



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Caracterização de Unigenes na Interação *Musa acuminata*- *Mycosphaerella musicola*: desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise de Expressão Gênica**

**Viviane de Oliveira Cruz**

**Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller**

**Co-Orientadora: Dra.Vânia Cristina Rennó Azevedo**

**Brasília-DF**

**2013**

**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular**



**CARACTERIZAÇÃO DE UNIGENES NA INTERAÇÃO *MUSA ACUMINATA*-  
*MYCOSPHAERELLA MUSICOLA*: DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA**

**Viviane de Oliveira Cruz**

**Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller  
Co-Orientadora: Dra.Vânia Cristina Rennó Azevedo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Brasília-DF**

**2013**

Dissertação de autoria de Viviane de Oliveira Cruz intitulada “Caracterização de unigenes na interação *Musa acuminata*- *Mycosphaerella musicola*: desenvolvimento de marcadores microsatélites e análise de expressão gênica” realizada junto ao departamento de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Universidade Católica de Brasília sob orientação do professor Dr. Robert Neil Gerard Miller e co- orientação da Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES).

**Aprovado por:**

---

Dr. Robert Neil Gerard Miller (Orientador)  
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fitopatologia  
Universidade Católica de Brasília

---

Dra. Claudia Fortes Ferreira (Examinadora Externa)  
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical  
Laboratório de Biologia Molecular

---

Dra. Eliane Ferreira Noronha (Examinadora Interna)  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília

---

Dr. Cléber Furlanetto (Examinador Suplente)  
Departamento de Fitopatologia  
Universidade de Brasília

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Florinalva e Vitor, aos meus irmãos Vanusa e Vagner e à toda minha família por acreditarem em mim, pelo apoio, incentivo e carinho sempre.**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, Aquele tornou tudo possível, me deu força e fortaleceu minha fé em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador professor Dr. Robert Neil Gerard Miller pelos seus ensinamentos, orientações, dedicação, paciência e confiança sempre, não só meu sincero agradecimento como minha admiração pela pessoa íntegra e corajosa que é.

À minha co-orientadora Vânia Cristina Rennó Azevedo pela atenção, pelas oportunidades, ensinamentos, incentivo sempre e pela orientação desde a graduação até o mestrado. Também a ela minha sincera admiração.

À minha família, minha mãe Nalva de Oliveira, meu pai Vitor Cruz, minha irmã Vanusa de Oliveira, meu irmão Vagner de Oliveira, minha cunhada Elisângela Silveira e meu sobrinhos Gabriel Henrique e Gustavo Cruz meus grandes tesouros, orgulho e base que sempre acreditaram em mim, me incentivaram e me apoiaram.

As minhas grandes amigas Sarah Dourado, Rayssa Paula, Priscila Meneses, Karine Sousa, Uiara Cavalcante, Danielle Resende, Regina Barreto, pela amizade, colaboração direta ou indireta, por entenderem minha ausência por muitas vezes, por acreditarem em mim mais do que eu mesma, por me alegrarem sempre e por me levantarem todas as vezes que eu não me senti capaz.

Aos meus amigos Jefferson Barros, Danilo Oliveira, Gustavo Coelho, Walter Ferreira e Bruno Carvalho pela amizade, apoio, compreensão e pela disposição em ajudar sempre que possível.

A todos os amigos e colegas (ex e atuais) e técnicos do Laboratório de Genética Vegetal Anádría Stéphanie, Mariana Lira, Ediene Gouveia, Alessandra Silveira, Ellen Grippi, Eduardo Costantin, Thaís Melissa, Elaine Campinhos, Bárbara Thompson, Daniele Paiva, Lorena da Mata, Zilneide Pedrosa, Marco Antônio, Rodrigo Furtado, Thaísa Lacerda, Dione Mendes, Justino Dias, Esdras Henrique, Camila Coelho, Natália Lamas, Natasha Brianez, Marília Pappas, Catherine Mendes pela colaboração direta e indireta e incentivo.

A todos do Laboratório Interação Planta- Praga Flávia Leonel, Marco Ninomia, Gláucia Midorikawa, Camila Louly, Fabiane Brito, Jansen Rodrigo, Cristiane Camargo pela

paciência e por contribuírem com seu tempo e conhecimentos para que este trabalho fosse possível.

Aos amigos, colegas e técnicos do laboratório LPPIII Andressa Cunha, Bruna Vidigal, Raquel Bispo, Paula Vasconcelos, Larissa Muniz, Larissa Arrais, Amanda Kristina, Lílian Travassos, Lígia Almeida, Ana Luíza, Lorena Mendoza, Isadora Vitti, Karoline Almeida, Karinne Dantas, Maurício Rossato, Mário Saraiva e Leonardo Nunes.

À Dra. Ana Brasileiro pela disponibilidade, orientações, sugestões e grande contribuição para este trabalho.

À equipe de Bioinformática da Embrapa Cenargen, em especial o Dr. Orzenil Silva Jr por todo o apoio nas análises de bioinformática.

À Universidade de Brasília e aos seus professores, Mestres e Doutores que contribuíram para minha formação acadêmica e pelo espaço cedido a pesquisa.

A Universidade Católica de Brasília pela contribuição na minha formação acadêmica em especial a Dra Rosângela Vieira pela parceria drante a realização deste trabalho.

À Embrapa Cenargen, onde iniciei minhas atividades de pesquisa em Biologia Molecular desde a graduação e à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical pela parceria na realização deste trabalho.

À Dra. Gláucia Buso, Dra. Eliane Noronha, Dr. Cléber Furlanetto pela contribuição com sugestões para o enriquecimento do meu trabalho durante a etapa de qualificação.

À Dra. Eliane Noronha, Dr. Cléber Furlanetto e Dra. Cláudia Ferreira pela disponibilidade e aceite imediato do convite para participar da minha banca.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que concedeu a bolsa de estudos, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), e ao Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – (PRONEX) pelo apoio financeiro.

**“Se sou fiel no pouco, Ele me confiará mais...”**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
LISTA DE ABREVIACES .....	12
LISTA DE FIGURAS .....	14
LISTA DE TABELAS.....	16
I. INTRODUO.....	18
1.1. Evoluo e importncia socioeconmica do gnero <i>Musa</i> .....	18
1.2. Estresses Biticos.....	19
1.2.1. Mal do Panam .....	19
1.2.2. Moko.....	20
1.2.3. Sigatoka negra .....	21
1.2.4. Sigatoka amarela.....	22
1.2.5. <i>Mycosphaerellas</i> e Sigatoka: os ciclos de doena e epidemiologia .....	23
1.3. Respostas a estresses biticos em plantas: genes e vias de defesa.....	25
1.3.1. Imunidade disparada por PAMPs .....	25
1.3.2. Imunidade disparada por efetores .....	27
1.3.3. Resistncia Sistmica Adquirida, fitormnios envolvidos em defesa e protenas PR.29	
1.3.4. Famlias de Genes de Resistncia .....	31
1.4. Melhoramento Gentico convencional .....	32
1.5. Melhoramento Gentico No convencional: Marcadores moleculares .....	33
1.5.1. Isolamento e aplicao de Marcadores SSR baseados em genes.....	36
1.6. Validao da Expresso gnica diferencial em <i>Musa ssp.</i> por RT- qPCR.....	37
II. OBJETIVOS .....	40
2.1. Objetivo Geral .....	40
2.2. Objetivos Especficos .....	40



III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1.	Bioensaio, patossistema <i>M. acuminata</i> – <i>M. musicola</i> .....	41
3.2.	Preparo de RNA total .....	42
3.3.	Sequenciamento 454 mRNA seq .....	42
3.4.	Mineração de dados 454 para busca de SSRs.....	43
3.5.	Caracterização de marcadores SSRs .....	50
3.6.	Análise de expressão de genes- candidatos envolvidos na interação <i>M. acuminata</i> – <i>M. musicola</i> por RT-qPCR .....	53
3.6.1.	Desenho de <i>primers</i> específicos para RT- qPCR e síntese de cDNA .....	53
3.6.2.	Validação da expressão de genes- candidatos envolvidos na interação <i>M. acuminata</i> – <i>M. musicola</i> por RT-qPCR.....	56
IV.	RESULTADOS.....	58
4.1.	Mineração e Caracterização de SSRs.....	58
4.2.	Análise fenética a partir de 22 genótipos diplóides de <i>Musa acuminata</i> .....	66
4.3.	Desenho de <i>primers</i> específicos para RT-qPCR .....	68
4.4.	Extração e quantificação de RNA e síntese de cDNA .....	70
4.5.	Especificidade dos <i>primers</i> desenhados para RT- qPCR .....	71
4.6.	Validação de unigenes de defesa por RT-qPCR .....	72
V.	DISCUSSÃO .....	79
5.1.	Caracterização de Marcadores SSRs gênicos e Análise Fenética .....	79
5.2.	Análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	82
VI.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	89
VII.	BIBLIOGRAFIA .....	91
VIII.	ANEXOS .....	120

## RESUMO

*Musa acuminata* (AA), espécie selvagem, cujo cruzamento com *Musa balbisiana* (BB) deu origem as bananas comestíveis atuais, é uma potencial doadora de genes de resistência a estresses bióticos, como a Sigatoka amarela causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola*. O objetivo deste estudo foi identificar locos microssatélites (SSR) identificados em genes envolvidos com resposta de defesa a doenças em bananeira, caracterizar os SSRs quanto ao polimorfismo e analisar os genes quanto a expressão diferencial durante a interação com o patógeno *M. musicola*. Foram construídas quatro bibliotecas de cDNA a partir do RNA total de 36 amostras de folha de *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* subgrupo Cavendish Grande Naine inoculadas e não inoculadas com *M. musicola*. As bibliotecas foram submetidas a sequenciamento 454 e aproximadamente 36.000 unigenes para cada genótipo foram identificados e anotados por BLASTX e KOG. A partir desses dados foi realizada uma busca de SSRs gênicos e foram desenhados pares de *primers* flanqueando os SSR utilizando o *software Primer3 plus*. Um total de 4.068 locos SSR foram identificados em Calcutta 4 e 4.095 em Cavendish Grande Naine. Destes, foram selecionados 95 locos SSR derivados de genes- candidatos envolvidos em resposta de defesa que foram caracterizados em 22 genótipos de *M. acuminata* contrastantes para a resistência as Sigatokas Negra e Amarela. Um total de 14 locos SSRs gênicos apresentaram polimorfismo (3 a 8 alelos/ loco) e PIC médio de 0,63 e foram utilizados para a análise fenética dos 22 genótipos de *M. acuminata* pelo método UPGMA. Os 14 locos SSR não foram suficientes para agrupar todos os genótipos quanto a resistência, no entanto houveram agrupamentos de genótipos resistentes com alta similaridade. A partir do subconjunto de 95 genes, foram desenhados 26 pares de *primers* específicos para a análise de expressão gênica diferencial por RT-qPCR. Os dados de expressão foram analisados no Miner e Rest para calcular a eficiência dos *primers* e expressão gênica diferencial. Vinte e dois pares de *primers* apresentaram especificidade e foram analisados por RT-qPCR em quatro *pools* de cDNA sintetizados com as amostras do bioensaio. Dos 22 genes analisados, sete foram selecionados para análise de cinética de expressão diferencial em Calcutta 4 que é um genótipo resistente. Seis genes apresentaram regulação negativa. Os marcadores SSR gênicos identificados serão importantes ferramentas para uso em programas de melhoramento genético de bananeira e seleção assistida por marcadores. A análise da expressão de genes- candidatos envolvidos com defesa no patossistema *Musa-Mycosphaerella* é de grande importância para estudos futuros de transformação genética de bananeira visando a resistência a doenças em cultivares.

**Palavras- chave: *Musa acuminata*, *Mycosphaerella musicola*, SSR, RT-qPCR.**

## **ABSTRACT**

*Musa acuminata* (AA), a wild species, which, through crossing with *Musa balbisiana* (BB) is responsible for today's edible bananas, is also a potential donor of resistance genes for biotic stresses such as Yellow Sigatoka caused by *Mycosphaerella musicola*. The objective of this study was to identify microsatellite loci (SSR) from unigenes related to defense and response to biotic stress, to characterize the SSRs for polymorphism and analyze the genes for differential expression during interaction with the pathogen *M. musicola*. Four cDNA libraries were constructed from total RNA from leaf samples of 36 *M. acuminata* Calcutta 4 and *M. acuminata* Cavendish Grande Naine plants, both non-inoculated and inoculated with *M. musicola*. The cDNA libraries were subjected to 454 sequencing and approximately 36.000 unigenes for each genotype were identified and annotated by BLASTX and KOG. From these data, a search of genic SSRs was performed and primer pairs were designed flanking the SSRs using the software Primer3 plus. A total of 4.068 SSR loci were identified in Calcutta 4 and 4.095 in Cavendish Grande Naine. Of these, 95 SSR loci were selected from candidate genes involved in defense responses and characterized in 22 *M. acuminata* genotypes contrasting in resistance to Black and Yellow Sigatokas. A total of 14 loci SSRs presented polymorphism (3-8 alleles / locus) and an average PIC value of 0.63. Employed in UPGMA phenetic analysis of the 22 *M. acuminata* genotypes, the 14 SSR loci were not sufficient to group all genotypes based upon disease resistance, although clusters with high similarity of resistant genotypes were observed. From the subset of 95 genes, 26 specific primer pairs were designed for analysis of differential gene expression by RT-qPCR. The expression data were analyzed with Rest and Miner to calculate primer efficiency and differential gene expression. Twenty-two primer pairs showed specificity and were analyzed by RT-qPCR in four pools of cDNA synthesized with the samples of the bioassay. Of the 22 genes analyzed, seven were selected for analysis of kinetics of differential expression in Calcutta 4 which is a resistant genotype. Six genes showed down regulation. The SSR gene markers identified will be important tools for use in banana breeding programs and marker assisted selection. Analysis of expression of resistance gene candidates in the pathosystem *M. acuminata*- *M. musicola* is of great importance for future studies on using genetic transformation for disease resistance development in cultivars.

**Key- words: *Musa acuminata*, *Mycosphaerella musicola*, SSR, RT-qPCR.**

## LISTA DE ABREVIACOES

**ACT2-** Actina 2

**Avr-** Avirulencia

**BAC-** Bacterial Artificial Chromosomes

**BLAST-** Basic Local Alignment Search Tool

**CAPS-** Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

**CC-** Coiled coil

**CDD-** Conserved domain database

**cDNA-** DNA complementar

**CNPMP-** Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical

**Ct** – Cycle threshold

**DAI-** Dia apos inculo

**DDD-** Digital Differential Display

**DNA-** Deoxyribonucleic Acid

**EF-** Elongation Factor

**Eff-** Eficincia

**EST-** Expressed sequence tag

**ET-** Etileno

**ETI-** Effector-triggered immunity

**ETS-** Effector-Triggered Susceptibility

**HR-** Hypersensitive response

**INDEL-** Inseres e delees

**JA-** Jasmonic Acid

**KOG-** Clusters of Eukaryotic Orthologous Proteins from Complete Eukaryotic Genomes

**LRR-** Leucine-Rich Repeat

**MAMPs-** Microbe-associated molecular patterns

**mRNA-** RNA mensageiro

**MAPK-** Mitogen-activated protein kinases

**MVSP-** Multivariate Statistical Package

**NBS-** Nucleotide Binding Site

**NCBI-** National Center for Biotechnology Information

**NGS** - Next Generation Sequencing

**NPR1-** Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes1

**nr-** Non- redundant

**NTC**- No Template Control  
**PAMPs**- Pathogen-Associated Molecular Patterns  
**pb**- Pares de bases  
**PCR**- Polymerase Chain Reaction  
**PIC**- Polymorphic Information Content  
**PR**- Pathogenesis-Related  
**PRR**- Pattern Recognition Receptor  
**PTI**- PAMP-triggered immunity  
**QTL**- Quantitative Trait Locus  
**RAPD**- Random Amplification of Polymorphic DNA  
**RFLP**- Restriction Fragment Length Polymorphism  
**RNA**- Ribonucleic acid  
**ROIs**- Reactive Oxygen Intermediates  
**RPS2**- Ribosomal Protein S 2  
**RT-qPCR**- Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction quantitative  
**TR4**- Raça Tropical 4  
**SA**- Salicylic Acid  
**SAR**- Systemic acquired resistance  
**SNP**- Single Nucleotide Polymorphism  
**SSR**- Simple Sequence Repeats  
**TBE**- Tris-borate-EDTA  
**TIP4I**- Tonoplast Intrinsic Protein  
**TIR**- Toll Interleucine Receptor  
**UBQ2**- Ubiquitina2  
**UPGMA**- Unweighted pair-group method with arithmetic mean

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Escurecimento dos vasos xilemáticos em planta afetada pelo Mal-do-Panamá. Fonte: Copyright © Embrapa, 2003.

**Figura 2.** Exsudação de pus bacteriano em pseudocaulo de bananeira. Fonte: José Roberto Vieira Junior e Daniel Medeiro.

**Figura 3.** Sintomas da Sigatoka negra: a) Sintomas iniciais (infecção na folha dois), b) Lesões enegrecidas. Fonte: Adaptado de Infobibos- Ferrari e Nogueira, 2008.

**Figura 4.** Junção das lesões causadas pela Sigatoka amarela em folha de bananeira e necrose dos tecidos. Fonte: Copyright © Embrapa, 2003.

