*, *CHI*, *TRAD*, *LOX*, *PR1*, *AUX*, *PIP2-3*, *PI206* e *CALS3*), observou-se a presença de um pico único e bem definido de fluorescência (Figura 5), indicando a amplificação exclusiva dos amplicons-alvo e a ausência de dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos. Esse resultado valida a qualidade técnica das reações de amplificação e assegura a confiabilidade dos dados quantitativos obtidos nos ensaios subsequentes.

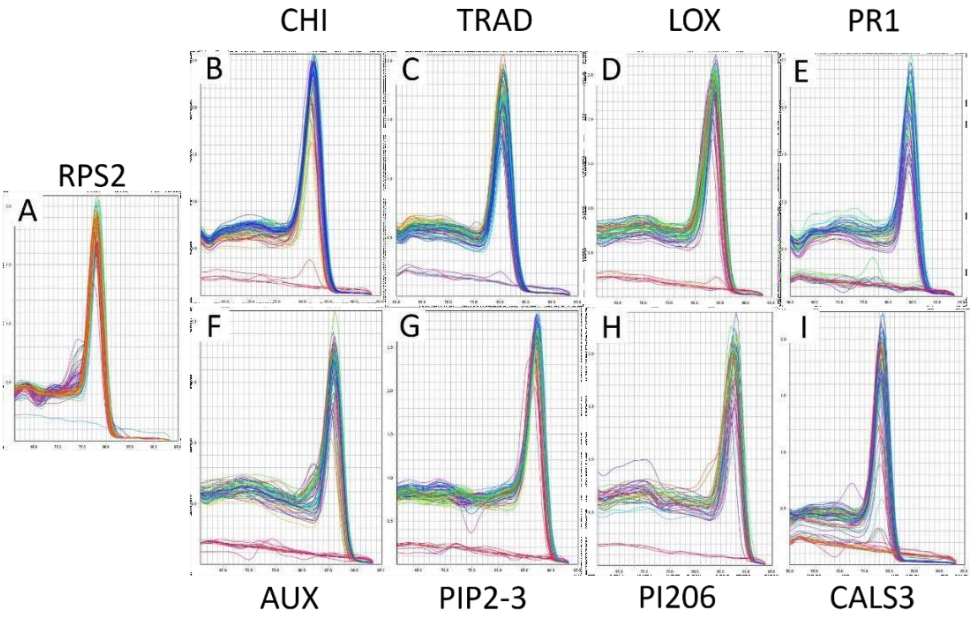


Figura 5. Curvas de dissociação (*melting curves*) obtidas por RT-qPCR para os iniciadores utilizados no estudo de expressão gênica em raízes de bananeira 'Prata-Anã' sob indução de resistência ao mal-do-panamá. As curvas representam o perfil de dissociação dos produtos amplificados para cada gene analisado, evidenciando a especificidade da reação: (A) gene de referência *RPS2* (Proteína Ribossomal S2), (B) *CHI* (Quitinase), (C) *TRAD* (Transdução de Sinais), (D) *LOX* (Lipoxigenase), (E) *PR1* (Proteína Relacionada à Patogênese 1), (F) *AUX* (Transportador de Auxina), (G) *PIP2-3* (Aquaporina), (H) *PI206* (Proteína de Resposta à Doença) e (I) *CALS3* (Calose Sintase). A presença de um único pico bem definido em cada gráfico indica a especificidade da amplificação para cada conjunto de *primers* e a ausência de dímeros ou produtos inespecíficos.

O perfil de expressão do gene TRAD (Figura 6A) evidenciou uma regulação positiva consistente em todas as condições experimentais, mantendo-se sempre acima do nível basal. Nas primeiras 24 horas, a resposta foi mais pronunciada no tratamento com glicerol 5% (3,56). Após uma tendência à estabilização dos níveis entre os grupos no intervalo de 48 horas, observou-se um comportamento diferente às 72 horas: enquanto a expressão no controle (água) sofreu um declínio significativo (1,37). A presença do indutor promoveu um aumento robusto na expressão gênica. Neste estágio tardio, o tratamento com Glicerol 3% atingiu o nível máximo de acúmulo de transcritos de expressão para este gene (4,43), seguido pelo Glicerol 5% (3,98), indicando uma forte potenciação da via de transdução de sinais em resposta prolongada.

Em contrapartida, a avaliação do gene PR1 (Figura 6B) revelou uma regulação mais dinâmica e oscilatória. Inicialmente (24 h), observou-se indução transcricional em

todos os grupos, com destaque significativo para o Glicerol 3%, que atingiu o pico máximo de expressão relativa do experimento (5,19), superando expressivamente o controle e a dose de 5%. No entanto, às 48 horas, houve uma alteração drástica no perfil: os grupos Água e Glicerol 3% retornaram a níveis próximos ou abaixo da linha basal, enquanto o grupo Glicerol 5% demonstraram um aumento progressivo (1,04). Por fim, às 72 horas, constatou-se uma retomada da regulação positiva geral. Nesse ponto, a maior abundância de transcritos foi observada no tratamento com Glicerol 5% (3,41), seguido pelo Glicerol 3% (3,05), sugerindo uma persistência da resposta de defesa dependente da concentração do indutor.