**Figura 5.** Ciclo da Sigatoka negra. Infecção em bananeira por *M. fijiensis*. 1- esporos são dispersos pela água ou vento e atingem as folhas. 2- germinação dos esporos e infecção através dos estômatos. 3- infecções produzem estrias marrons que escurecem com a evolução da doença. 4- lesões maduras produzem estruturas sexuais (pseudotécios e espermatogônios). 5- Os ascósporos são liberados infectando outras plantas. Fonte: Bennett e Arneson, 2003.

**Figura 6.** Esquema simplificado do Sistema Imune da Planta. PTI- Imunidade desencadeada por PAMPs; ETI-Imunidade desencadeada por Efeitores. ETS- Susceptibilidade desencadeada por efetores. Fonte: Adaptado de Miller *et al.*, 2011.

**Figura 7.** Esquema do modelo em Zigue Zague. A planta detecta PAMPs ou MAMPs via PRRs e aciona PTI. O patógeno libera efetores que interferem no PTI, resultando em ETS. Um efetor é reconhecido por uma proteína NB-LRR ativando ETI que pode induzir HR. Novos isolados do patógeno podem ter adquirido ou perdido efetores podem suprimir o ETI. A seleção natural favorece novas plantas com genes NB-LRR que podem reconhecer um dos efetores recém-adquiridos, resultando novamente em ETI. Fonte: Jones e Dangl, 2006.

**Figura 8.** Curva de amplificação por PCR em tempo real. A seta vermelha indica a linha basal (*baseline*): não há produto suficiente para detectar fluorescência. A seta preta indica o Ct (Ciclo de *threshold*) ou Cq (Ciclo de quantificação). A seta verde indica a amostra controle negativo ou NTC (*No template Control*). A seta azul indica o *threshold* (corante de referência interna) Fonte: Novaes e Alves, 2004.

**Figura 9.** Desenho experimental de uma placa de 96 poços. A- Placa contendo 5 genes alvos (linhas A a E) e um gene referência (linha F) para reações feitas com os quatro *pools* de plantas. B-Placa contendo um gene alvo (linhas D,E,F,G,H) e um referência (linhas A,B,C) para reações feitas com as 18 amostras do bioensaio separadamente. Em cada poço, de cima para baixo, está indicado o número da amostra, o nome do *primer* e o número da duplicata ou triplicata técnica. NTC- *No template control*.

**Figura 10.** Abundância de motivos para repetições microssatélites trinucleotídeos em Calcutta 4 (A) e Cavendish Grande Naine (B). Fonte: adaptado de Passos *et al.*, 2013.

**Figura 11.** Abundância de motivos para repetições microssatélites dinucleotídeos em Calcutta 4 (A) e Cavendish Grande Naine (B). Fonte: adaptado de Passos *et al.*, 2013.

**Figura 12.** Amplificação do loco 2028 em 22 genótipos diplóides de *Musa acuminata*, visualizada em gel de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata. As setas indicam a progênie obtida a partir do cruzamento entre genótipos Calcutta 4 (posição 10) e Pisang Berlin (posição 12), repetidos na posição 21 e 22.

**Figura 13.** Análise fenética de 22 genótipos diplóides de *Musa acuminata* em 14 locos SSR gênicos realizada com o software MSVP pelo método UPGMA utilizando o Coeficiente de Sorensen.

**Figura 14.** Análise fenética de 22 genótipos diplóides de *Musa acuminata* em dois locos SSR gênicos, A- loco 821 e B-loco 1412 pelo método UPGMA utilizando o Coeficiente de Sorensen.

**Figura 15.** Análise eletroforética em gel de agarose 1% RNase free. M-Marcador DNA Ladder 1Kb. Nas amostras, as siglas C4 e CAV correspondem ao genótipo, o primeiro número após o genótipo corresponde ao número da planta, I- inoculada, NI- não inoculada e o último número corresponde ao dia após inóculo. Seta preta- DNA genômico. Setas azuis- RNA 28S, 18S e 5S em ordem decrescente. Seta vermelha- pequenos RNAs.

**Figura 16.** Produtos de PCR utilizando um *primer* intrônico visualizados em 18 amostras de cDNA sintetizadas com as amostras de RNA de Calcutta 4. M-Marcador DNA ladder 1Kb. 1- Controle positivo, DNA genômico. 2-19 amostras de cDNA. .

**Figura 17.** Gel de agarose 1% mostrando os produtos de PCR amplificados por 26 pares de *primers* desenhados a partir de sequências unigenes de Cacuttá 4 e Cavendish Grande Naine. Para cada *primer* o primeiro poço do gel corresponde a um DNA genômico, o poço do meio a um cDNA e o terceiro poço a um controle negativo (sem *template*); M- DNA Ladder 1Kb. ACT2, RPS2, TIP4I, UBQ2 e EF não intrônico são candidatos a gene de referência. O par de *primers* EF intrônico flanqueia uma região intrônica. O par 18CHIT= 1CHIT.

**Figura 18.** Expressão relativa (controle/inoculada) de 22 genes candidatos a genes de defesa durante a interação *M. acuminata*-*M. musicola* em Calcutta 4 (C4) e Cavendish Grande Naine (CAV). Amostras em *pools*.

**Figura 19.** Expressão relativa baseada em dados de RT-qPCR de sete genes candidatos a genes de defesa calculada em três tempos de inoculação (3,6 e 9 DAi) em plantas de Calcutta 4 no patossistema *M. acumina*- *M.musicola*. \*resultado significativo.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Famílias de proteínas PR e suas propriedades. Fonte: adaptado de Sels *et al.*, 2008). \_a- Sem atividade antimicrobiana relatada *in vitro*.

**Tabela 2.** Bioensaio e construção de quatro bibliotecas de cDNA. Para cada genótipo, Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine, controle e inoculado, há três plantas e três tempos de avaliação de expressão gênica após inóculo, totalizando 36 amostras. DAI- dia após inóculo; C4NI- Calcutta 4 não inoculado; C4I, Calcutta 4 inoculado; CAVNI- Cavendish Grande Naine não inoculado; CAVI- Cavendish Grande Naine inoculado.

**Tabela 3.** Subconjunto de 95 locos microssatélites derivados de Unigenes com função putativa de defesa em plantas e pares de *primers* desenhados para cada loco.

**Tabela 4.** Genótipos diplóides de *M. acuminata* contrastando em resistência às Sigatokas, utilizados para avaliar marcadores SSR. SSN- Susceptibilidade à Sigatoka negra; RSN- Resistência à Sigatoka negra; SSA Suscetibilidade à Sigatoka amarela; RSA- Resistência à Sigatoka amarela; \* Não há informação quanto à suscetibilidade e/ou resistência. Fonte: adaptado de Ferreira *et al.*, 2004.

**Tabela 5.** Genes com potencial expressão estável selecionados para análises de RT-qPCR.

**Tabela 6.** Marcadores microssatélites derivados de unigenes envolvidos em defesa e resposta a estresses bióticos. He- heterozigossidade esperada. Ho- Heterozigossidade observada. PIC- Conteúdo de Informação Polimórfica. \* Loco polimórfico representado na figura 12.

**Tabela 7.** *Primers* desenhados para RT- qPCR derivados de genes- candidatos envolvidos com defesa na interação *M. acuminata*- *M. musicola*.

**Tabela 8.** Resultado do PCR eletrônico com os *primers* desenhados para RT-qPCR. Os números nas colunas 3 a 15 indicam quantas vezes os *primers* anelaram em sequências de Calcutta 4, Cavendish Grande Naine e no genoma de *Musa acuminata* DH pahang. Chr-Cromossomo.

**Tabela 9.** Expressão relativa de 22 genes com provável função de defesa no Patossistema *M.acuminata*- *M. musicola*.

**Tabela 10.** Comparação entre os dados de DDD derivados de sequenciamento 454 e dados de expressão relativa por RT- qPCR no *software* REST para 10 genes derivados de sequências de Calcutta 4. NS- não significativo. SD- desvio padrão. Valores abaixo de 1- regulação negativa e valores acima de 1- regulação positiva. Resultados DDD- número de *reads*. C4I/C4NI e CAVI/ CAVNI amostra inoculada em relação a amostra controle.  $p < 0,05$ , *bootstrap* 2000 iterações. \*Comportamento de expressão semelhante no DDD e RT- qPCR.



**Tabela 11.** Comparação entre os dados de DDD derivados de sequenciamento 454 e dados de expressão relativa por RT-qPCR no *software* REST para 12 genes derivados de sequências de Cavendish Grande Naine. NS- não significativo. SD- desvio padrão. Valores abaixo de 1- regulação negativa e valores acima de 1- regulação positiva. Resultados DDD- número de *reads*. C4I/C4NI e CAVI/ CAVNI amostra inoculada sobre amostra controle.  $p < 0,05$ , *bootstrap* 2000 iterações. \*Comportamento de expressão semelhante.

**Tabela 12.** Expressão relativa baseada em dados de RT- qPCR de sete genes-candidatos envolvidos com resposta de defesa calculada em 3, 6 e 9 DAI em plantas de *M. acuminata* Calcutta 4 inoculadas com conidiósporos de *M. musicola*. SD- Desvio-padrão. Valores calculados pelo *software* REST. Valores acima de 1 são exemplos de regulação positiva, valores abaixo de 1 são exemplos de regulação negativa.

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. Evolução e importância socioeconômica do gênero *Musa*

A bananeira (*Musa* spp.) pertence à classe *Liliopsida*, subclasse *Zingiberidae*, superordem *Liliana*, ordem *Zingiberales* e família *Musaceae* (Cronquist, 1981; Belalcázar Carvajal, 1991). A família *Musaceae* inclui o gênero *Musa* (n=10 ou 11) e também o gênero *Ensete* (n=9). O Gênero *Musa* é dividido em quatro seções: *Eumusa*, *Rhodochlamys*, *Australimusa* e *Callimusa* (Cheesnam, 1947). A seção *Eumusa* inclui as espécies comestíveis, *Musa acuminata* (Colla) (AA) e *Musa balbisiana* (Colla) (BB) (Cheesnam, 1947).

Acredita-se que a partir de cruzamentos entre estas duas espécies selvagens diplóides (*M. acuminata* X *M. balbisiana*), provavelmente oriundas do sudeste do continente asiático, ocorreu a evolução de cultivares poliplóides de banana sem sementes (Simmonds e Shepherd, 1955) a exemplo da Prata Anã (AAB), Pacovan (AAB), Maçã (AAB), Cavendish Grande Naine (AAA) e Terra (AAB).

A ausência de sementes é frequentemente associada à esterilidade feminina em bananeiras triploides cultivadas, pois durante a meiose, ocorre a produção de gametas estéreis. As cultivares do subgrupo Cavendish (Nanica e Nanicão), por exemplo, não produzem sementes ao serem polinizadas com diplóides, enquanto a banana maçã produz um pequeno número de sementes que não germinam (Silva *et al.*, 1999). Entretanto, existem cultivares diplóides que não possuem sementes, sugerindo que não somente o estado triploide, como também o processo de domesticação e a intensa seleção humana a favor da partenocarpia e ausência de sementes, devem ser considerados como fatores determinantes para a ausência das mesmas (Shepherd *et al.*, 1986).

A bananeira é uma das principais monocotiledôneas fonte de alimentos no Brasil e no mundo. Por ser um fruto de baixo custo, rico em energia, sais minerais e vitaminas, a banana é parte da complementação alimentar em diversos países (Embrapa, 2009). Além disso, a cultura é explorada por pequenos produtores rurais, gerando empregos diretos e indiretos no campo, uma vez que é fonte de renda contínua para esses agricultores (Mascarenhas, 1997).

Dentre as frutíferas, a banana ocupa o segundo lugar na produção mundial (90,2 milhões de toneladas) superada apenas pela melancia (99,2 milhões de toneladas). De acordo com estimativas da FAO (2011), a Índia é o principal país produtor de banana do

mundo enquanto o Brasil ocupa a quinta posição com 6,9 milhões de toneladas produzidas representando 7,6% da produção mundial. Os estados de São Paulo, Bahia e Santa Catarina são os principais produtores de banana no Brasil, apresentando uma produção anual de 17,69%, 15,50%, 9,53%, respectivamente (IBGE, 2010).

O cultivo de bananeira exige condições climáticas favoráveis como temperatura e umidade relativa do ar elevadas e precipitações pluviais bem distribuídas (Silva *et al.*, 2004). A demanda hídrica da bananeira é de três a oito mm por dia (Moreira, 1999) e a falta de água principalmente nos períodos de formação de inflorescência e início da frutificação pode ser um fator limitante para a produção (Doorenbos e Kassam, 1994).

Além dos fatores abióticos como seca, temperaturas extremas e estresse salino (Brunini, 1984; Soto Ballester, 1992; Araújo Filho *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 2004), a bananicultura é afetada por doenças causadas por vírus, fungos, bactérias e nematóides. Dentre as doenças com maior ocorrência nas principais regiões produtoras mundiais estão, o Mal-do Panamá, o Moko, a Sigatoka negra e a Sigatoka amarela (Cordeiro e Kimati, 1997).

## **1.2. Estresses Bióticos**

### **1.2.1. Mal do Panamá**

Os primeiros relatos do Mal-do-Panamá no mundo ocorreram na Austrália em 1876 e Costa Rica em 1890. A doença, também chamada Murcha do *Fusarium*, é causada pelo patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* W. C. Snyder e H. N. Hansen. Em um período de 50 anos, a variedade Gros Michel, que foi a principal banana de exportação da América Central, foi totalmente substituída em bananais comerciais pelas variedades do subgrupo Cavendish Grande Naine (Moraes, 2012).

Com o surgimento da Raça Tropical 4 (TR4) do patógeno que afeta também as variedades do subgrupo Cavendish, a incidência do Mal-do-Panamá vem crescendo em diversas regiões produtoras de banana. Os primeiros relatos da presença da TR4 ocorreram na década de 90 na Malásia e Indonésia (Dita, 2009). Atualmente a Raça Tropical 4 tem devastado plantações em Taiwan, Malásia, Sumatra, Sulawesi, Filipinas, Vietnã, China e Austrália e está ausente na América Latina. Segundo Kimati e Galli (1980), a primeira ocorrência do Mal-do-Panamá no Brasil foi em 1930, em São Paulo, na cultivar Maçã.

A doença geralmente afeta plantas acima do quarto mês de idade (Cordeiro e Kimati, 1997). O fungo penetra pelas raízes, atinge os vasos xilemáticos e mais tarde coloniza o pseudocaule. Em seguida, estrias marrons podem ser vistas sobre e dentro das bainhas de folhas mais velhas e grandes porções do xilema assumem uma coloração marrom avermelhada (Ploetz e Pegg, 2000) (Figura 1). Conseqüentemente, as folhas murcham, secam e se quebram junto ao pseudocaule (Cordeiro *et al.*, 2005).

Stover (1972), relata a existência de dois mecanismos de resistência nas bananeiras contra *F. oxysporum* f. sp. *cubense* que impedem o avanço e a colonização da bananeira pelo patógeno: a formação de gel no xilema e a formação de tiloses. Estas são protusões da parede celular das células paravasculares através de buracos nos vasos xilemáticos. Após a formação das tiloses ocorre o espessamento de parede celular de forma mais rápida em plantas resistentes. Algumas medidas preventivas contra a doença podem ser tomadas a exemplo da correção do pH do solo, mantendo próximo a neutralidade, e utilização de mudas saudáveis e livres de nematóides que podem facilitar a entrada do patógeno. No entanto, a única medida de controle eficiente da doença é a utilização de variedades resistentes do subgrupo Cavendish (Cordeiro e Matos, 2003) em bananais onde a raça TR4 está ausente.



**Figura 1. Escurecimento dos vasos xilemáticos em planta afetada pelo Mal-do-Panamá. Fonte: Copyright © Embrapa, 2003.**

### **1.2.2. Moko**

O Moko ou Murcha bacteriana é uma doença causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (raça 2) e sua primeira ocorrência no Brasil foi relatada em 1976 no estado do Amapá na cultivar Prata (Tokeshi e Duarte, 1976). A doença pode atingir todas as partes da planta em estágio jovem e adulta (Matos *et al.*, 1996).

Em plantas jovens, uma das três folhas mais novas assume uma coloração amarela ou verde-pálida, quebrando próxima a junção do pecíolo com o limbo. Em

plantas adultas pode ser observado o amarelecimento, murcha e quebra das folhas próximo ao pseudocaule (Cordeiro *et al.*, 2004). Internamente os sintomas podem ser visualizados com um corte transversal no rizoma e pseudocaule onde pode ser observada a descoloração dos feixes vasculares na região central e a exsudação de pus bacteriano. Nos frutos ocorre a podridão seca de cor parda (Kimati *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2: Exsudação de pus bacteriano em pseudocaule de bananeira**  
**Fonte: José Roberto Vieira Junior e Daniel Medeiro**

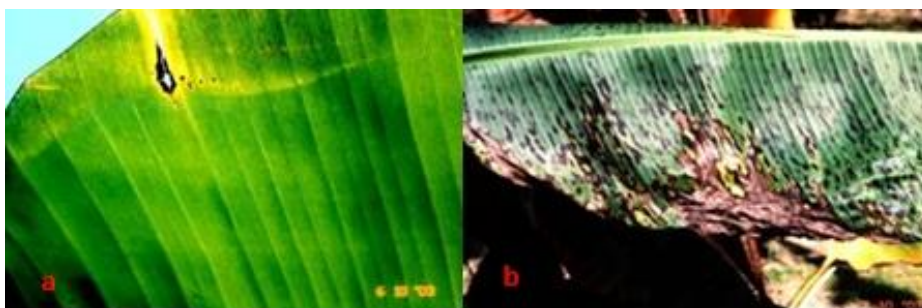
A doença pode causar perdas de até 100% da produção de banana e a principal base do controle é sua detecção precoce e a rápida erradicação das plantas infectadas e plantas adjacentes. Não existe variedade comercial resistente ao Moko, a erradicação da doença é feita mediante a aplicação de herbicida como o glifosato em plantas infectadas (Fernandes, 2005).