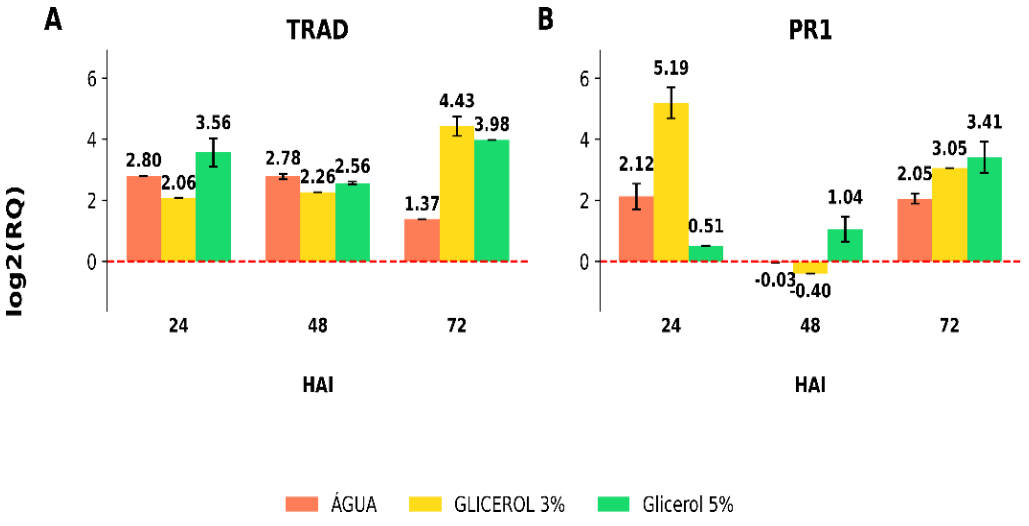


Figura 6. Perfil de expressão relativa dos genes (A) *Transdução de Sinais* (TRAD) e (B) *Pathogenesis-related proteins* 1 (PR1) em resposta ao tratamento com glicerol. As plantas foram submetidas a tratamentos com Água (controle; barras laranjas), Glicerol 3% (barras amarelas) e Glicerol 5% (barras verdes). A quantificação relativa (RQ) foi transformada em log2 e avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a indução (HAI). A linha tracejada vermelha (y=0) representa o nível basal de expressão. As barras de erro representam o desvio padrão da média.

A análise dos perfis de expressão relativa dos genes *Chitinase* (CHI) e *Aquaporin PIP2-3* (PIP2-3) está apresentada na Figura 7. Em relação ao gene CHI (Figura 7A), observaram-se padrões oscilatórios distintos. Nas primeiras 24 horas, houve divergência na resposta inicial: tratamentos com Água e Glicerol 3% induziram a expressão (1,78 e 2,22, respectivamente), enquanto o Glicerol 5% resultaram em repressão (-1,50). No intervalo de 48 horas, notou-se uma inversão, onde os grupos Água e Glicerol 3% sofreram forte regulação negativa (-2,88 e -1,59), oposto ao Glicerol 5% que exibiu

indução significativa (2,31). Às 72 horas, todos convergiram para regulação positiva; embora Água e Glicerol 3% tenham recuperado seus níveis (2,96 e 2,67), o Glicerol 5% destacaram-se com um pico de expressão de 6,27, sugerindo uma ativação tardia e robusta.

Paralelamente, o gene PIP2-3 (Figura 7B) revelou perfis de regulação contrastantes. Em 24 horas, a resposta foi heterogênea: indução no grupo Água (1,92), repressão no Glicerol 3% (-0,96) e níveis basais no Glicerol 5% (0,19). Às 48 horas, destacou-se a drástica regulação negativa do Glicerol 3% (-5,09), enquanto o grupo Água reduziu a intensidade (0,51) e o Glicerol 5% iniciaram uma tendência de aumento (0,86). Ao final de 72 horas, o comportamento do Glicerol 3% inverteram-se completamente, passando de repressão para a maior indução registrada (3,03), superando o Glicerol 5% (1,98). O grupo Água permaneceu com níveis baixos (0,25), indicando que o efeito indutor inicial não se sustentou, ao contrário da resposta tardia promovida pelos tratamentos com glicerol.