### **1.2.3. Sigatoka negra**

A Sigatoka negra foi identificada pela primeira vez no vale de Sigatoka, nas ilhas Fiji, em 1963. A doença é causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Paracercospora fijiensis*) e atualmente é a mais importante da bananeira nas principais regiões produtoras do mundo (Gasparotto *et al.*, 2006; Coplifé Latin América, 2012). As perdas na produção mundial são difíceis de quantificar em função das medidas de controle adotadas para redução do impacto (Coplifé Latin América, 2012). No Brasil, a Sigatoka negra foi detectada em 1998, nos municípios de Tabatinga e Benjamin Constant, no Estado do Amazonas e pode ser responsável por até 100% da perda da produção de banana (Pereira *et al.*, 1998).

A doença apresenta-se como manchas marrons nas folhas de bananeira culminando na diminuição de sua capacidade fotossintética e maturação precoce do fruto. Segundo Gasparotto *et al.* (2006), inicialmente pequenas pontuações claras ou

áreas despigmentadas são observadas, na face abaxial das folhas. As pontuações progridem dando origem a estrias de coloração marrom-clara. Essas pequenas estrias expandem radial e longitudinalmente atingindo também a face adaxial. A partir desse estágio as estrias expandem radialmente e adquirem a coloração marrom-escura na face abaxial. Em estágio mais avançado da doença, as estrias de coloração marrom-escura assumem o formato de manchas escuras. A junção de várias manchas dá ao limbo foliar uma coloração próxima à negra justificando, o nome atribuído à doença (Figura 3).



**Figura 3. Sintomas da Sigatoka negra: a) Sintomas iniciais (infecção na folha dois) b) Lesões enegrecidas. Fonte: Adaptado de Infobibos- Ferrari e Nogueira, 2008.**

Cordeiro e Kimati (1997) sugerem que algumas medidas empregadas no controle da Sigatoka amarela, também podem ser utilizadas no controle da Sigatoka negra. Porém, Gasparotto *et al.* (2006) ressaltam que o maior impacto da doença está em países da África, Ásia, América Latina e Caribe onde a banana é a base alimentar das pessoas com menor poder aquisitivo e estes não dispõem de recursos técnicos e financeiros para aplicação de fungicidas.

#### **1.2.4. Sigatoka amarela**

A Sigatoka amarela causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Leach (*Pseudocercospora musae* Zimm) foi descrita pela primeira vez em Java, Indonésia em 1902. No Brasil, foi detectada em 1944 no estado do Amazonas e estima-se que as perdas médias para a produção estão na faixa de 50% (Cordeiro e Kimati, 1997).

A doença manifesta-se como pontos mais claros entre as nervuras secundárias das folhas. Estes pontos evoluem para manchas ou estrias necróticas marrom-escuras

e posteriormente apresenta uma parte central acinzentada com um halo amarelo proeminente (Figura 4).



**Figura 4. Junção das lesões causadas pela Sigatoka amarela em folha de bananeira e necrose dos tecidos. Fonte: Copyright © Embrapa, 2003.**

As principais estratégias de controle da Sigatoka amarela, segundo Cordeiro e Kimati (1997), são as medidas de exclusão e monitoramento que visam diagnosticar e avaliar a doença a partir dos focos iniciais, estabelecendo barreiras fitossanitárias para retardar a introdução em áreas não infectadas. Uma alternativa utilizada é o controle químico realizado através da alternância de fungicidas protetores e sistêmicos. Segundo Romero e Sutton (1997) entre os fungicidas mais eficientes estão benomyl, propiconazol e o tridemorph. Porém essas medidas são ecologicamente agressivas e/ou onerosas ao produtor. São aplicadas ainda medidas de controle cultural como drenagem, combate às ervas daninhas e desfolha (Cordeiro e Kimati, 1997) e o uso de variedades resistentes.

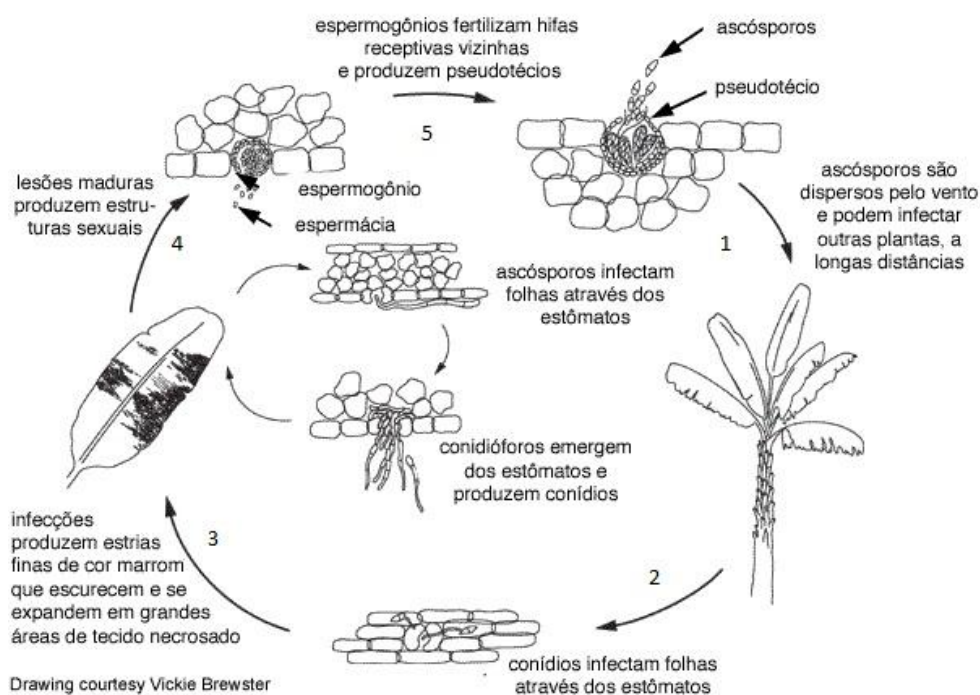
#### **1.2.5. *Mycosphaerellas* e Sigatoka: os ciclos de doença e epidemiologia**

O gênero *Mycosphaerella* Johanson pertence ao filo Ascomycota e contém cerca de 3.000 espécies (Aptroot, 2006). Fungos do gênero possuem estágios anamórficos e teliomórficos sobre a mesma lesão (Arx e Muller, 1975).

Na Sigatoka amarela, dois tipos de esporos estão envolvidos com a doença, os conídios e os ascósporos. Eles têm importâncias distintas no que se refere a epidemiologia. Quando as manchas assumem a coloração preta, são produzidos os conídios e quando seu centro se torna cinza a produção é interrompida (Cordeiro e

Kimati, 1997). Os ascósporos, por sua vez, são produzidos em ascos dentro de peritécios e disseminados quando há ocorrência de chuva.

Na Sigatoka negra, o ciclo é iniciado com a germinação dos esporos disseminados pela água ou vento (Gasparotto *et al.*, 2006) (Figura 5). Os esporos germinam emitindo tubos retos que penetram através dos estômatos (Vargas, 1996). Os primeiros sintomas são pequenas estrias de coloração marrom-claras que surgem na face adaxial das folhas. As estrias expandem e em torno de 40 dias formam manchas necróticas. Nesse estágio inicial, a hifa pode crescer intercelularmente emitindo conidióforos responsáveis pela produção de conídios, que se disseminados pelo vento podem atingir outras folhas e outras plantas. Os ascósporos são formados quando a doença se encontra na fase final, na qual a mancha adquire uma coloração cinza claro com pontos negros no centro das lesões, que são os corpos de frutificação sexual, os peritécios ou espermatogônios. Estes produzem somente uma geração de ascósporos que são disseminados quando as condições são favoráveis, como por exemplo, o período chuvoso, atingindo outras plantas. A fase sexual é a mais intensa da doença, pois a produção dos ascósporos se prolonga por vários meses em folhas mortas até sua decomposição.



**Figura 5. Ciclo da Sigatoka negra. Infecção em bananeira por *M. fijiensis*. 1- esporos são dispersos pela água ou vento e atingem as folhas. 2- germinação dos esporos e infecção através dos estômatos. 3- infecções produzem estrias marrons que escurecem com a evolução da doença. 4- lesões maduras produzem estruturas sexuais (pseudotécios e espermatogônios). 5- Os ascósporos são liberados infectando outras plantas. Fonte: Bennett e Arneson, 2003.**



### **1.3. Respostas a estresses bióticos em plantas: genes e vias de defesa**

A constante busca por materiais resistentes a doenças na agricultura tem contribuído para uniformização e estreitamento da base genética das culturas, aumentando também a pressão de seleção sobre os patógenos.

Segundo Mac Key (1986), a resistência em plantas pode ser descrita como a habilidade da planta em reduzir o estabelecimento de certas populações de patógenos através do seu sistema de defesa direto. No entanto, da mesma forma que a resistência ao patógeno é polimórfica em populações naturais de plantas, a virulência também é polimórfica em populações naturais de patógenos. Logo, a efetividade da resistência é limitada e depende de eventos de recombinação, fluxo gênico entre populações e consequentemente co-evolução planta/patógeno.

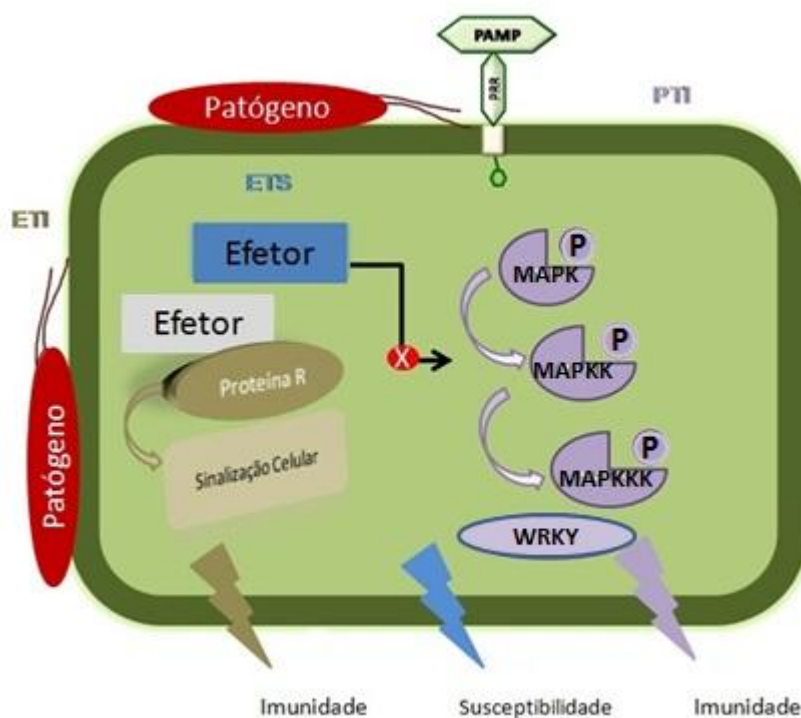
A interação planta-patógeno pode ocorrer de duas formas. Na primeira, a defesa inata da planta é ativada por PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* - PAMPs) (Jones e Dangl, 2006). O sucesso do patógeno pode suprimir a sinalização de PTI através da evolução de determinadas proteínas efetoras. Muitas vezes pode ocorrer o reconhecimento do patógeno invasor e ativação de um segundo sistema de defesa através da interação direta ou indireta entre o produto de um gene de resistência (R) presente na planta e sua proteína efetora codificada pelo patógeno (Vlot *et al.*, 2009). Este mecanismo atualmente é denominado ETI (*Effector-Triggered immunity*).

#### **1.3.1. Imunidade disparada por PAMPs**

Diferente do sistema imune dos mamíferos, composto por células especializadas em defesa, a imunidade da planta baseia-se na capacidade das células em reconhecer os patógenos (Jones e Dangl, 2006; Nicaise *et al.*, 2009). As proteínas de membrana denominadas PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) reconhecem características moleculares conservadas de uma classe de micróbios, denominadas PAMPs (Medzhitov e Janeway, 1997), ou MAMPs (*Microbe-associated molecular patterns*) no caso dessas moléculas conservadas estarem presentes em organismos não patogênicos (Boller e Felix, 2009). Originalmente conhecidos como elicitores essas moléculas são essenciais a sobrevivência do patógeno a exemplo da flagelina

bacteriana, fator de alongamento bacteriano Tu, lipopolissacarídeos, peptidoglicana,  $\beta$ -glucanos, ergosterol e quitina de fungos (Boller e Felix, 2009).

Após o reconhecimento de PAMPs por receptores da superfície celular da planta, as PRRs, o PTI é iniciado gerando a sinalização em cascata MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*). A sinalização MAPK conduz à ativação de fatores de transcrição do tipo WRKY, importantes reguladores na defesa de plantas (Eulgem e Somssich, 2007; Pandey e Somssich, 2009) (Figura 6). Durante PTI ocorre também a produção de ROIs (*Reactive Oxygen Intermediates*) (Fang, 1997) que são importantes na resposta de defesa. O momento exato dessa explosão oxidativa na seqüência de eventos de sinalização durante PTI ainda é incerto (Zhang *et al.*, 2007). Outro evento que ocorre é a deposição de calose, um polímero 1,3- $\beta$ -glucano sintetizado entre a parede celular e a membrana plasmática (Bestwick *et al.*, 1995) que reforça a parede celular da célula vegetal em locais de infecção (Nurnberger *et al.*, 2004). A ativação de PTI impede a colonização do hospedeiro pelo patógeno, o que confere resistência a vários patógenos em potencial.



**Figura 6. Esquema simplificado do Sistema Imune da Planta. PTI- Imunidade Disparada por PAMPs; ETI-Imunidade Disparada por Efetores. ETS- Susceptibilidade Disparada por Efetores. Fonte: Adaptado de Miller *et al.*, 2011.**

### 1.3.2. Imunidade disparada por efetores

Segundo Chisholm *et al.* (2006) os patógenos evoluíram em sua capacidade de suprimir as defesas primárias e as plantas, em resposta, co-evoluíram um mecanismo mais especializado que detecta organismos patogênicos, denominado ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones e Dangl, 2006) (Figura 6) conhecido anteriormente como resistência gene a gene ou raça específica. A presença de efetores, anteriormente denominados proteína de avirulência (Avr), permite que os patógenos superem PTI e são reconhecidos por genes R presentes na planta. Os genes R possuem um domínio LRR (*Leucine-Rich Repeat*), dos quais a maioria contém um domínio NBS (*Nucleotide Binding Site*) (Xiao *et al.*, 2008).

Quando um efector é reconhecido por uma proteína NBS-LRR correspondente, ocorre a ativação de ETI que envolve várias vias de transdução de sinal e muitas vezes resulta em resposta de hipersensibilidade (HR), ou seja, morte celular programada das células vegetais atacadas pelo patógeno e das células adjacentes ao local da infecção (Staskawicz *et al.*, 1995). Ocorre também a liberação de intermediários reativos de oxigênio (Lamb e Dixon, 1997) e óxido nítrico (Wendehenne *et al.*, 2004), a fortificação de paredes celular da planta, produção de metabólitos secundários antimicrobianos e proteínas relacionadas com defesa e a ativação de SAR (*Systemic acquired resistance*) (Durrant e Dong, 2004).

Em ETI, alguns tipos de interação patógeno-hospedeiro podem ocorrer. No modelo gene a gene (Flor, 1971) há uma interação direta entre a planta que possui um gene de resistência R e um patógeno com gene de avirulência (Avr) resultando em uma resposta de resistência. Caso falte o gene R na planta, ou o Avr no patógeno, a planta será suscetível a infecção. Diversos genes R e genes Avr já foram descritos (revisado por Chisholm *et al.*, 2006).

A pressão seletiva, gerada pelas respostas de defesa da planta, pode resultar em ganho, perda ou alteração desses efetores através da evolução da população. Por sua vez, o sucesso dos patógenos em superar PTI, com efetores que contribuem para a sua virulência, resulta em susceptibilidade disparada por efetores- (*ETS-Effector-Triggered Susceptibility*) (modelo zigue zague, Jones e Dangl, 2006) (Figura 7).