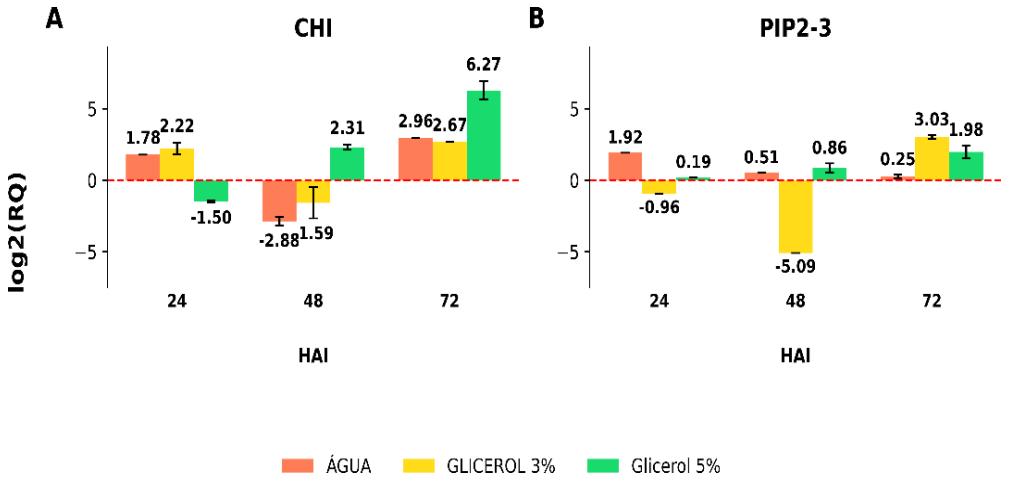


Figura 7. Perfil de expressão relativa dos genes (A) *Chitinase* (CHI) e (B) *Aquaporin PIP2-3* (PIP2-3) em resposta ao tratamento com glicerol. As plantas foram submetidas a tratamentos com Água (controle; barras laranjas), Glicerol 3% (barras amarelas) e Glicerol 5% (barras verdes). A quantificação relativa (RQ) foi transformada em log2 e avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a indução (HAI). A linha tracejada vermelha (y=0) representa o nível basal de expressão. As barras de erro representam o desvio padrão da média.

A análise da expressão gênica de *Callose synthase 3* (CALS3, Figura 8C) evidenciou uma regulação complexa e dependente da concentração de glicerol. Nas

primeiras 24 horas, o perfil foi marcadamente divergente: tratamentos com Água e Glicerol 3% promoveram leve indução (0,53 e 0,72, respectivamente), enquanto o Glicerol 5% resultaram em severa repressão (-4,05). No intervalo de 48 horas, o padrão alterou-se significativamente, com Água e Glicerol 3% exibindo regulação negativa (-1,96 e -1,35), ao passo que o Glicerol 5% recuperaram-se para níveis ligeiramente acima do basal (0,17). Ao final de 72 horas, apenas o Glicerol 3% retomaram a indução positiva (0,92); em contrapartida, o grupo Água manteve-se reprimido (-1,09) e o Glicerol 5% oscilaram para níveis levemente negativos (-0,28), sugerindo que apenas a concentração intermediária estimulou o acúmulo de transcritos neste estágio tardio.

O perfil transcricional de *Putative Disease resistance response protein 206* **(**PI206, Figura 8B) revelou uma dinâmica oscilatória, notável nos tratamentos com menor concentração de indutor. Em 24 horas, todos os grupos apresentaram regulação positiva, com o Glicerol 3% atingindo o maior pico de indução (4,50), superior a Água (2,24) e Glicerol 5% (1,24). Após uma queda abrupta às 48 horas onde o Glicerol 3% retornaram ao basal (-0,01), a Água apresentou leve repressão (-0,55) e o Glicerol 5% forte regulação negativa (-2,38) e observou-se nova divergência às 72 horas. Neste ponto, os tratamentos Glicerol 3% e Água retomaram intensamente a expressão (4,31 e 2,75), enquanto o Glicerol 5% permaneceram estagnado próximo à linha basal (-0,14), indicando ineficácia da maior concentração em sustentar a resposta de defesa deste gene.

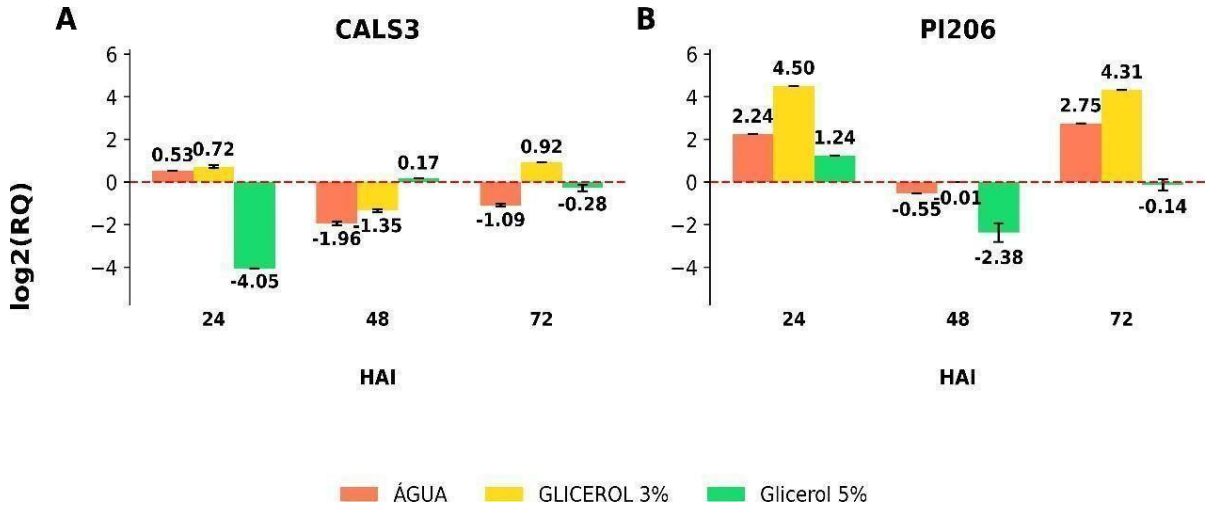


Figura 8. Perfil de expressão relativa dos genes (A) *Callose synthase 3(CALS3)* e (B) *Putative Disease resistance response protein 206* (PIP206) em resposta ao tratamento com glicerol. As plantas foram submetidas a tratamentos com Água (controle; barras laranjas), Glicerol 3% (barras amarelas) e Glicerol

5% (barras verdes). A quantificação relativa (RQ) foi transformada em log2 e avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a indução (HAI). A linha tracejada vermelha (y=0) representa o nível basal de expressão. As barras de erro representam o desvio padrão da média.