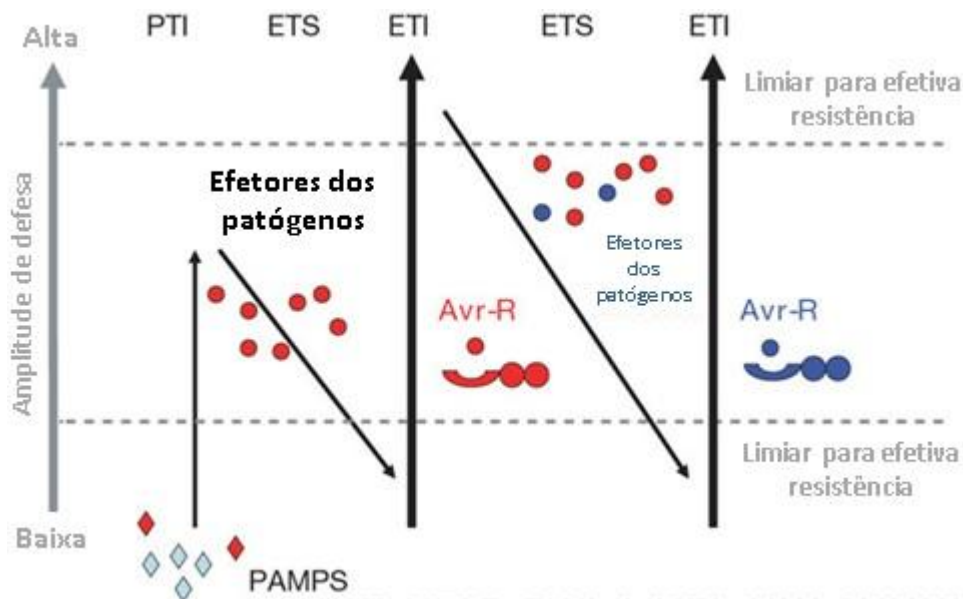


Figura 7. Esquema do modelo em Zigue Zague. A planta detecta PAMPs ou MAMPs via PRRs e aciona PTI. O patógeno libera efetores que interferem no PTI, resultando em ETS. Um efector é reconhecido por uma proteína NB-LRR ativando ETI que pode induzir HR. Novos isolados do patógeno podem ter adquirido ou perdido efetores que podem suprimir o ETI. A seleção natural favorece novas plantas com genes NB-LRR que podem reconhecer um dos efetores recém-adquiridos, resultando novamente em ETI. Fonte: Jones e Dangl, 2006.

Na hipótese de guarda (Holt *et al.* 2003), as proteínas R e Avr não interagem diretamente. A proteína R interage, ou “guarda”, outra proteína denominada *guardee*, que o é alvo da proteína Avr. Quando é detectada uma alteração na proteína *guardee* a resistência mediada por genes R é ativada (Belkhadir *et al.*, 2004). O modelo de guarda foi inicialmente proposto para explicar o patossistema *Pseudomonas syringae*-tomate através da percepção de proteínas AvrPto pelas proteínas Pto e Prf (Van der Biezen e Jones, 1998).

Pto é uma Serina/Treonina/Quinase que interage com AvrPto podendo também interagir e fosforilar uma segunda Ser/Ter/K, a Pti1, e estar ligada à transcrição de vários fatores relacionados com a defesa, Pti4, Pti5 e Pti6. Dentro do grupo de genes Pto está Fen, um homólogo de Pto que confere à planta sensibilidade ao inseticida organofosforado induzindo morte celular. Prf é uma proteína NBS-LRR necessária para o funcionamento de Pto e Fen (Oldroyd e Staskawicz, 1998).

Van der Hoorn e Kamoun (2008) sugerem na hipótese *Decoy*, mais uma vez que as proteínas R e Avr não interagem diretamente. Para que a resposta de defesa seja ativada, é necessária a presença de uma proteína do hospedeiro especializada em percepção da proteína R, mas que não exerce qualquer função no desenvolvimento de

doença ou resistência. Assim, o “chamariz” como é denominado, imita alvos efetores e atrai o agente patogênico para um evento de reconhecimento do gene R.

### **1.3.3. Resistência Sistêmica Adquirida, fitormônios envolvidos em defesa e proteínas PR.**

A resistência sistêmica adquirida (*SAR-Systemic Acquired Resistance*) é caracterizada pela ativação de defesa induzida também em partes da planta não infectadas por patógenos. SAR é eficaz contra um largo espectro de agentes patogênicos, incluindo os vírus, bactérias, fungos e oomicetos (Sticher *et al.*, 1997). Estudos com *Arabidopsis* e tabaco indicam que SAR é dependente da via de sinalização do fitormônio SA (*Salicylic Acid*- ácido salicílico) (White, 1979; Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994). Embora SA seja tipicamente importante em ETI, a indução de SAR também tem sido relatada em *Arabidopsis* com PAMPs como flagelina e lipopolissacarídeos (Mishina e Zeier, 2007).

Após a indução de SAR por SA, a proteína reguladora NPR1 (*Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes1*) é deslocada para o núcleo onde interage com os membros da subclasse TGA / OBF de fatores de transcrição bZIP (*Basic-leucine zipper domain*) que estão envolvidos na expressão de proteínas PR (*Pathogenesis-Related*) (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Fan e Dong, 2002; Dong *et al.*, 2004).

Proteínas PR foram descritas independentemente por dois trabalhos com tabaco (Van Loon e Van Kammen, 1970; Gianinazzi *et al.*, 1970). Estas proteínas são geralmente induzidas em plantas resistentes durante a resposta de hipersensibilidade (HR) na interação com vírus, fungos e bactérias. Posteriormente foi descoberto que elas são induzidas também em plantas suscetíveis a patógenos e plantas submetidas a estresses abióticos (revisado por Van Loon, 1985). Em 1980 Antoniw e colaboradores cunharam o termo “*Pathogenesis- Related*” que significa “proteínas relacionadas com a patogênese” que são definidas como proteínas codificadas pela planta, apenas em situações patológicas ou relacionadas com a patogênese (Edreva, 2005). Para ser incluída entre as PRs, uma proteína deve ser recém-expressa após a infecção, mas não necessariamente em todas as condições patológicas.

Inicialmente, cinco grupos de proteínas PR foram caracterizados. Cada grupo é composto por vários membros com propriedades semelhantes (Bol *et al.*, 1990). Atualmente, 17 grupos de proteínas PR foram descritos (Tabela 1, Sels *et al.*, 2008) sendo as mais abundantes as proteínas PR 1, as quais apresentam propriedades

antifúngicas. Do grupo PR 5, fazem parte as Taumatinas que recebem essa denominação por apresentarem homologia com proteínas de sabor adocicado da planta *Thaumatococcus daniellii*. A Osmotina está incluída no mesmo grupo. Outros exemplos de proteínas PRs são as Quitinases (PR3, PR4 e PR 11), Germina-oxalato oxidase (PR 14 e PR15) e 1-3-β Glucanases (PR2) (Edreva, 2005; Sels *et al.*, 2008).

**Tabela 1. Famílias de proteínas PR e suas propriedades.**

Família	Tipo de membro	Propriedades	Alvo microbiano proposto	Referência Original
PR-1	Tabaco PR1a	Antifúngica	Desconhecida	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-2	Tabaco PR2	beta-1,3-Glucanase	beta-1,3-Glucano	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinase (classes I, II, IV, V, VI, VI)	Quitina	Van Loon <i>et al.</i> , 1982
PR-4	Tabaco 'R'	Quitinase (classes I, II)	Quitina	Van Loon <i>et al.</i> , 1982
PR-5	Tabaco S	Similar-Taumatina	Membrana	Van Loon <i>et al.</i> , 1982
PR-6	Inibidor I de tomate	Proteinase-inibidor	_a	Green & Rayan, 1972
PR-7	Tomate P69	Endoproteinase	_a	Vera & Conejero, 1988
PR-8	Quitinase do pepineiro	Quitinase classe III	Quitina	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR-9	Formação de Lignina peroxidase de tabaco	Peroxidase	_a	Lagrimini <i>et al.</i> , 1987
PR-10	Salsa 'PR1'	Ribonuclease-similar'	_a	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR-11	Quitinase de tabaco "classe V"	Quitinase classe I	Quitina	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR-12	Rabanete Rs AFP3	Defensina	Membrana	Terras <i>et al.</i> , 1995
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Tionina	Membrana	Epple <i>et al.</i> , 1995
PR-14	Cevada LTP4	Proteínas de transferência de lipídios	Membrana	Glazebrook <i>et al.</i> , 2005
PR-15	Cevada OxOa (Germina)	Oxalato oxidase	_a	Zhang <i>et al.</i> , 1995
PR-16	Cevada OxOLP	Oxalato oxidase-similar'	_a	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR-17	Tabaco PRp27	Desconhecida	_a	Yokushima <i>et al.</i> , 2000

Fonte: adaptado de Sels *et al.*, 2008). \_a- Sem atividade antimicrobiana relatada *in vitro*.

As vias de sinalização dos fitormônios, ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), também estão envolvidas em respostas de defesa da planta. O ácido jasmônico está envolvido em efeitos sinérgicos na sinalização de JA (Niki *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2004; van Loon *et al.*, 2006).

A maioria dos patógenos biotróficos (alimentam-se de tecidos vivos) são mais sensíveis a defesas induzidas mediadas por SA, enquanto as defesas contra patógenos necrotróficos (destroem as células do hospedeiro) e insetos herbívoros são induzidas geralmente através de JA e ET (Thomma *et al.*, 2001; Kessler e Baldwin, 2002; Glazebrook, 2005).

#### 1.3.4. Famílias de Genes de Resistência

Cinco famílias de genes de resistência a estresses bióticos foram descritas até o momento (Martin *et al.*, 2003) e classificadas com base em seus domínios conservados.

A classe 1 é composta pela família NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site e Leucine-rich Repeat*) e contém o maior número de genes caracterizados. Estudos tem mostrado que a única função conhecida para esta família está na resistência a doenças (Ellis e Jones, 1998; Dangl e Jones, 2001). Acredita-se que domínio NBS está envolvido na ligação de ATP e na transdução de sinal, ativada pela presença do patógeno (Ellis e Jones, 1998; Tameling *et al.*, 2002) enquanto o domínio LRR provavelmente está envolvido no reconhecimento do patógeno na interação do produto do gene Avr com o produto R do gene (Young *et al.*, 2000).

Em plantas, proteínas NBS-LRR podem ser subdivididas nas classes TIR (*Toll Interleucine Receptor*) e não-TIR. A subclasse TIR-NBS-LRR contém um domínio aminoterminal homólogo a Toll em *Drosophilla* e uma interleucina (IL) em mamíferos (Parker *et al.*, 1997). Proteínas da subfamília não-TIR NBS LRR podem conter no N-terminal um CC (*coiled coil*) ou cauda espiralada que em muitos NBS-LRR é necessário para a interação com proteínas acessórias (Lukasik e Takken, 2009), enquanto que o domínio TIR tem sido implicado em proteínas acessórias de ligação e especificidade de reconhecimento de efetores e início da resposta de hipersensibilidade. Atualmente cerca 400 genes da família NBS LRR foram descritos em arroz com 150 deles relatados também em *Arabidopsis* (Zhou *et al.*, 2004).

A classe 2, compreende os genes R com domínios LRR extracitoplasmáticos ancorados a um domínio transmembrana. Um exemplo ocorre no patossistema tomateiro (*Lycopersicon esculentum*)- *Cladosporium fulvum*, no qual os receptores LRR são ancorados à membrana plasmática e codificados por um conjunto de genes *Cf* conferindo resistência a *C. Fulvum* (Wulff, 2009).

Na classe 3, estão incluídos os LRRs extracelulares com domínio transmembrana ligados a uma serina treonina quinase (Ser/Tre/K) no citoplasma. Song *et al.* (1995) sugerem que isso ocorre porque o domínio LRR está relacionado a recepção de estímulos externos enquanto a Ser/Tre/K está ligada as fosforilações na transdução de sinais do citoplasma para o núcleo. O gene Xa21 de arroz pertence essa família e foi caracterizado por apresentar resistência a *Xanthomonas* (Song *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis* mais de 600 genes dessa família já foram

estudados e os homólogos destes genes têm sido clonados em 20 espécies de plantas (Morris e Walker, 2003).

A classe 4 é composta pela família serina treonina quinase citoplasmática, caracterizada por apresentar uma quinase que fosforila resíduos de serina e treonina que interagem com o produto do gene AvrPto presente em *Pseudomonas syringae* (Tang *et al.*, 1999). O gene Pto presente em tomate foi o primeiro gene R dessa família a ser descrito (Martin, 2003) e é um dos mais estudados por conferir resistência contra as estirpes de *Pseudomonas syringae* que expressam AvrPto (Martin *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2002). Pto foi encontrado também em *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris* (Melotto *et al.*, 2004) e *M. acuminata* (Peraza-Echeverria *et al.*, 2007).

Na classe 5, estão os membros da família CC (*Coiled coil*) ancorado à membrana. O principal exemplo pertencente a esta família de genes, o RPW8, codifica uma redutase localizada na membrana que possui uma estrutura helicoidal sem semelhança com qualquer outro gene de resistência (Kobe e Kajava, 2001). Como resposta de defesa a invasão do patógeno *Hyaloperonospora parasítica* RPW8 presente em *Arabidopsis* ativa a produção de SA promovendo um acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que provavelmente restringe o crescimento do haustório reduzindo o dano oxidativo (Wang *et al.*, 2009) às células do hospedeiro lhe conferindo resistência (Xiao *et al.*, 2003).

#### **1.4. Melhoramento Genético convencional**

De acordo com Borém e Milach (1999), a composição genética de diversas culturas resulta do processo de domesticação e melhoramento aos quais estas foram submetidas durante os séculos. As técnicas de melhoramento genético convencional surgiram desde os primórdios da agricultura e têm sido otimizadas com os avanços no campo da estatística, bioquímica, fisiologia, genética e biologia molecular a partir do século XX.

Interesses iniciais na área de melhoramento genético de bananeira surgiram no final da década de 1920 em centros de pesquisa em Honduras, Trinidad e Tobago e Jamaica, motivados pela busca de cultivares resistentes ao Mal-do-Panamá (Shepherd, 1992). Ainda segundo Shepherd (1992), o primeiro tetraplóide de banana foi desenvolvido no início da década de 1930 a partir do cruzamento de uma cultivar triploide AAA (Gros Michel) com um diplóide AA (silvestre).



O programa de melhoramento genético da Embrapa CNPMF (Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical), Cruz das Almas - BA teve início em 1983, com a coleta de germoplasma em nível nacional e internacional (Alves, 1993; Dantas *et al.*, 1993), formando o Banco de Germoplasma de Banana, que atualmente é constituído por cerca de 300 acessos, em condições de campo (Simões e Serejo, 2011). Este programa visa desenvolver cultivares resistentes às Sigatokas Amarela e Negra, ao Mal-do-Panamá, aos nematóides e à broca-do-rizoma, cruzando triplóides (AAA) comerciais com diplóides (AA) melhorados obtidos a partir do cruzamento entre parentais férteis e resistentes a estas doenças. Os híbridos tetraplóides produzidos são selecionados em diferentes regiões produtoras de banana no país (Silva *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2005)

As espécies selvagens diplóides, Calcutta 4, Madang e Malaccensis, as cultivares Lidi, Sinwobogi, Tjau Lagada, Tuu Gia e Heva e os híbridos gerados pela Embrapa CNPMF a exemplo de F2P2, 0323-03, SH32-63, 1304 são muito utilizados em programas de melhoramento de cultivares triplóides por apresentarem resistência as Sigatokas e/ou Mal-do-Panamá (Silva *et al.*, 1997; Amorim *et al.*, 2008, Amorim ., 2009).

O uso de variedades mais produtivas e resistentes a doenças possibilita o aumento dos rendimentos agrícolas e até mesmo a redução do uso de insumos pelo produtor, ajudando a preservar a saúde humana e o meio ambiente (Brammer, 2000). Entretanto, em algumas cultivares como as do subgrupo Cavendish Grande Naine (AAA), que apresentam suscetibilidade às Sigatokas, o melhoramento genético convencional é dificultado por serem variedades triplóides estéreis (Souza Jr, 2004). Logo, no melhoramento destas torna-se indispensável a utilização de ferramentas de melhoramento genético molecular, como marcadores moleculares.

### **1.5. Melhoramento Genético Não convencional: Marcadores moleculares**

Marcadores moleculares são definidos por Ferreira e Grattapaglia (1998) como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA. Esse tipo de marcador vem sendo amplamente utilizado em análise genética com diversas finalidades, inclusive em programas de melhoramento genético. Entre outras aplicações citadas por Buso *et al* (2003) estão a identificação de clones, híbridos, estimativas de diversidade, fluxo gênico e saturação de mapas genéticos. Entre os marcadores mais utilizados estão o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified*

*Fragment Length Polymorphisms*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*).

Marcadores RAPD são marcadores dominantes, nos quais o polimorfismo é produzido provavelmente devido a inserções ou deleções na sequência de DNA que alteram o sítio de anelamento do *primer*. O polimorfismo pode ser observado pela presença ou ausência de um produto de amplificação em um loco (Williams *et al.* 1990). A técnica consiste na amplificação de fragmentos de DNA genômico por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A enzima *Taq* DNA polimerase é utilizada juntamente com um par de *primers* para a síntese de DNA *in vitro*. Os *primers* definem a região a ser replicada e após vários ciclos há produção de milhões de cópias do fragmento de interesse (Mullis, 1990).

O RAPD utiliza *primers* randômicos de aproximadamente dez bases. Uma vantagem da técnica, além do baixo custo, é que não necessita conhecimento prévio de sequência nucleotídica específica para detectar polimorfismos (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990). Uma desvantagem é a falta de reprodutibilidade dos experimentos (Kleinhofs, 1992). O marcador RAPD tem sido utilizado em diversos estudos em plantas como eucalipto, feijoeiro e arroz (Grattapaglia e Sederoff, 1994; Ferreira *et al.*, 2006; Ngezahayo *et al.*, 2007).

O polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) pode ser detectado através da digestão do DNA genômico de dois indivíduos geneticamente distintos com uma ou mais enzimas de restrição (Helentjaris *et al.*, 1986). Após eletroforese em gel de agarose, o DNA é transferido para uma membrana de nitrocelulose e hibridizado com sequências de sondas radioativas (método de Southern) (Botstein *et al.*, 1980). Ainda segundo Botstein *et al.* (1980) e Alzate-Marin *et al.* (2005), as diferenças entre os comprimentos de um fragmento de restrição específico entre indivíduos podem estar relacionadas à variação de uma ou mais bases na sequência dos sítios de restrição, resultando na perda de uma clivagem local ou na formação de uma nova ou alternativamente devido a inserções ou deleções na sequência.

Em bananeira, o uso de marcadores RAPD e RFLP foi relatado na construção de um mapa genético parcial, estudos de diversidade genética e caracterização de germoplasma (Fauré *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2004).

Marcadores AFLPs são marcadores dominantes, baseados na amplificação seletiva por PCR de fragmentos de restrição de comprimentos diferentes, obtidos a partir da digestão de DNA genômico com enzimas de restrição pré-definidas (Vos *et al.*,

1995). O DNA genômico é cortado com enzimas de restrição e os fragmentos são ligados a adaptadores específicos para cada sítio de restrição. A amplificação por PCR desses fragmentos é realizada com *primers* complementares aos adaptadores estendidos na extremidade 3' por uma base arbitrária. Uma nova amplificação é realizada utilizando um primer complementar com duas bases arbitrárias. Em seguida os fragmentos são visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida no qual é possível identificar o polimorfismo gerado nos locos pela presença de SNPs ou INDELS nos sítios de restrição. O AFLP foi utilizado em estudos em plantas como araucária, tomateiro, cana-de-açúcar, alho e bananeira (Loh *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2002; Stefenon *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2013).

Os marcadores CAPS são marcadores co-dominantes também baseados em polimorfismos criados ou eliminados por uma enzima de restrição (Konieczny e Ausubel, 1993). A presença ou ausência de um SNP ou INDELS no sítio reconhecido pela enzima de restrição cria ou elimina o polimorfismo que pode ser detectado desenhando um *primer* na região que flanqueia o SNP. Esse tipo de marcador foi utilizado em estudos com arroz (Yang *et al.*, 2012); amendoim (Gautami *et al.*, 2012), tomate (Moury *et al.*, 2000) e soja (Shu *et al.*, 2011) e é citado como promissor para utilização em seleção assistida por marcadores nessas plantas.

Os SNPs são marcadores bialélicos baseados na detecção de polimorfismo resultante da alteração de um único par de bases em uma sequência no genoma. Para que uma variação seja considerada SNP, essa deve ocorrer em pelo menos 1 % da população. Os SNPs são a forma mais abundante de variação do DNA em genomas (Brookes, 1999) e são preferidos em relação a outros marcadores genéticos devido à sua baixa taxa de mutação e alta frequência no genoma (um a cada 100-300pb). O uso dos SNPs passou a ser mais frequente pela disponibilidade de bancos de EST que reduzem os custos da descoberta desse tipo de marcador. Em plantas, os SNPs têm sido aplicados em estudos de estrutura de população e diversidade genética em milho, soja, arroz e feijoeiro (Van Inghelandt *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2013) e mapeamento genético em amendoim, mandioca, algodão e abobrinha (Nagy *et al.*, 2012; Rabbi *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Esteras *et al.*, 2012).

Os marcadores microssatélites ou SSR são sequências de um a seis pares de base que apresentam repetições em *tandem* ao longo do genoma indicados para estudos de polimorfismo (Litt e Luty, 1989). As vantagens desses marcadores sobre os outros é que são altamente informativos, polimórficos, multi-alélicos, codominantes, amplamente distribuídos pelo genoma, amplificam regiões específicas, são baseados

em PCR e demandam pequena quantidade de DNA (Morgante e Olivieri, 1993). A técnica é baseada no uso de pares de *primers*, na reação de PCR para detecção de variações em locos de sequências repetitivas.

Os SSRs têm sido aplicados em diversos estudos como, por exemplo, construção de mapas genéticos em algodão, amendoim, pimenta, morango e cacau (Allegre, 2011; Yu *et al.*, 2012; Gautami, *et al.* 2012; Mimura *et al.*, 2012; Sargent *et al.*, 2012), estudos de diversidade genética em arroz, café, maçã e cana de açúcar (Zhang *et al.*, 2011; Geleta *et al.*, 2012; Patzak *et al.*, 2012; Hameed *et al.*, 2012) e estudos de estrutura de população (Wang *et al.*, 2011; Fricano *et al.*, 2012). Devido ao alto conteúdo informacional, este tipo de marcador tem se destacado na detecção de polimorfismo visando a escolha de parentais com maior variabilidade genética, ideais para programas de melhoramento genético de plantas (Barbosa Neto, 1995).

Atualmente, existem centenas de marcadores microssatélites desenvolvidos a partir de *M. acuminata* e para *M. balbisiana*, empregados em técnicas de genotipagem, evolução e taxonomia do gênero, saturação de mapas genéticos e com potencial para seleção assistida por marcadores (Jarret *et al.*, 1994; Kaemmer *et al.*, 1997; Lagoda *et al.*, 1998; Crouch *et al.*, 1998; Creste *et al.*, 2003; Buhariwalla *et al.*, 2005; Cheung e Town, 2007; Hippolyte *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Passos *et al.*, 2012; Amorim *et al.*, 2012; Passos *et al.*, 2013).

#### **1.5.1. Isolamento e aplicação de Marcadores SSR baseados em genes**

Marcadores baseados em genes são aqueles isolados dentro ou associados a regiões gênicas em um determinado genoma. Marcadores SSRs podem ser identificados a partir de sequências de ESTs (*Expressed Sequence Tag*), genes e clones de cDNA depositados em bancos de dados públicos como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), sendo referidos como EST-SSRs ou SSR gênicos (Varshney *et al.*, 2005). Outro recurso para a identificação de SSRs são os TSAs (*Transcript Shotgun Assemblies*) que são arquivos de seqüências computacionalmente montados a partir de dados primários de ESTs ou de sequenciamento de próxima geração. Transcritomas completos são montados por métodos computacionais sem a necessidade de clonagem e sequenciamento de cDNAs. Os TSAs diferem de ESTs porque não há equivalentes físicos para as montagens (NCBI, sem data).

Apesar de ESTs e TSAs serem cada vez mais abundantes em bancos de dados públicos, para algumas espécies de plantas esses recursos ainda são limitados quando comparado com outras espécies (Dutta *et al.*, 2011).

O sequenciamento de transcrito com base em tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*) a exemplo do pirosequenciamento 454 GS FLX e o HiSeq, tem gerado um grande número de sequências unigenes montadas (TSAs) que permitem a identificação de SSR gênicos em larga escala (Dutta *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2011; Passos *et al.*, 2013). Diversos *scripts Perl* e programas de pesquisa têm sido desenvolvidos facilitando a mineração de SSRs em arquivos de sequência (Varshney *et al.*, 2005).

Segundo Blair *et al.* (2003), embora os SSR gênicos também façam parte do genoma total, essa denominação é utilizada para distingui-los dos marcadores SSRs localizados em outras regiões do genoma que não necessariamente contenham genes e cujos motivos de repetição provavelmente são menos conservados. A vantagem desses marcadores sobre os SSRs identificados aleatoriamente no genoma é que por derivarem de regiões expressas oferecem um maior potencial para estarem ligados com locos que contribuem para fenótipos agrônômicos de interesse, associação com QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e para seleção assistida por marcadores.

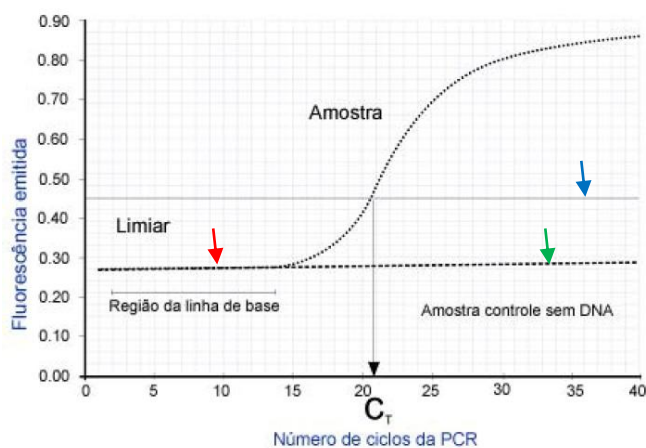
Em estudo recente (Passos *et al.*, 2012) foram identificados 75 novos marcadores SSR gênicos polimórficos desenvolvidos para *M. acuminata*, com um total de 289 alelos observados. No entanto, comparada a outras espécies vegetais, a quantidade disponível para análises ainda é limitada. Além disso, um número pequeno de SSRs gênicos foi caracterizado, pois a maioria dos SSRs em bananeira foi isolada a partir de bibliotecas genômicas ou de clones BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*).

## **1.6. Validação da Expressão gênica diferencial em *Musa ssp.* por RT- qPCR**

A análise de expressão gênica tem se tornado uma importante ferramenta na compreensão de vias de sinalização e vias metabólicas que são a base de diversos processos celulares (Zamorano *et al.*, 1996), tornou-se comum o uso da PCR em tempo real que possibilita quantificar fragmentos de DNA e cDNA.

A RT- qPCR requer um fluoróforo que se liga ao produto de amplificação e detecta a sua presença pela emissão de fluorescência. De acordo com o tipo de estudo, várias fluoróforos estão disponíveis para análises de RT- qPCR, a exemplo das sondas

*Taq man*, *beacon* e do corante *Sybr Green*, que se liga inespecificamente a qualquer fita dupla presente na reação (Morrison *et al.*, 1998). Na reação de RT- qPCR ocorrem em três fases subsequentes. Na fase 1, a *baseline* ou linha basal, não há produto suficiente para detectar fluorescência. Na fase log ou exponencial (utilizada na quantificação do produto), os produtos de amplificação dobram a cada ciclo e à medida que se acumulam esse sinal aumenta exponencialmente. Na fase platô, após vários ciclos, o sinal se estabiliza devido à falta de algum componente crítico da reação (Kubista, 2006) (Figura 8). O  $C_t$  (*Cycle Threshold*) ou  $C_q$  (Ciclo de quantificação) (Bustin *et al.*, 2009) é utilizado na quantificação da expressão relativa e é definido pelo número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação alcance níveis superiores à fluorescência basal.



**Figura 8.** Curva de amplificação por PCR em tempo real. A seta vermelha indica a linha basal (*baseline*): não há produto suficiente para detectar fluorescência. A seta preta indica o  $C_t$  (Ciclo de *threshold*) ou  $C_q$  (Ciclo de quantificação). A seta verde indica a amostra controle negativo ou NTC (*No template Control*). A seta azul indica o *threshold* (corante de referência interna) Fonte: Novaes e Alves, 2004.

Para testar a repetibilidade e aumentar a significância estatística do experimento, as reações de RT- qPCR para cada amostra, devem ser feitas em duplicata ou triplicata técnica e para cada experimento é indicado fazer também uma ou mais replicatas biológicas para validação dos resultados. O sucesso do experimento depende ainda da escolha adequada de um ou mais genes de referência para normalização dos dados. Estes genes são idealmente genes de expressão estável em diferentes células e tecidos (Huggett *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2008). No entanto, muitos estudos relatam que não existe um gene de referência ideal, que a expressão desses genes é variável de acordo com as condições experimentais e o mesmo deve

ser determinado para cada condição experimental (Morgante *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2010).

Em bananeira, poucos estudos sobre quantificação da expressão gênica por RT-qPCR foram relatados (Portal *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Mahdavi *et al.*, 2012), especialmente no contexto de expressão gênica diferencial na interação bananeira-patógenos.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Caracterizar genes-candidatos envolvidos em resposta a estresses bióticos, identificados por sequenciamento de transcrito de dois genótipos contrastantes para resistência durante a interação *Musa acuminata*-*Mycosphaerella musicola*, agente causal da Sigatoka amarela, através do desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise de expressão gênica diferencial.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Identificar marcadores microssatélites em unigenes gerados a partir de pirosequenciamento 454 de transcrito de *M. acuminata* Calcutta 4 (resistente) e *Cavendish Grande Naine* (suscetível) durante a interação com *M. musicola*;
- Determinar a função predita *in silico* de genes associados com defesa e resistência a doenças;
- Desenvolver marcadores microssatélites para genes potencialmente envolvidos em respostas de defesa do hospedeiro;
- Analisar o polimorfismo nos locos microssatélites;
- Analisar por RT-qPCR a expressão diferencial de genes-candidatos envolvidos em defesa e ao mesmo tempo contendo SSRs, em amostras controle e durante a interação *M. acuminata*- *M. musicola*.



### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Bioensaio, patossistema *M. acuminata* – *M. musicola*

A fim de desenvolver um recurso de genômica funcional para *M. acuminata*, que revele alterações transcricionais durante respostas imunes de plantas a estresses bióticos, foi realizado previamente um estudo de pirosequenciamento (Passos *et al.*, 2013), que permite a caracterização de genes expressos em genótipos de *M. acuminata* durante as reações compatíveis e incompatíveis com o fungo patogênico *M. musicola*, agente causal da Sigatoka amarela.

Para o sequenciamento foi realizado um bioensaio com 36 plantas de seis meses de idade do genótipo silvestre 'Calcutta 4' (AA, *M. acuminata* ssp. *burmannicoides*, resistente as Sigatokas, acesso ITC0654) e da cultivar comercial 'Grande Naine' (AAA, subgrupo Cavendish, suscetível, acesso ITC0249), ambos não infectados (controles) e artificialmente desafiados com conidiósporos do patógeno.

Ambas as plantas, controle e inoculadas, foram mantidas em estufa sob 12h de luz e 12h de fotoperíodo escuro a 25 ° C e humidade relativa de 85%. Uma estirpe de *M. musicola*, isolada a partir de folha de Cavendish Grande Naine proveniente da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical foi utilizada para a inoculação artificial da superfície abaxial da folha mais jovem de cada planta. A inoculação foi realizada por pulverização da folha inteira com uma suspensão de  $2 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup> de conidiósporos, com adição de surfactante Tween 20 a 0,05%. As amostras de controle foram pulverizadas com água e surfactante e incubadas sob as mesmas condições de crescimento. As folhas pulverizadas foram cobertas com sacos plásticos transparentes para garantir alta umidade.

Uma microscopia eletrônica de varredura foi realizada para confirmar germinação e infecção por *M. musicola* e utilizada para determinar os pontos de tempo para a coleta das folhas. Um total de três repetições por amostra foram preparadas para a análise. Todas as amostras foram observadas usando um microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 962. A microscopia revelou que os tubos germinais e hifas eram visíveis em menos três dias após inoculação (DAI), com crescimento de mais hifas e penetração nas células estomáticas em Cavendish Grande Naine ocorrendo em seis DAI em diante. Resultados semelhantes foram relatados por Liu *et al.* (2002), durante a interação *M. fijiensis*- *M. acuminata*. Liu e colaboradores observaram o aumento da penetração estomática em Cavendish Grande Naine em cinco DAI com um total de 11% dos estômatos penetrados em vinte e um DAI, e apenas 0,95% dos estômatos

infectados em Calcutá 4 no mesmo período. Com base nestes dados, amostras de uma folha de cada genótipo foram coletadas em três, seis e nove DAI, imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração do RNA total.

Um total de quatro bibliotecas de cDNA foram preparadas a partir do RNA total extraído das amostras de material foliar de Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine. As quatro bibliotecas foram compostas respectivamente por um *pool* dos três tempos (três, seis e nove DAI), sendo que para cada tempo foi coletado um grama de uma folha de cada uma das três plantas (Tabela 2).

**Tabela 2. Bioensaio e construção de quatro bibliotecas de cDNA. Para cada genótipo, Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine, controle e inoculado, há três plantas e três tempos de avaliação de expressão gênica após inóculo, totalizando 36 amostras. DAI- dia após inóculo; C4NI- Calcutta 4 não inoculado; C4I, Calcutta 4 inoculado; CAVNI- Cavendish Grande Naine não inoculado; CAVI- Cavendish Grande Naine inoculado.**

Número de plantas/ DAI	<i>Musa acuminata</i> Calcutá 4 (acesso ITC 0654)		<i>Musa acuminata</i> Cavendish Grande Naine (acesso ITC 0249)	
	C4NI	C4I	CAVNI	CAVI
Número de plantas (3 DAI)	3	3	3	3
Número de plantas (6 DAI)	3	3	3	3
Número de plantas (9 DAI)	3	3	3	3
<b>Total de Plantas = 36</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>

### 3.2. Preparo de RNA total

O RNA total de folhas de bananeira inoculadas e não inoculadas foi extraído previamente (Passos *et al.*, 2013) utilizando o Concert® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), baseado no protocolo descrito pelo fornecedor. O RNA total foi tratado com DNaseI (RNase *free* - Invitrogen) 1U/μL, utilizando 1 unidade para 2μg de RNA total. A análise de pureza e quantificação de RNA total foi avaliada em gel de agarose 1% e por espectrofotometria usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Posteriormente, para as análises de RT-qPCR, o RNA foi purificado com o Invisorb (Invitek, Hayward, CA, EUA) e novamente quantificado por espectrofotometria.