A análise dos perfis de expressão gênica de *Auxin transporter-like protein 1* (AUX) e *Lipoxygenases* (LOX) ao longo das 72 horas experimentais é apresentada na Figura 9. Em relação ao gene AUX (Figura 9A), os dados evidenciaram perfis temporais distintos e não lineares. No período inicial de 24 horas, o tratamento controle (Água) exibiu uma indução robusta e isolada (3,77), enquanto a presença de glicerol pareceu inibir essa resposta inicial, mantendo os níveis basais no Glicerol 3% (0,10) e causando leve repressão no Glicerol 5% (-0,51). Às 48 horas, a dinâmica divergiu nos tratamentos com o indutor: o grupo Glicerol 3% sofreram regulação negativa significativa (-1,18), oposto ao Glicerol 5%, que inverteu seu padrão para indução (1,53), superando o controle. Ao final de 72 horas, constatou-se uma regulação positiva generalizada, com destaque para a recuperação do Glicerol 3% (3,39), sugerindo uma ativação tardia, enquanto os demais grupos mantiveram níveis moderados.

Simultaneamente, a análise do gene LOX (Figura 9B) revelou dinâmicas de regulação contrastantes. O grupo controle demonstrou notável estabilidade, mantendo indução moderada e constante (entre 2,02 e 2,17) durante todo o período. Em contrapartida, os tratamentos com glicerol oscilaram conforme a concentração e o tempo. Às 24 horas, o Glicerol 3% promoveram forte indução (4,04), enquanto o Glicerol 5% exibiram repressão (-0,46).

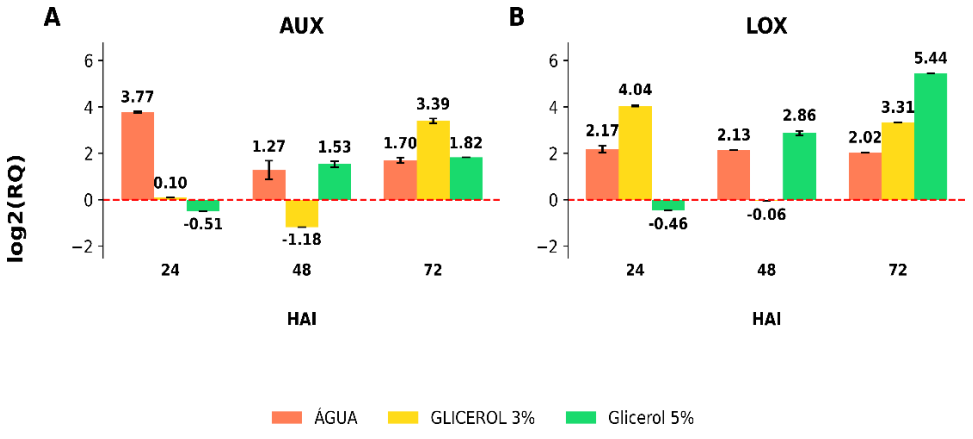


Figura 9. Perfil de expressão relativa dos genes (A) *Auxina (AUX)* e (B*) Lipoxygenase* (LOX) em resposta ao tratamento com glicerol. As plantas foram submetidas a tratamentos com Água (controle; barras laranjas), Glicerol 3% (barras amarelas) e Glicerol 5% (barras verdes). A quantificação relativa (RQ) foi transformada em log2 e avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a indução (HAI). A linha tracejada vermelha (y=0) representa o nível basal de expressão. As barras de erro representam o desvio padrão da média.

No intervalo de 48 horas, houve uma inversão desse padrão: a expressão no Glicerol 3% decaíram para níveis basais, ao passo que o Glicerol 5% iniciaram uma resposta positiva significativa (2,86). Por fim, às 72 horas, ambos os tratamentos com glicerol resultaram em alta atividade transcricional; contudo, o Glicerol 5% atingiram o pico máximo de expressão de todo o experimento (5,44), superando o Glicerol 3% (3,31), o que indica uma resposta de defesa mais intensa e tardia na maior concentração do indutor.

4. DISCUSSÃO

4.1 Caracterização histopatológica e bioquímica

Os resultados da análise histopatológica confirmam que o processo de infecção radicular pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) na bananeira 'Prata-Anã' seguiu um padrão clássico de patógeno vascular hemibiotrófico. A sequência temporal observada, iniciada pela germinação de propágulos e colonização das camadas superficiais do córtex radicular às 24 horas após inoculação (HAI) seguida de invasão cortical e estabelecimento no cilindro vascular entre 48-72 HAI, está em plena concordância com o modelo de patogênese descrito para espécies de Fusarium em diversas culturas, conforme documentado por Li et al. (2023a).

A presença de hifas em todos os tratamentos inoculados (T2, T3 e T4) evidencia que a pulverização foliar com glicerol não impediu a penetração inicial do fungo nas raízes. Esse resultado confirma que o composto atua como um indutor sistêmico e não como uma barreira física ou fungicida de contato radicular, o que seria mecanicamente inviável dada a via de aplicação. A colonização inicial é um processo impulsionado pela quimiotaxia do patógeno em resposta aos exsudatos radiculares, sinalização esta que não é anulada pela indução de resistência na parte aérea (DITA et al., 2018; NOVAES et al., 2024). Assim, o modo de ação do glicerol no patossistema bananeira-Foc não reside na

prevenção da infecção, mas na contenção da progressão vascular do patógeno via *priming* de defesa.