### 3.3. Sequenciamento 454 mRNA seq

O isolamento de RNA mensageiro, a preparação das bibliotecas de cDNA enriquecidas e o pirosequenciamento foram realizados anteriormente, em colaboração

com Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha) a partir de aproximadamente 50 µg de cada *pool* de RNA total (Passos *et al.*, 2013). As bibliotecas não-clonadas foram preparadas através de uma busca aleatória de mRNA poliA+ e fracionamento de tamanho. A PCR de emulsão e o sequenciamento foram conduzidos de acordo com protocolos convencionais, utilizando a tecnologia Roche 454 GS FLX *Titanium*. Cada uma das quatro bibliotecas foi sequenciada em um segmento de 25% de uma placa *Pico Titer*. O processamento de sequência foi realizado utilizando *Est2assembly* (<http://code.google.com/p/est2assembly/>), e a montagem foi realizada utilizando Nesoni versão 0.89 (<http://pypi.python.org/pypi/nesoni/0.89>), *WcdEST* versão 0.6.3 *WcdEST* (<http://code.google.com/p/wcdest/>) e MIRA versão 3.1 (<http://sourceforge.net/projects/mira-assembler/>). Todos os dados de processamento de sequência estão descritos em Passos *et al.* (2013). As *reads* foram montadas *de novo*, reunidas em *contigs* e *singletons* interpretados como unigenes distintos para Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine respectivamente. A partir do sequenciamento foram obtidos dados de expressão diferencial *in silico* (DDD- *Digital Differential Display*) entre as bibliotecas inoculadas e controle.

#### **3.4. Mineração de dados 454 para busca de SSRs**

Os dados de todos os *contigs* em formato FASTA foram submetidos a análise usando o programa Mreps (<http://bioinfo.lifl.fr/mreps/>) para a busca de marcadores SSRs. Para a detecção de SSRs é necessária a presença de pelo menos duas unidades de repetição (por exemplo, GC) com mais de 10 pb. O software *Primer3 plus* (Rozen e Skaletsky, 2000) foi utilizado para desenhar pares de *primers* complementares a regiões flangeadoras dos locos microssatélites.

Uma predição da função *in silico* para cada unigene foi feita usando o BLASTX (*Basic Local Alignment Search Tool*) versão 2.2.24+ (Altschul *et al.*, 1997) contra o banco NCBI nr (*National Center for Biotechnology Information*) e KOG (*Clusters of Eukaryotic Orthologous Proteins from Complete Eukaryotic Genomes*). Com base nas anotações BLASTX e descritores KOG, um subgrupo de 95 SSRs derivados de unigenes com função putativa de defesa e resposta a estresses bióticos foi selecionado para síntese de pares de *primers* (Tabela 3) e caracterizado quanto a amplificação por PCR e polimorfismo nos locos.

**Tabela 3. Subconjunto de 95 locos microssatélites derivados de Unigenes com função putativa de defesa em plantas e pares de *primers* desenhados para cada loco.**

Loco	Descrição KOG	Resultado no Blast X	Sequência de <i>primers forward/ reverse</i>
loco231	Proteína não Caracterizada	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	GAGAGTACAACGGGAGCAGC CAGCAGGCAACTCACAGGTA
loco330	Serina Treonina Quinase	Não conhecida [ <i>Zea mays</i> ]	CCAGAGTACAGGCCACCAAT TCTACCCAAAACCTTTACAA
loco608	Resultado não encontrado	Proteína de resistência a doença (CC-NBS-LRR) [ <i>Musa balbisiana</i> ]	TTTCCATCAAAGATGACCGA GGACCTAGTGACAACCACCC
loco674	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Receptor quinase do embriogênese somática [ <i>Dimocarpus longan</i> ]	TTGGATGAGGACTTTGAGGC CACCCAGTCAAGCAGCATAA
loco801	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Putativa proteína quinase semelhante receptor [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	TGTACAGCTGACTTGCCGTC TGCAAACACCTGAATGGAAG
loco821	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	GCTGTCTTCGGTTTTTGCTC TGGTAGATCGGATTCTTGCC
loco945	Germina oxalato oxidase	RecName: Full = Putativa proteína semelhante a germina 12-4; Flags: Precursor	CGATGTGTTTGTGTTCCCTG TTCTATCACAAAACAAATGCAAA
loco965	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	TGAAACTCCGATCGTTAAAGC GAAGATGGAAGATGACCCGA
loco967	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	CATCTTTGGCTTCTGTGCAA GAAGAAGTACACCGCGAAGC
loco1020	Quitinase predita	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	GAACTCAGGCTACGGTCAGG GCAGTCATTCTCGTTGTCA
loco1024	Serina Treonina Quinase	Produto de proteína não conhecida [ <i>Vitis vinifera</i> ]	ACCTTGAGAAAGGGTTGCT TGCTGCTGCTGCTTATCCTA
loco1185	Serina treonina quinase e endoribonuclease ERN1/IRE1, sensor da via de resposta a proteína desdobrada	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	AAGCGATCGAGTTGAATTGG GAGGGGCATATACAGGGTGA
loco1257	<i>Harpin</i> induzido por proteína envolvida na resposta de hipersensibilidade da planta e proteínas relacionadas com a patogênese	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	AGGAACCGGACGGTGTT GGCAGGTTGAAGCTGAACTC

loco1284	Chalcona sintase	Tipo III policetídeo sintase 2 [ <i>Musa acuminata</i> AAA]	TCTAGGGTTCTTAGCCGCAA TCACCCTCAATATGTTAGTTTGG
loco1309	Proteína quinase mitógeno- ativada	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	GTGAACTCGCAAACCTCGTGA GAGGCCAGTCTCCAAAAA
loco1392	Serina Treonina Quinase	RecName: Full =CBL-interagindo com proteína quinase 6; AltName: Fullutative CBL-interação proteína quinase [Grupo <i>Oryza sativa japonica</i> ]	AAGAAAGACGGAGAGGAGCC GCCAAATGCATTGAACACAC
loco1394	Proteína quinase quinase mitógeno- ativada (MAP2K)	MAP Quinase quinase [ <i>Oryza minuta</i> ]	TTTGGTCTGGTTGTGTTGGA CACGTCATGCAACAACACTG
loco1412	Fenilalanina e histidina amônia liase	Fenilalanina amônia liase [ <i>Musa acuminata</i> AAA Group]	TTCCCATCTGTTGAAGGAGG CTGCTGCTGTGCTTGTCTC
loco1428	Glicosil hidrolase (endo-1, 4-beta-glucanase)	Celulase [ <i>Colocasia esculenta</i> ]	TTCTGTTGCTGTGAACAAGGA AAGCCGATAAGTAGGCCGAT
loco1654	Citodromo P450 Superfamília CYP2	Trans- cinamato 4-hidroxiase [ <i>Populus tremuloides</i> ]	GGTCAGTTCAGCCTCCACAT TAATCCCATCGAACACCACA
loco1701	Chalcona sintase	Tipo III policetídeo sintase 4 [ <i>Musa acuminata</i> AAA ]	CCGATCTAGTCCGATTCCCT TAGAAGCGGCAAAGTTTCCA
loco1732	Serina Treonina Quinase	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	GAGAACCCTCGTGGAGATGT ACTGAGTTGGGAATCGTTG
loco1739	Serina Treonina Quinase	Putativa proteína de ligação ATP [ <i>Ricinus communis</i> ]	CTGACATCGTCATCACCACC TGTTGATCGTGAAGCGGTAG
loco1800	Germina oxalato oxidase	Proteína semelhante a germina [ <i>Musa acuminata</i> AAA]	CCACGATCGTCGGAGATACT AACCATGCACCGAGGTAAAC
loco2108	Proteína quinase mitógeno- ativada	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	CTGCCGCTAATATGGGTGTT TAGCTTTTACCCTGGCGTTG
loco2187	Proteína G, Subunidade beta	Putativa guanina ligação de nucleotídeos, subunidade beta da proteína [ <i>Oryza sativa japonica</i> ]	TGAGAGCAAGACCATTGTGC TCCCAGACTCTGATGGTTCC
loco2061	Glutaciona S-transferase	Glutaciona transferase III(b) [ <i>Zea mays</i> ]	CGCATCAAAGAGGGAGAAAG GAAGTCGGGCTTCTGTGAG
loco2108	Proteína quinase mitógeno- ativada	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	CTGCCGCTAATATGGGTGTT TAGCTTTTACCCTGGCGTTG
loco2112	Beta-1, 3 glucanase	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	ATCCTGATGGCACTCCTGTT CTTCCAGCCAAGATCAAAG

loco2306	Caseína-quinase (serina / treonina / tirosina-proteína quinase )	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	AAGTTGTAGGCCTGGGGTCT AAGATTCAGATTCCACTCGCA
loco2344	Proteínas relacionadas à patogênese, Grupo 5	Cadeia A Resolução da estrutura alergênica e antifúngica do fruto banana semelhante a Taumatina-proteína 1.7a	GGCACCAACTACAGGGTTGT GGATTAGCCCAAGAGAAGGC
loco2363	Fator de transcrição predito	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	CCAAGGCTCTAGGTGCTACG GTCAAGCTGCAATCTCCTCC
loco2430	Proteínas relacionadas à patogênese, Grupo 5	Cadeia A Resolução da estrutura alergênica e antifúngica do fruto banana semelhante a Taumatina-proteína 1.7a	CTTCTCTGGTGCAGCAATGG CTTCCATCGAAGGAGCAGTC
loco2477	Tirosina-quinase específica (GTP-ligada)	Proteína hipotética não conhecida [ <i>Zea mays</i> ]	GAGATAGTAGGCGCTGTCCG CAGCTACCGACAGATGAGCA
loco2496	Glutathion S-transferase	Glutathion S-transferase Cla47 [ <i>Elaeis guineensis</i> ]	CAGAAGTAGCAGACGGAGGG CAATTATAAGACTGAAAGCCAGCA
loco2708	Fenilalanina e histidina amônia liase	Fenilalanina amônia liase [ <i>Musa balbisiana</i> ]	TTACCCGCTTTACAGGTTGG TGGATCCGATCACACGATAA
loco2802	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Produto de proteína não conhecida [ <i>Vitis vinifera</i> ]	AGAGGAGTGCAGTCGTTGGT GCCATAAGAGAAGTGAGGGCG
loco2826	FOG: repetição anquirina	Proteína reguladora NPR1, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	GAAACAAGAGGTCAGCCGAG ACTAAGCTCATCCGCTGCAT
loco2884	Beta-1, 3 glucanase	Hipotética proteína [ <i>Oryza sativa Indica</i> ]	CTTTACCCCGACATCACC ACGGCAAGAAAGAGACTCCA
loco2904	Serina Treonina Quinase	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	ATTTCCAGACCCTTCCGTCT CGCCGGAGAAAACGATATTA
loco2924	Chalcona sintase	Tipo III policetídeo sintase 5 [ <i>Musa acuminata</i> grupo AAA ]	CGAGTACGGAAACATGCAGA TAGATTTGCACGCTGTGGAG
loco2947	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Produto de proteína não conhecida [ <i>Vitis vinifera</i> ]	GGTTGTGGTGTCTGCCTT ACATGCAAATTCCTCCAAGC
loco2957	Serina / treonina fosfatase proteína específica PP1, subunidade catalítica	RecName: Full = fosfatase serina / treonina proteína PP1 [ <i>Oryza sativa japonica</i> ]	CCGGTCTTCATCGCTGTAAT TCTAAGCTTTGCTTTCCCA
loco2984	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	TCTATTTGGTGGATGTGTGCAT CTGGTGAATTTGTGTCACG
loco2991	Beta-1, 3 glucanase	Glucano endo-1,3-beta-glucosidase 3 [ <i>Zea mays</i> ]	TTGTTGTCCACAGCTTCTCT GCAGGGTAAGTGCAACCATT

loco2994	Serina Treonina Quinase	Hipotética proteína [grupo <i>Oryza sativa japonica</i> ]	ATGGCACTGTTGGCATACAA TCCGTTCTCACAGATGCTTG
loco3099	Serina / treonina fosfatase	Putativa proteína fosfatase 2c [ <i>Ricinus communis</i> ]	GCCTGCTGAAAAGCAAATTC GAGGCTTCTTGAAGTGCACC
loco355	FOG: repetições ricas em leucina	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	TGAGCCACTTGAATTTGTGCG TATCCGAGTGCAATGCTGAA
loco371	Serina Treonina Quinase	Putativo receptor da proteína serina treonina quinase [ <i>Ricinus communis</i> ]	GCCGTGGACTGTGGTATCTT TGCTAAATTATTGGCAGGGC
loco475	Beta-1, 3 glucanase	Putativo precursor Glucano endo-1,3-beta-glucosidase [ <i>Ricinus communis</i> ]	CGGTGAGTGAAAACAAGGGT CGACATTACACCGATGAAC
loco642	Resultado não encontrado	Produto de proteína não conhecida [ <i>Vitis vinifera</i> ]	CCGATTCGGTCTCTTCTCTG AACGTGAACACCGCATTGTA
loco655	Modulador de resposta Giberelina / Fator de transcrição Predito	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	CCAAATCCCTGATCCATGTC GCCTTGTAGCAGAGGGTGAA
loco668	Proteína fosfatase 2A proteína associada	Não conhecida [ <i>Picea sitchensis</i> ]	CATGAACACAAGCACCAACC TGCTCTTGCTTTTTCCACCT
loco777	Fosfatase dupla especificidade	Não conhecida [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	GGCGATCGAGAGAGACAGAA GATCTCCGAGGTGATGAAA
loco801	Resultado não encontrado	P-glicoproteína 20 [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]	AGTGAGTGGGGGACAAACAG CAATGTTGTCCACATGCCTC
loco832	Beta-1, 3 glucanase	Glucano endo-1,3-beta-glucosidase 3 [ <i>Zea mays</i> ]	TTGTTGTCCACAGCTTCTCT GCAGGGTAAGTGAACCAATT
loco833	Beta-1, 3 glucanase	Glucano endo-1,3-beta-glucosidase 3 [ <i>Zea mays</i> ]	AATGGTTGCATTACCCTGC TCACCCAACTTTTTGACAG
loco868	Flavonol redutase / Cinamoil-CoA redutase	cinamil álcool desidrogenase [ <i>Elaeis guineensis</i> ]	CTCCCATTCAGAAGAGCCAC ATGCAGTGTGAAAACACCA
loco913	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Putativa proteína de ligação ATP [ <i>Ricinus communis</i> ]	TGTACAGCTGACTTGCCGTC TGCAAACACCTGAATGGAAG
loco984	Receptor semelhante a proteína quinase, contendo domínios de lectina	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	CTGCAGATCTCGTGGTGGT CACCGTCGGGACAGTAGAAT
loco1016	BolA (estresse morfogênico indozido por bactéria)-proteína relacionada	Putativo regulador de transcrição [ <i>Jatropha curcas</i> ]	TCGAGCCTTAACCCCTTCTCA CCTACTTGAACACTTTTTACTAGGTGC
loco1050	Serina Treonina Quinase	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	CTGACATCGTCATCACCACC TGTTGATCGTGAAGCGGTAG
loco1290	Flavonol redutase / cinamoil-CoA redutase	Produto de proteína não conhecida [ <i>Vitis vinifera</i> ]	CGGGTTCCAAGACCATAAGA ACCGATGTAGCCTGAACCAC

loco1310	Proteína G, Subunidade beta	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	GATTCCCTTCGAACCCTAGC GCGTCCTGGATGGTGTACTT
loco1311	Proteína G, Subunidade beta	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	AAGTACACCATCCAGGACGC TCCCAGACTCTGATGGTTCC
loco1378	<i>Harpin</i> induzido por proteína envolvida na resposta de hipersensibilidade da planta e proteínas relacionadas com a patogênese	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	GCGTCGAGGTTTAAACAAGGA TTCCCACAGTTTCCCTCAC
loco1388	Fatores de transcrição superfamília WRKY	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	CTCAAGTCATCAGGATCGCA CACAAATCAATGGCTGGATG
loco1433	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Proteína predita [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	GGACTCACGAGTCCCACAT CGGAGGCCAGTCAAGTTAAG
loco1440	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Produto de proteína não conhecida [ <i>Vitis vinifera</i> ]	CGTCCCAATTCGACCATTCT GAGAGCGAGGAAGGAGAGGT
loco1444	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Resultado não encontrado	GAGCGCTTAGGCTTCTCTCA GGTGCTTTATGCTGCTGTC
loco1480	Germina oxalato oxidase	Proteína semelhante a aermina [ <i>Chimonanthus praecox</i> ]	CGCGAACGGTGTCTACTACA TTGGACAACATGACCCGATA
loco1686	Beta-1, 3 glucanase	Resultado não encontrado	CTGCATGGGTATCTTCCACC CTTCCAGGCCAAGATCAAAG
loco1723	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Proteína quinase [ <i>Malus x domestica</i> ]	CGAGGAGTCATCCAAGAAGC CTGCCGCTAATCTCCTCCTT
loco1854	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Resultado não encontrado	TCGCTGAACCAAGAAGGACT GAAGAAGTTCGTGAGGAGG
loco1865	Quitinase predita	Quitinase putativa[ <i>Epipremnum aureum</i> ]	AGAGACAATGGCGAGGAAGA TTTGTAGCATAAGCCCCAGG
loco1967	Quitinase predita	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	GAAGTCAAGGCTACGGTCAGG GCAGTCATTCTCGTTGTCA
loco1976	A Receptor protein kinase containing LRR repeats	Proteína hipotética [grupo <i>Oryza sativa japonica</i> ]	CACCATGGAACAACGAACAG GGCTGGAGCAGTTGTAAAGG
loco2028	A Glycosyl hydrolase (endo-1, 4-beta-glucanase)	Resultado não encontrado	CGACAGAGGAAGTCAGGGAA AATCGAAAGCCTCGATAGCA
loco2056	Predicted endo-1,3-beta-glucanase	putativa hidrolase, agindo sobre o glicosil [ <i>Ricinus communis</i> ]	CAAGACCTCCTCCTTCCC ATGGGTGGATGTAAGGAGGC
loco2057	Predicted endo-1,3-beta-glucanase	putativa hidrolase, agindo sobre o glicosil [ <i>Ricinus communis</i> ]	CCTCCTTCCCTCTCAAGG GGATGGGTAGCAGAAGGTGA