Contudo, as análises histoquímicas, deposição de fenóis e deposição de calose, revelaram uma modulação profunda e qualitativa da resposta defensiva da planta pelo glicerol. Enquanto no Controle Inoculado (T2) a deposição de compostos fenólicos e calose ocorreu de forma progressiva e com intensidade moderada (uma resposta basal característica da suscetibilidade da cultivar 'Prata-Anã' (Dita et al., 2018), nos tratamentos T3 (Glicerol 3%) e T4 (Glicerol 5%), essas respostas foram significativamente antecipadas e potencializadas.

A detecção de um forte sinal histoquímico para fenóis já às 24 HAI e a deposição vultosa de calose nas adjacências do sistema vascular evidenciam que o glicerol atuou como um elicitor eficaz no patossistema bananeira-Foc. Esse padrão de resposta acelerada e amplificada caracteriza o fenômeno de priming, no qual o estímulo inicial (glicerol) prepara a planta para uma defesa mais robusta frente ao estresse subsequente (CONRATH et al., 2015; MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2016).

Resultados semelhantes foram reportados por Zhang et al. (2015), que demonstraram que a aplicação foliar de glicerol induz respostas defensivas precoces em plantas tropicais. Além disso, o papel do glicerol no reforço das barreiras físicas da parede celular (calose e lignificação) foi corroborado em cereais por Li et al. (2016) e Yu et al. (2016), reforçando que o tratamento com este composto converte uma interação inicialmente suscetível em uma resposta de resistência mediada por contenção histológica (NOVAES et al., 2024).

A antecipação da síntese de calose é estrategicamente crucial. A calose (β-1,3-glucano) deposita-se em papilas celulares e nos plasmodesmos, formando uma das primeiras e mais eficazes barreiras estruturais para impedir a progressão das hifas fúngicas, sendo um componente central da Imunidade Desencadeada por Padrões (PTI) (LUNA et al., 2011). Paralelamente, o acúmulo e a polimerização de fenóis levam à lignificação, criando uma barreira química e estrutural impermeável (MIEDES et al., 2014). A observação de que essa deposição foi mais intensa e localizada estrategicamente nas regiões que antecedem o sistema vascular sugere um mecanismo ativo de

compartimentalização do patógeno, essencial para limitar doenças vasculares ao impedir seu acesso ao xilema (BECKMAN, 2000).

O efeito dose-dependente, com maior deposição fenólica visual no tratamento a 5% (T4), pode ser explicado pela ação conjunta (ou interação) entre o sinal elicitor do glicerol e o estresse osmótico por ele imposto, a qual potencializa (ou exacerba) as respostas de defesa, embora, como discutido adiante, concentrações muito elevadas possam acarretar custos fisiológicos (ATKINSON e URWIN, 2012). Em síntese, os dados histopatológicos e bioquímicos indicam que o principal modo de ação do glicerol reside na ativação de mecanismos de defesa pós-penetração via priming, convertendo uma interação inicialmente compatível (suscetível) em uma resposta fenotípica de maior resistência através do reforço físico-químico precoce das barreiras celulares.

4.2. Análise de Sintomas

A redução significativa da severidade da murcha (Índice de McKinney de 78% para 46% e 54% com glicerol a 3% e 5%, respectivamente) valida a eficácia da indução de resistência sistêmica via aplicação foliar. Uma vez que o glicerol não entrou em contato direto com o patógeno no solo, seu efeito supressivo é necessariamente mediado pela ativação de mecanismos de defesa na planta, que limitaram a progressão da doença a partir das raízes.

O mecanismo provável para esta supressão reside na combinação do priming defensivo com um possível custo metabólico imposto ao fungo por um ambiente radicular alterado. A aplicação foliar de glicerol pode ter induzido um estresse osmótico moderado e transitório na parte aérea, desencadeando ajustes fisiológicos sistêmicos, uma vez que essa sinalização da folha, é translocada até as raízes. Esses ajustes podem incluir a alteração do perfil de exsudatos radiculares ou do potencial hídrico do apoplasto radicular.

Para colonizar ativamente, o Foc necessita adaptar seu metabolismo a esse novo ambiente. Embora fungos possuam mecanismos de osmorregulação, esse ajuste demanda energia (HOHMANN, 2002). Conforme o princípio sugerido por Trivunović et al. (2022), recursos (ATP, precursores de carbono) poderiam ser desviados para a homeostase celular do fungo, em detrimento do crescimento agressivo e da produção de toxinas. Esse efeito indireto, somado às barreiras físicas (calose) e químicas (lignina) antecipadas pelo

priming, pode ter proporcionado um ambiente radicular menos conducente à colonização severa, resultando na menor incidência de sintomas vasculares.

A maior eficácia da dose de 3% em relação à de 5% revela um delicado balanço fisiológico. Concentrações muito elevadas na folha podem ter induzido um estresse abiótico excessivo, ativando vias de sinalização (como a do ácido abscísico - ABA) que antagonizam as vias de defesa contra patógenos (Anderson et al., 2004), ou causando fitotoxicidade que comprometeu a saúde geral da planta. A dose de 3% parece ter atingido o equilíbrio ideal para elicitar o priming defensivo sem sobrecarregar a fisiologia da planta.

4.3. Análise de Expressão Gênica

O perfil de expressão gênica possibilitou o esclarecimento dos mecanismos moleculares subjacentes às observações histológicas e sintomatológicas, revelando duas estratégias regulatórias distintas e dependentes da concentração para o glicerol.

O Glicerol 3% induziram um perfil característico de uma resposta coordenada de priming eficiente e sustentável. A indução precoce, robusta e significativa do gene PR1 (24 HAI), um marcador chave da via de sinalização do Ácido Salicílico (SA), confirma o papel específico da molécula como um elicitor da imunidade inata sistêmica. Esse padrão é consistente com a ativação da Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), na qual sinais móveis como o Ácido Salicílico ou seus derivados ativam genes de defesa em tecidos distantes (VAN LOON et al., 2006).

Concomitantemente, a repressão do gene de auxina (AUX) ilustra o conhecido antagonismo ou *trade-off* entre as vias de crescimento e defesa, onde recursos metabólicos e de sinalização são desviados da expansão celular para a ativação das respostas imunológicas (KAZAN E MANNERS, 2009; Huot et al., 2014). Após uma repressão transitória às 48 HAI (um provável mecanismo de feedback negativo para conservar energia e evitar a autoimunidade, comum após um pico de alerta inicial (KARASOV et al., 2017), observou-se uma consolidação tardia da defesa estrutural às 72 HAI. Nesta fase, a re-indução robusta dos genes CALS3 (*Callose Synthase 3*) e, de forma crucial, PI206 (*Putative Disease resistance response protein 206*) demonstra uma defesa sequencial.

O gene PI206 codifica uma proteína dirigente (DIR), que desempenha um papel estrutural crítico ao guiar o acoplamento estereoespecífico de monolignóis durante a formação de lignina na parede celular (PANIAGUA et al., 2017). Esta não é uma polimerização aleatória, mas um processo dirigido que resulta em uma barreira física robusta, impermeável e energeticamente eficiente. A indução sustentada de PI206 pelo glicerol 3% explicam bioquimicamente a deposição fenólica consistente e aparentemente estruturada (não necrótica) observada na histologia. A retomada da expressão de AUX neste estágio final sinaliza a resiliência do sistema: uma vez estabelecida a defesa, a planta reativa a maquinaria de crescimento, indicando um crescimento compensatório pós-estresse.

Em marcante contraste, o Glicerol 5% desencadearam uma resposta bifásica inicialmente dominada pelo estresse abiótico. O choque osmótico severo suprimiu as respostas de defesa basais nas primeiras 24-48 HAI, como evidenciado pela baixa expressão de PR1 e pela repressão profunda de CALS3 e PI206. Este padrão é consistente com a priorização da via de sinalização do Ácido Abscísico (ABA) para tolerância osmótica e manutenção do turgor celular, a qual exerce um antagonismo conhecido sobre as vias de SA e JA nas fases iniciais de um estresse hídrico/severo (ANDERSON et al., 2004).

A repressão de PI206 é reveladora, indicando que o reforço estrutural da parede celular foi preterido em favor da osmorregulação imediata. Esse fenômeno evidencia um processo de *trade-off* metabólico, em que a planta prioriza a sobrevivência ao choque osmótico inicial em detrimento da biossíntese de lignina (HUOT et al., 2014; KARASOV et al., 2017). Superado esse período de aclimatização (a partir de 48 HAI), o tratamento a 5% montou uma resposta defensiva tardia e potente, porém assistemática, caracterizada pelo acúmulo máximo de transcritos de *LOX* e *CHI* às 72 HAI.

A via do JA é classicamente associada à defesa contra patógenos necrotróficos, herbívoros e está envolvida em respostas a hemibiotróficos, sendo um potente indutor de enzimas hidrolíticas como as quitinases (WASTERNACK E FEUSSNER, 2013; VAN LOOn et al., 2006). No entanto, a ausência de uma indução concomitante e robusta de PI206 sugere uma defesa descoordenada: a planta investiu pesadamente em um ataque enzimático ao fungo (via JA/CHI), mas falhou em coordenar o concomitante e essencial reforço estrutural da parede celular (via DIR/PI206). Este desbalanço entre defesa

química e defesa estrutural pode resultar no acúmulo fenólico desordenado e potencialmente necrótico (simples oxidação) observado nas análises histológicas, em oposição à lignificação eficiente e organizada. Isso oferece uma explicação molecular robusta para a menor eficácia da dose de 5% no controle de sintomas em comparação com a dose de 3%.

A dinâmica de outros genes oferece insights adicionais. A expressão da aquaporina PIP2-3 mostrou uma repressão sustentada nas primeiras 48 HAI pelo glicerol 3%, o que pode representar uma estratégia defensiva para limitar o influxo passivo e descontrolado do soluto, prevenindo desequilíbrios osmóticos no citosol, além de ser um componente da PTI para restringir a entrada de efetores (MAUREL et al., 2015; AFZAL et al., 2016). Sua forte re-indução tardia (72 HAI) coincide com a fase de metabolização do glicerol e retomada do crescimento. O gene de transdução de sinal TRAD mostrou respostas cinéticas opostas: uma ativação explosiva e transitória ao choque do glicerol 5% (típica de respostas a estresse abiótico agudo mediadas por osmos sensores) versus uma ativação tardia e sustentada pelo glicerol 3% (compatível com a sinalização prolongada do priming e defesa biótica) (BECKERS & CONRATH, 2007; Zhu, 2016).

8. CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que a aplicação foliar de glicerol atua como um modulador eficaz da defesa vegetal em bananeira cv. 'Prata-Anã' frente ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, confirmando seu potencial como indutor de resistência, ainda que não apresente ação fungicida erradicante.

No âmbito histológico, a indução de resistência foi evidenciada pelo reforço precoce das barreiras físicas e químicas. As raízes das plantas tratadas com glicerol apresentaram uma deposição mais intensa e difusa de calose e de compostos fenólicos, concentrada no parênquima cortical e na endoderme.

As análises de expressão gênica revelaram que o mecanismo de ação do glicerol é dependente da concentração utilizada, desencadeando vias de sinalização distintas. A dose de 3% mostrou-se mais eficaz, atuando como um agente de priming ao promover a ativação rápida de genes marcadores de defesa e reforço estrutural nas primeiras 24 horas, sem comprometer a homeostase da planta. Por outro lado, a concentração de 5% induziu, inicialmente, uma repressão gênica associada a um provável choque osmótico, seguida

por uma resposta tardia e massiva, sugerindo um custo metabólico mais elevado e um antagonismo inicial entre as respostas a estresses abióticos e bióticos.

Em suma, o glicerol demonstra ser uma ferramenta promissora para compor estratégias de manejo integrado de doenças na bananicultura, especialmente por antecipar a resposta imune da planta. Além do benefício fitossanitário, a utilização deste composto alinha-se aos princípios da economia circular e sustentabilidade, ao agregar valor a um subproduto abundante da indústria do biodiesel, transformando-o em um insumo agrícola estratégico para a proteção da bananeira 'Prata-Anã'.

9. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho demonstrou que a busca por soluções para a murcha de Fusarium na cultura da bananeira se beneficia diretamente da integração de diferentes metodologias. Ao unir ferramentas de biotecnologia com o manejo fisiológico da planta, foi possível atuar tanto na validação da criação de novos genótipos quanto no estímulo à defesa de variedades comerciais já consagradas.

Na vertente do melhoramento genético (Capítulo I), a aplicação conjunta de marcadores moleculares SSR, ISSR e IRAP mostrou-se uma etapa essencial para a rotina do Programa de Melhoramento Genético da Bananeira (PMGB). A capacidade de confirmar a origem híbrida de materiais de forma precoce, a exemplo dos genótipos Pol5439 e Pol5662/22, traz uma segurança operacional significativa para o programa. Na prática, essa caracterização molecular evita o desperdício de tempo, área e recursos financeiros com plantas provenientes de autofecundação ou cruzamentos indesejados, garantindo que apenas indivíduos com real ampliação de base genética e potencial de resistência sigam para as avaliações agronômicas a campo.

Como estratégia complementar voltada para o manejo da doença (Capítulo II), a aplicação de glicerol via pulverização foliar comprovou ser uma alternativa viável para a indução de resistência sistêmica na cultivar 'Prata-Anã' contra a raça STR4 do patógeno. Os resultados indicam que a dose de 3% de glicerol apresenta o melhor equilíbrio, pois consegue induzir o estado de priming (condicionamento de defesa) na planta sem causar estresse fisiológico negativo. Do ponto de vista celular e molecular, essa concentração ativou vias de defesa importantes (como a do gene PR1) e acelerou a deposição de

barreiras estruturais nas raízes, como compostos fenólicos e calose. O reflexo prático dessa modulação fisiológica foi uma redução clara na severidade da colonização do fungo nos rizomas.

De modo geral, a dissertação reforça que o enfrentamento da murcha de Fusarium exige táticas combinadas. A certificação precisa de novos cruzamentos otimiza o lançamento futuro de cultivares geneticamente resistentes, enquanto o uso de compostos como o glicerol surge como uma possível ferramenta de manejo sustentável e de baixo custo. Ambas as frentes fornecem bases sólidas para a continuidade dos trabalhos de pesquisa e contribuem diretamente para a proteção e sustentabilidade da bananicultura

REFERÊNCIAS

AFZAL, Z. et al. Aquaporins in plants: from transport to regulation and responses to abiotic and biotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 627, 2016.

AMORIM, E. P. et al. Melhoramento genético de bananeira: estratégias e resultados recentes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 38, n. 4, e-596, 2016

ANDERSON, J. P. et al. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3460-3479, 2004.

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523-3543, 2012.

BECKERS, G. J. M.; CONRATH, U. Priming for stress resistance: from the lab to the field. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 425-431, 2007.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

BRUNDRETT, M. et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 374 p. (ACIAR Monograph, 32).

CAMLI-SAUNDERS, A.; VILLOUTA, C. Root exudates and their role in plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 76, n. 2, p. 543-558, 2025.

CASTAÑEDA, N. E. N. et al. Gene expression analysis in *Musa acuminata* during compatible interactions with *Meloidogyne incognita*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 119, n. 5, p. 915-930, 2017.

CHANDA, B. et al. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 421-427, 2011.

CHEN, X. Y.; KIM, J. Y. Callose synthesis in higher plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 6, p. 489-492, 2009.

CHEN, Y. et al. Root exudates drive the soil-borne legacy of *Fusarium* wilt in watermelon. **Plant, Cell & Environment**, v. 45, n. 6, p. 1823-1838, 2022.