loco2067	A Regulator of pathogen resistance responses of RPS2 and RPM1 genes	Proteína hipotética SORBIDRAFT [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	GGCGACGTTGAAAAGAGAG CATCAGAGTGCCGTAGACGA
loco2219	Tyrosine kinase specific for activated (GTP-bound) p21cdc42Hs	Proteína Quinase (PK) [ <i>Fagus sylvatica</i> ]	ATCCAAGCAGCTTTTGCAGT ATCCAGGTGCCTTGTACGC
loco2256	Macrophage migration inhibitory factor	Proteína luz-induzível ATLS1 [ <i>Elaeis guineensis</i> ]	ATCTCCTTTGGGAGGCAACT CTCACGTTGGTGGAAAGGTT
loco2355	Pathogenesis related proteins, group 5, and related proteins	Cadeia A Resolução da estrutura alergênica e antifúngica do fruto banana- proteína semelhante a Taumatina 1.7a	TGGTGCAGCAATGGCATC GACGTTGATGGTCCAGGTCT
loco2371	Arylacetamide deacetylase	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	GCTGATCCAGCCGTTTTTC ACATTCATTACCGCTTCCG
loco2375	A Gibberellin response modulator/Predicted Transcrição factor	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	GACTCAGAGCTCGGTTTCCA GGTTGTTGAGCCGAGAGAAG
loco2472	A Receptor protein kinase containing LRR repeats	Proteína hipotética [ <i>Zea mays</i> ]	CTCTTTCTCCTCCGCCTTCT GGTAAGGGAGTTGACACCGA
loco2595	Serina Treonina Quinase	Proteína hipotética [ <i>Oryza sativa indica</i> ]	CTCTCTTCGGCTGGATTTG TCACGAGACTGCAAAGCAAC
loco2646	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Resultado não encontrado	GGCCTAATAGCAGGGAGGTC GCTCGGCTCAGTAAATCTT
loco2830	Hidrolase amino ácido-IAA	IAA hidrolase [cultivar híbrida <i>Phalaenopsis</i> ]	ATCGTCCCTTCTTCCCTGTT GGTGACTGCAGCTGAGATAAAA
loco2853	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	Proteína hipotética [ <i>Oryza sativa japonica</i> ]	CTCTCTCTCCCTCTCGCTCA GAAGGAAGAAGGGATCGGAC
loco3025	Serina Treonina Quinase	PREDITA: proteína hipotética [ <i>Vitis vinifera</i> ]	ACCACAATCGTCGTCTACC GAACTCATAGGAGGAGGGGC
loco3153	Resultado não encontrado	Proteína de resistência tipo NBS RGC5[ <i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> ]	TTGACTTCGGAGAGCAACCT CTATCTCCAATCCGGTCAGC
loco3190	Resultado não encontrado	Putativa proteína de resistência 1 marrom <i>planthopper</i> induzida [ <i>Oryza sativa japonica</i> ]	AGATGCACTGGGGTCATTTT CCAAGGTATGAGCTGGGTGT
loco3221	Proteínas relacionadas à patogênese, Grupo 5	Cadeia A Resolução da estrutura alergênica e antifúngica do fruto banana- proteína semelhante a Taumatina proteína 1.7a	GGCACCAACTACAGGGTTGT GGATTAGCCCAAGAGAAGGC

### 3.5. Caracterização de marcadores SSRs

Para a caracterização dos 95 locos SSRs foi extraído o DNA genômico de 22 genótipos diplóides de *M. acuminata*. Esses genótipos são híbridos melhorados e silvestres, contrastantes para a resistência a estresses bióticos e provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF).

Após a extração, os DNAs de 20 genótipos foram utilizados na montagem de quatro *bulks* contrastantes para resistência à Sigatoka negra e Amarela. Alguns deles apresentam resistência e/ou suscetibilidade as duas Sigatokas simultaneamente, fazendo parte de mais de um *pool*. O *pool* 1 foi formado por genótipos resistentes à Sigatoka negra: Calcutta 4, Lidi, 0323-03, SH32-63, 1304-06 e 0116-01. O *pool* 2 foi composto por genótipos suscetíveis a Sigatoka negra: Pisang Berlin e Niyarma Yik. O *pool* 3 foi formado por genótipos resistentes à Sigatoka amarela: Calcutta 4, Burmannica, Microcarpa, Lidi, 0323-03, 1304-06, 1741-01, 9179-03, 0116-01, 1318-01 e 4279-06; e o *pool* 4 foi montado com os genótipos suscetíveis a Sigatoka amarela: Raja Uter, Tjau Lagada, F2P2, Khai Nai On, Pisang Berlin, Niyarma Yik, Sowmuk, Jaribuaya e SH32-63 (Tabela 4).

**Tabela 4. Genótipos diploides (AA) de *M. acuminata* contrastando em resistência às Sigatokas, utilizados para avaliar marcadores SSR. SSN- Susceptibilidade à Sigatoka negra; RSN- Resistência à Sigatoka negra; SSA Suscetibilidade à Sigatoka amarela; RSA- Resistência à Sigatoka amarela; \* Não há informação quanto à suscetibilidade e/ ou resistência. ? não há informação quanto a origem.**

Nº	Genótipos	SSN	RSN	SSA	RSA	Tipo	Origem
1	1741-01				x	Híbrido	Jary Buaya x (Calcutta 4 x Madang)
2	SH 32-63		x	x		Híbrido	Cedido pela FHIA-Honduras
3	4279-06				x	Híbrido	M53 x (Tui Gia x Calcutta 4)
4	1318-01				x	Híbrido	Malaccensis x Sinwobogi
5	0323-03		x		x	Híbrido	Calcutta 4 x ?
6	1304-06		x		x	Híbrido	Malaccensis x Madang
7	0116-01		x		x	Híbrido	Borneo x Guyod
8	9179-03				x	Híbrido	Borneo x Guyod
9	Burmannica				x	Silvestre	?
10	Calcuttá 4		x		x	Silvestre	?
11	Microcarpa				x	Silvestre	Myanmar
12	Pisang Berlin	x		x		Silvestre	?
13	Lidi		x		x	Silvestre	Indonésia
14	Khai Nai On			x		Silvestre	Tailândia
15	Niyarma Yik	x		x		Silvestre	Papua Nova Guiné
16	Jaribuaya			x		Silvestre	Malásia
17	Raja Uter			x		Silvestre	Indonésia
18	Sowmuk			x		Silvestre	Papua Nova Guiné
19	Tjau Lagada			x		Silvestre	Indonésia
20	F2P2			x		Silvestre	Equador
21	03115- Planta 1*	-	-	-	-	Híbrido F1	Calcuttá 4 x Pisang Berlin
22	03115- Planta 2*	-	-	-	-	Híbrido F1	Calcuttá 4 x Pisang Berlin

Fonte: adaptado de Ferreira *et al.*, 2004.

Cada reação de PCR foi realizada em um volume de 13  $\mu$ L, contendo 3 ng de DNA genômico molde, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 0,5  $\mu$ M de cada *primer*, 0,25 mg/mL de BSA (Albumina de Soro Bovino); 1,25 U de Taq polimerase, e 1 x tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com o ciclo de temperatura realizado a seguir: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, a temperatura de anelamento do *primer* por 1 min, e extensão a 72 °C durante 1 min; além de um período de extensão final de 7 min a 72 °C.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram sujeitos a eletroforese em géis de agarose 3,5% executados em tampão TBE1 X, para verificar o tamanho do fragmento amplificado, comparados com marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1Kb, e a especificidade dos pares de *primers*. Os géis foram fotografados com o auxílio do *Gel logic 200 imaging system* (KODAK®, EUA). Para os marcadores cuja amplificação não foi observada no gel, a temperatura de anelamento do par de *primer* foi diminuída até 50 °C e aqueles que apresentaram fragmentos inespecíficos a temperatura de anelamento foi elevada até 62 °C, variando dois graus a cada teste. Em alguns casos, as concentrações de  $MgCl_2$  na reação também foram alteradas em uma escala de 0,5mM, utilizando uma concentração mínima de 1,5 mM e máxima de 3,0 mM.

Para os *bulks* que apresentaram diferenças de amplificação entre si para cada loco, as reações foram repetidas com os genótipos que compõem um mesmo *bulk* separadamente, verificando se compartilham os mesmos alelos, a fim de verificar o polimorfismo nos locos e se existem alelos segregando juntamente com a resistência ou suscetibilidade. Nestas reações, foram utilizados também os genótipos Planta 1 e 2, provenientes do cruzamento entre Calcutta 4 (resistente às Sigatokas) e Pisang Berlin (suscetível às duas Sigatokas) (tabela 4). Por se tratarem de genótipos diplóides esperava-se que ambos apresentassem um alelo proveniente de cada genitor com a finalidade de garantir a especificidade nos locos.

Os tamanhos dos alelos foram estimados de acordo com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 10 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em géis desnaturantes de poliácridamida a 4% utilizando ureia 7M (Creste *et al.*, 2001; Promega, 2006). Após a revelação, os géis ficaram expostos a temperatura ambiente para secar por aproximadamente 24h, e depois foram escaneados e scoreados no computador. Os resultados foram analisados no *software PowerMarker* v3.25 (Liu e Muse, 2005) visando identificar o número de locos polimórficos, média de alelos por loco, heterozigosidade esperada e observada e o PIC (*Polymorphic Information Content*).

A heterozigosidade é uma medida de variabilidade genética. Em um determinado marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no loco marcador e depende do número de alelos e sua frequência na população. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) é a proporção de indivíduos heterozigotos nas amostras da população e pode ser calculada pela seguinte fórmula para um loco:

### **N° de heterozigotos em cada loco**

#### **Total de Indivíduos amostrados**

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) ou diversidade genética em um loco com dois alelos pode ser calculada com base nas frequências alélicas através da fórmula:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

onde  $p^2$  é a frequência do alelo p,  $q^2$  é a frequência alelo q e  $2pq$  é a frequência de heterozigotos na população (Hardy, 1908). A soma das frequências alélicas é igual a 1. Quando a  $H_e$  é superior a  $H_o$  sobre o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode-se considerar que forças evolutivas podem estar atuando na população e gerando um excesso de homozigotos.

O PIC é uma medida da eficácia de um determinado marcador de DNA para detecção de polimorfismo. O valor do PIC para cada marcador EST-SSR foi calculado utilizando a fórmula padrão abaixo (Anderson *et al.*, 1993).

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^k P_{ij}^2$$

Na fórmula,  $P_{ij}$  é a frequência do alelo j para um determinado marcador i em um conjunto de acessos e se estende ao longo da somatória de k alelos detectados para o marcador i.

Os dados genotípicos para cada genótipo, com base na presença ou ausência de cada alelo no loco SSR, foram convertidos em dados binários (codificados como 1 para a presença e 0 para ausência) e foram usados para gerar uma matriz de similaridade genética no software MVSP (Kovach, 1999) com base no coeficiente de Sorensen-Dice (Dice, 1945) dado pela fórmula:

$$S_{ij} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

onde **2a** equivale ao número de códigos para os quais ambos os genótipos (*i* e *j*) tiveram código igual a 1 (presença) ou 0 (ausência), **b** é igual ao número de códigos 1 para o genótipo *i* e 0 para o genótipo *j* e **c** é igual ao número de códigos 1 para o genótipo *j* e 0 para o genótipo *i*.

O Coeficiente de Sorensen-Dice foi escolhido por apresentar melhor eficiência, menor distorção e stress e maiores correlações em relação a outros coeficientes avaliados por Emygdio e colaboradores 2003, sendo considerado o mais adequado para estudos de diversidade genética. Este coeficiente leva em consideração a relação existente entre o número de códigos comuns e número total de códigos, quando se comparam duas amostras (Mueller-Dumbois e Ellenberg, 1974 apud Meyer, 2002). O método UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetic mean*) foi utilizado para avaliar a relação entre os genótipos avaliados contrastantes *M. acuminata*, na forma de um dendograma.

### **3.6. Análise de expressão de genes- candidatos envolvidos na interação *M. acuminata* – *M. musicola* por RT-qPCR**

#### **3.6.1. Desenho de *primers* específicos para RT- qPCR e síntese de cDNA**

Dos 95 locos SSR caracterizados foram selecionados 44, com base nos dados de amplificação por PCR, na função putativa do gene no qual se localiza o SSR e nos dados de expressão diferencial *in silico*. Dos 44 selecionados, 18 foram identificados em sequências de Calcutta 4 e 26 em Cavendish Grande Naine. Para esses genes contendo SSRs, pares de *primers* específicos foram desenhados para verificar sua expressão diferencial por RT-qPCR nas amostras do bioensaio descrito na seção 3.1.

Antes do desenho de pares de *primers*, as sequências foram submetidas dos genes candidatos a análise por BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra um banco de dados local de ESTs de *M. acuminata* e contra sequências do genoma de arroz (*Oryza sativa*) disponíveis no banco de dados público do NCBI. Em seguida, para determinar se o gene- candidato pertence a uma família gênica ou se é um gene de cópia única foi realizada uma busca de ortólogos no genoma de referência de *O.*

*sativa* utilizando as ferramentas Plaza (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>) e Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) para verificar o número de cópias de cada gene no genoma de arroz. O arroz foi escolhido por ser uma monocotiledônea com genoma de referência disponível no domínio público e pelo fato do sequenciamento do genoma de *Musa* não ter sido publicado somente após a realização do experimento.

Para garantir que os pares de *primers* para RT-qPCR fossem desenhados em regiões específicas para cada gene e fora de domínios conservados, as sequências de cDNA e protéicas foram submetidas ao banco de dados CDD (*Conserved domain database*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Este banco de dados de domínio conservado é constituído de uma coleção de alinhamentos múltiplos de sequências e é um recurso para a anotação de unidades funcionais em proteínas. Sua coleção de modelos de domínio utiliza a estrutura 3D para fornecer informações sobre sequência, estrutura e função das proteínas.

A região não conservada dos genes candidatos foi utilizada para desenho de pares de *primers*. As sequências foram submetidas ao *software Primer3plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), selecionando a opção qPCR de acordo com os parâmetros tamanho do *primer* entre 19 e 22bp, tamanho do *amplicon* entre 100 e 200pb, T<sub>m</sub> entre 55 e 62 °C e porcentagem de GC entre 45 e 55 %). Para aqueles genes cujo desenho de *primers* não foi possível com os parâmetros desejados, o *primer forward* foi desenhado dentro do domínio conservado e o *primer reverse* fora do domínio conservado.

Após o desenho dos *primers*, um PCR eletrônico foi realizado (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS/>) contra um banco contendo as sequências oriundas do sequenciamento 454 de transcrito de *M. acuminata* (*contigs* e *singlets*), as sequências gênicas de arroz recuperadas no *Phytozome* e também contra sequências do genoma de referência do duplo haplóide *M. acuminata* DH Pahang sequenciado recentemente (D'Hont *et al.*, 2012). Os pares de *primers* que anelaram apenas sob duas condições foram testados por PCR e RT-qPCR. A primeira condição foi que cada par de *primers* anelasse somente uma vez, na sequência para o qual foi desenhado e que apresentasse produto de amplificação no tamanho esperado. A segunda condição foi que o par de *primers* poderia anelar uma segunda vez, desde que não fosse em sequências provenientes de um mesmo genótipo utilizado no bioensaio, ou seja, *primers* que anelassem em duas ou mais sequências de Calcutta 4 ou duas ou mais sequências de Cavendish Grande Naine seriam descartados.

Cinco genes com potencial de expressão estável em *M. acuminata* também foram avaliados por PCR para uso como genes- referência em normalização de expressão nas análises de RT- qPCR. Eles são descritos na tabela 5.