CHEPANOSKE, C. L. et al. Touch-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 1145-1151, 1995.

CHEVAL, C.; FAULKNER, C. Plasmodesmal regulation during plant-pathogen interactions. **New Phytologist**, v. 217, n. 1, p. 62-67, 2018.

CHOWDHURY, J. et al. The cell wall of cereal grains: update on structure, biosynthesis and manipulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 1–20, 2014.

CONRATH, U. et al. Molecular mechanisms of priming for enhanced plant defense. **Advances in Botanical Research**, v. 51, p. 87-126, 2009. (Ou a versão mais recente: CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2015).

CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 10, p. 524-531, 2011.

COSTA, J. L. **Estudos histológicos e moleculares da interação entre *Musa acuminata* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***. 2013. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

DITA, M. et al. Fusarium wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1468, 2018.

ELLINGER, D.; VOIGT, C. A. Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. **Annals of Botany**, v. 114, n. 6, p. 1349–1358, 2014.

HAN, X. et al. Jasmonate signalling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in Arabidopsis and tobacco. **The Plant Cell**, v. 26, n. 12, p. 4812-4828, 2014.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.

HUOT, B. et al. Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. **Molecular Plant**, v. 7, n. 8, p. 1267-1287, 2014.

KACHROO, A.; KACHROO, P. Fatty acid-derived signals in plant defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 153-176, 2009.

KARASOV, T. L. et al. Mechanisms to mitigate the trade-off between growth and defense. **The Plant Cell**, v. 29, n. 4, p. 666-680, 2017.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137A-138A, 1965.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 7, p. 373-382, 2009.

KREPS, J. A. et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. Plant Physiology, v. 130, n. 4, p. 2129-2141, 2002.

LAUR, J.; HACKE, U. G. The role of water channel proteins in facilitating recovery of leaf hydraulic conductance from water stress in Populus trichocarpa. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111751, 2014

LUNA, E. et al. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 2, p. 183-193, 2011.

LI, X. et al. Jasmonic acid signaling pathway in response to *Fusarium* infection in banana. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 2021, 2021.

LI, Y. et al. Glycerol-Induced Powdery Mildew Resistance in Wheat by Regulating Plant Fatty Acid Metabolism, Plant Hormones Cross-Talk, and Pathogenesis-Related Genes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 673, 2020.

LICHTEMBERG, L. A. Colheita e pós-colheita da banana. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. 2. ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010.

LICHTEMBERG, L. A.; LICHTEMBERG, P. S. F. Avanços na bananicultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 29-36, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAUREL, C. et al. Aquaporins in plants. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1321-1358, 2015.

MIEDES, E. et al. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, art. 358, 2014.

NELSON, P. E. Life cycle and epidemiology of Fusarium oxysporum. In: MACE, M.E. et al. (Ed.). **Fungal Wilt Diseases of Plants**. New York: Academic Press, 1981. p. 51-80.

NOVAES, E. et al. Glycerol as an Inducer of Disease Resistance in Plants: A Systematic Review. **Horticulturae**, v. 10, n. 1, p. 45, 2024.

ORTIZ, R.; SWENNEN, R. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 158-169, 2014.

PANIAGUA, C. et al. Dirigent proteins in modulation of cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 13, p. 3287-3301, 2017.

PASTOR, V. et al. Priming plants against pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 216, 2013.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana. **Phytopathology**, v. 105, n. 12, p. 1512–1521, 2015.

QUACKENBUSH, J. Microarray data normalization and transformation. **Nature Genetics**, v. 32, supl., p. 496-501, 2002.

RODRIGUES, O. et al. Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-induced stomatal closure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 34, p. 9200-9205, 2017.

SHU, B. et al. Auxin signaling in plant-pathogen interactions: mechanisms and trends. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1150337, 2023.

SILVA, S. O. et al. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e resultados. *In*: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (Ed.). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília: Embrapa, 2008. v. 1, p. 741-768

TENHAKEN, R. Cell wall remodeling under abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 771, 2015.

VAN LOON, L. C. et al. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VOIGT, C. A. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, n. 6, e28715, 2014.

WANG, L. et al. Acidification and nutrient imbalances drive Fusarium wilt severity in Banana (*Musa* spp.) grown on tropical latosols. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 9, p. 611, 2025.

WANG, Z. et al. Banana Bunchy Top Virus infection induces resistance to *Fusarium* wilt in banana. **Phytopathology**, v. 114, p. 1-10, 2024.

WASTERNACK, C.; FEUSSNER, I. The oxylipin pathways: biochemistry and function. **Annual Review of Plant Biology**, v. 69, p. 363-386, 2018.

XU, S. et al. *Bacillus subtilis* activates jasmonic acid signaling to induce resistance in banana against *Fusarium* wilt. **Phytopathology**, v. 113, p. 1-12, 2023.

YADAV, V. et al. Genome-wide identification and expression profiling of dirigent gene family in *Linum usitatissimum* L. **Scientific Reports**, v. 11, p. 5707, 2021.

ZHANG, J. et al. Identification and validation of reference genes for qRT-PCR analysis in banana under *Fusarium* wilt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, art. 1315, 2017.

ZHANG, Y. et al. Foliar application of glycerol activates the defense response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 2, p. 132-140, 2015.

ZHU, J. K. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313-324, 2016.