**Tabela 5. Genes com potencial expressão estável, selecionados para análises de RT-qPCR.**

Nome do <i>primer</i>	Gene	<i>Primer forward/ reverse</i>	Produto esperado	Referência
UBQ2	Ubiquitina	GGCACCACAAACAACACAGG AGACGAGCAAGGCTTCATT	379	Chen <i>et al.</i> , 2011
RPS2	Proteínas Ribossomal S	TAGGGATTCCGACGATTGTTT TAGCGTCATCATTGGCTGGGA	84	Chen <i>et al.</i> , 2011
ACT2	Actina	CTTAGCACTTCCAGCAGATG ACACCAAAAACTACCCCGAC	137	Chen <i>et al.</i> , 2011
TIP4I	Proteína Intrínseca do Tonoplasto	GAAAGTTTATCTGTCCAAGGC TATCATTACAAGAGGAGGTGC	348	Chen <i>et al.</i> , 2011
EF	<i>Musa acuminata</i> <i>Elongation Factor</i>	AACCCCAAAATATTCCAAGG AGATTGGCACGAAAGGAATC	107	Passos <i>et al.</i> , 2013

Para as análises de RT- qPCR, o RNA total de material foliar das 36 amostras do bioensaio foi extraído com o Kit Concert de acordo com as orientações do fabricante. A integridade e quantidade (medida em nanogramas por microlitros) de RNA total em cada amostra foram estimadas respectivamente por eletroforese em gel de agarose 1% e no espectrofotômetro Nanodrop 2000. Um RNA de qualidade deverá apresentar uma curva em forma de “sino” e absorvância em torno de 260nm. O DNA genômico contaminante foi digerido com a enzima DNase I, Amp Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o mRNA transcrito reversamente utilizando a enzima Superscript™. A síntese de cDNA foi realizada para cada amostra individualmente e também para as amostras em quatro *pools* organizados por tratamento: *pool* 1- 9 amostras de Calcutta 4 não inoculado; *pool* 2 – 9 amostras de Calcutta 4 inoculado; *pool* 3 – 9 amostras de Cavendish Grande Naine não inoculado e *pool* 4 – 9 amostras de Cavendish Grande Naine inoculado.

Após a síntese de cDNA, foram realizadas reações PCR no termociclador Swift™ MaxPro Thermal Cycler (Esco, Singapore), a 95°C por 5 min, 30 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação a 95° por 1 minuto, anelamento do primer a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final por 10 minutos. O par de *primers* específico para o gene *Elongation Factor M. acuminata* flanqueando uma região intrônica (*forward* 5'CGCTTTCCTTGGTGTCA3' e *reverse* 5'ATCGCCTGTCAATCTTGGTC3') foi utilizado nas reações como controle positivo. A análise do tamanho do produto amplificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 10µg/µL possibilitou a avaliação da integridade do cDNA e a detecção de DNA genômico contaminante. Os produtos de PCR amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

A especificidade dos *primers* desenhados, tendo como alvo os genes-candidatos envolvidos em respostas de defesa e contendo SSRs, foi avaliada utilizando dois *pools* de cDNA. Um dos *pools* foi montado com amostras de cDNA de

Calcutta 4 e o outro com amostras de Cavendish Grande Naine. Para cada genótipo, o *pool* foi formado por 1µL de cada amostra de cDNA do bioensaio (18 plantas não-inoculadas e inoculadas) acrescidos de 18µL de água bidestilada. Para cada par de *primer* foram feitas três reações de PCR: uma com 0,5 µL do *pool* de cDNA diluído em 1,5 µL de água bidestilada, um controle positivo utilizando 2 µL de um DNA genômico escolhido ao acaso e um controle negativo sem o cDNA- molde (2 µL de água). Os produtos de PCR amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 10µg/µL.

### **3.6.2. Validação da expressão de genes- candidatos envolvidos na interação *M. acuminata*– *M. musicola* por RT-qPCR**

Foram feitos dois *pools* de cDNA, que foram utilizados nas reações de RT-qPCR realizadas no equipamento ABI 7300 *Real-Time PCR* System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reação de RT-qPCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 2µL de cDNA com fator de diluição 10<sup>-2</sup>, um par de *primers* (0,4 µL dos *primers forward+reverse* na concentração de 10µM) e 5µL de Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG w/ROX kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante e 2,3 µL de água bidestilada.

As condições de termociclagem utilizadas na RT-qPCR foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão do *primer* a 60°C por 60 segundos, seguido de uma curva de dissociação gerada a partir da desnaturação do *produto* amplificado pelo aumento da temperatura no fim da reação para verificar a especificidade do *primer* (95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e 95°C por 15 segundos). Cada tratamento foi testado usando um par de *primers* correspondente ao gene candidato e um par de *primers* correspondente ao gene de referência, para a normalização da expressão. Os resultados brutos dos Cts das reações de RT- qPCR foram visualizados com o *software* 7500 v.2.0.4. (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e foram considerados na quantificação da expressão relativa, (método do Ct comparativo ou 2<sup>-(ΔΔCt)</sup>).

Para os *primers* que apresentaram apenas produto de amplificação, ou seja, um único pico visualizado na curva de dissociação, foram feitas reações com os quatro *pools* de cDNA (C4NI, C4I, CAVNI, CAVI) provenientes da extração de RNA das amostras do bioensaio. Para cada amostra de gene alvo foi feita uma triplicata técnica e um controle negativo, o NTC (*No Template Control*), também em triplicata, e para cada gene referência foi feita uma duplicata técnica e um NTC em triplicata (Figura 9).



Entre os genes que apresentaram diferença de expressão entre Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine, sete foram testados com as 36 amostras de Calcutta 4 separadamente.

Os dados foram analisados no software Miner (<http://www.miner.ewindup.info/Version2>) que calcula a eficiência dos *primers* e em seguida no programa Rest (<http://www.gene-quantification.de/rest-2009-index.html>) para determinar a dos genes- alvo e se são significativamente mais ou menos expressos diferencialmente de maneira significativa nas amostras inoculadas em relação às amostras controle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pool 1 1CHIT 1ª tripl	pool 1 1CHIT 2ª tripl	pool 1 1CHIT 3ª tripl	Pool 2 1CHIT 1ª tripl	Pool 2 1CHIT 2ª tripl	Pool 2 1CHIT 3ª tripl	Pool 3 1CHIT 1ª tripl	Pool 3 1CHIT 2ª tripl	Pool 3 1CHIT 3ª tripl	Pool 4 1CHIT 1ª tripl	Pool 4 1CHIT 2ª tripl	Pool 4 1CHIT 3ª tripl
	Pool 1 2STK 1ª tripl	Pool 1 2STK 2ª tripl	Pool 1 2STK 3ª tripl	Pool 2 2STK 1ª tripl	Pool 2 2STK 2ª tripl	Pool 2 2STK 3ª tripl	Pool 3 2STK 1ª tripl	Pool 3 2STK 2ª tripl	Pool 3 2STK 3ª tripl	Pool 4 2STK 1ª tripl	Pool 4 2STK 2ª tripl	Pool 4 2STK 3ª tripl
	Pool 1 4Ger 1ª tripl	Pool 1 4Ger 2ª tripl	Pool 1 4Ger 3ª tripl	Pool 2 4Ger 1ª tripl	Pool 2 4Ger 2ª tripl	Pool 2 4Ger 3ª tripl	Pool 3 4Ger 1ª tripl	Pool 3 4Ger 2ª tripl	Pool 3 4Ger 3ª tripl	Pool 4 4Ger 1ª tripl	Pool 4 4Ger 2ª tripl	Pool 4 4Ger 3ª tripl
	Pool 1 5Sorb 1ª tripl	Pool 1 5Sorb 2ª tripl	Pool 1 5Sorb 3ª tripl	Pool 2 5Sorb 1ª tripl	Pool 2 5Sorb 2ª tripl	Pool 2 5Sorb 3ª tripl	Pool 3 5Sorb 1ª tripl	Pool 3 5Sorb 2ª tripl	Pool 3 5Sorb 3ª tripl	Pool 4 5Sorb 1ª tripl	Pool 4 5Sorb 2ª tripl	Pool 4 5Sorb 3ª tripl
	Pool 1 7Thau 1ª tripl	Pool 1 7Thau 2ª tripl	Pool 1 7Thau 3ª tripl	Pool 2 7Thau 1ª tripl	Pool 2 7Thau 2ª tripl	Pool 2 7Thau 3ª tripl	Pool 3 7Thau 1ª tripl	Pool 3 7Thau 2ª tripl	Pool 3 7Thau 3ª tripl	Pool 4 7Thau 1ª tripl	Pool 4 7Thau 2ª tripl	Pool 4 7Thau 3ª tripl
	Pool 1 EF 1ª tripl	Pool 1 EF 2ª tripl		Pool 2 EF 1ª tripl	Pool 2 EF 2ª tripl		Pool 3 EF 1ª tripl	Pool 3 EF 2ª tripl		Pool 4 EF 1ª tripl	Pool 4 EF 2ª tripl	
	NTC 1CHIT 1ª tripl	NTC 1CHIT 2ª tripl	NTC 1CHIT 3ª tripl	NTC 2STK 1ª tripl	NTC 2STK 2ª tripl	NTC 2STK 3ª tripl	NTC 4Ger 1ª tripl	NTC 4Ger 2ª tripl	NTC 4Ger 3ª tripl	NTC 5Sorb 1ª tripl	NTC 5Sorb 2ª tripl	NTC 5Sorb 3ª tripl
	NTC 7Thau 1ª tripl	NTC 7Thau 2ª tripl	NTC 7Thau 3ª tripl	NTC EF 1ª tripl	NTC EF 2ª tripl	NTC EF 3ª tripl						

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	28 EF 1a dupl.	28 EF 2a dupl.	27 EF 1a dupl.	27 EF 2a dupl.	25 EF 1a dupl.	25 EF 2a dupl.	20 EF 1a dupl.	20 EF 2a dupl.	8 EF 1a dupl.	8 EF 2a dupl.	5 EF 1a dupl.	5 EF 2a dupl.
	36 EF 1a dupl.	36 EF 2a dupl.	35 EF 1a dupl.	35 EF 2a dupl.	2 EF 1a dupl.	2 EF 2a dupl.	21 EF 1a dupl.	21 EF 2a dupl.	9 EF 1a dupl.	9 EF 2a dupl.	6 EF 1a dupl.	6 EF 2a dupl.
	17 EF 1a dupl.	17 EF 2a dupl.	34 EF 1a dupl.	34 EF 2a dupl.	18 EF 1a dupl.	18 EF 2a dupl.	1 EF 1a dupl.	1 EF 2a dupl.	10 EF 1a dupl.	10 EF 2a dupl.	7 EF 1a dupl.	7 EF 2a dupl.
	28 2STK 1a Tripl.	28 2STK 2a Tripl.	28 2STK 3a Tripl.	27 2STK 1a Tripl.	27 2STK 2a Tripl.	27 2STK 3a Tripl.	25 2STK 1a Tripl.	25 2STK 2a Tripl.	25 2STK 3a Tripl.	20 2STK 1a Tripl.	20 2STK 2a Tripl.	20 2STK 3a Tripl.
	36 2STK 1a Tripl.	36 2STK 2a Tripl.	36 2STK 3a Tripl.	35 2STK 1a Tripl.	35 2STK 2a Tripl.	35 2STK 3a Tripl.	2 2STK 1a Tripl.	2 2STK 2a Tripl.	2 2STK 3a Tripl.	21 2STK 1a Tripl.	21 2STK 2a Tripl.	21 2STK 3a Tripl.
	17 2STK 1a Tripl.	17 2STK 2a Tripl.	17 2STK 3a Tripl.	34 2STK 1a Tripl.	34 2STK 2a Tripl.	34 2STK 3a Tripl.	18 2STK 1a Tripl.	18 2STK 2a Tripl.	18 2STK 3a Tripl.	1 2STK 1a Tripl.	1 2STK 2a Tripl.	1 2STK 3a Tripl.
	8 2STK 1a Tripl.	8 2STK 2a Tripl.	8 2STK 3a Tripl.	9 2STK 1a Tripl.	9 2STK 2a Tripl.	9 2STK 3a Tripl.	10 2STK 1a Tripl.	10 2STK 2a Tripl.	10 2STK 3a Tripl.	NTC EF 1a Tripl.	NTC EF 2a Tripl.	NTC EF 3a Tripl.
	5 2STK 1a Tripl.	5 2STK 2a Tripl.	5 2STK 3a Tripl.	6 2STK 1a Tripl.	6 2STK 2a Tripl.	6 2STK 3a Tripl.	7 2STK 1a Tripl.	7 2STK 2a Tripl.	7 2STK 3a Tripl.	NTC 2STK 1a Tripl.	NTC 2STK 2a Tripl.	NTC 2STK 3a Tripl.

Figura 9. Desenho experimental de uma placa de 96 poços. A- Placa contendo 5 genes alvos (linhas A a E) e um gene referência (linha F) para reações feitas com os quatro *pools* de plantas. B-Placa contendo um gene alvo (linhas D,E,F,G,H) e um referência (linhas A,B,C) para reações feitas com as 18 amostras do bioensaio separadamente. Em cada poço, de cima para baixo, está indicado o número da amostra, o nome do *primer* e o número da duplicata ou triplicata técnica. NTC- *No template control*.

## IV. RESULTADOS

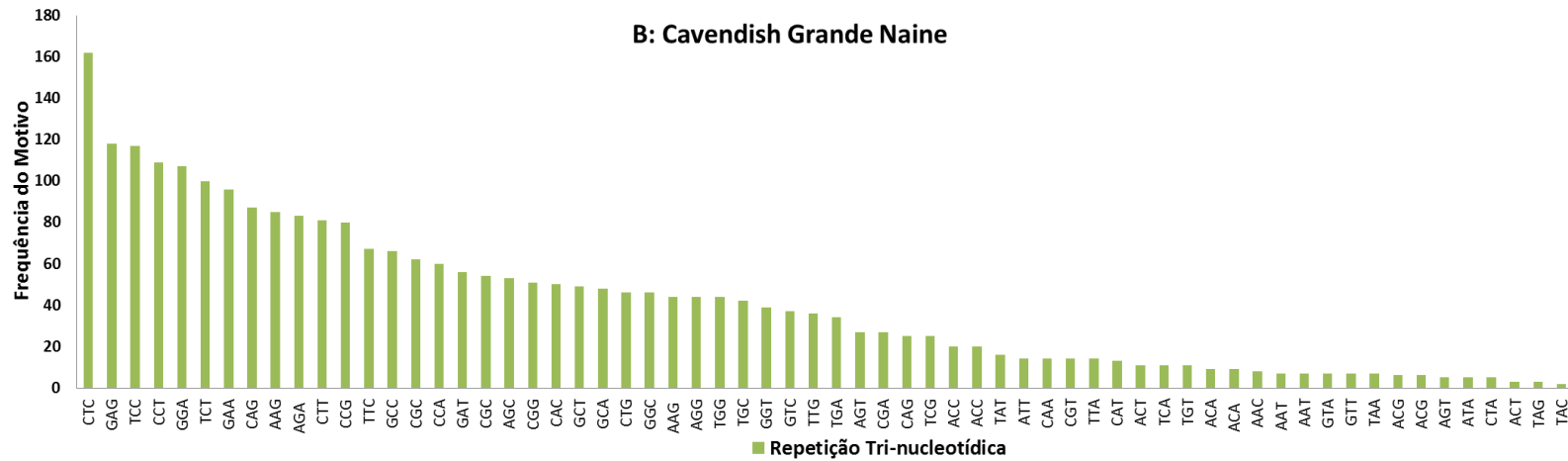
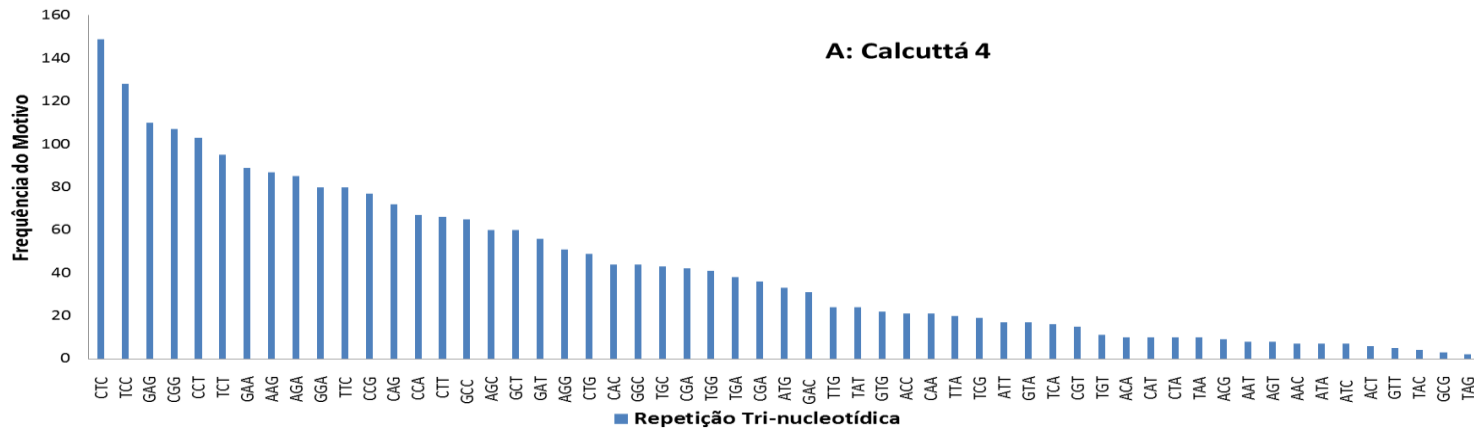
### 4.1. Mineração e Caracterização de SSRs

As sequências de Calcutta 4 foram montadas *de novo* em 36.384 sequências unigene, sendo 24.259 *contigs* e 12.125 *singletons*. Um padrão semelhante foi observado em Cavendish Grande Naine, com um total de 35.269 unigenes divididos em 23.729 *contigs* e 11.540 *singletons*. Respectivamente, 4.068 locos SSR gênicos foram identificados em Calcutta 4 e 4.095 em Cavendish Grande Naine. A repetição mais frequente em Calcutta 4 foi de trinucleotídeos (61,4%) (Figura 10A), seguido da repetição dinucleotídeo (18,26%) (Figura 11A), tetra (9,7%), hexa (5,9%) e pentanucleotídeo (3,7%) com repetições acima de heptanucleotídeo representando 1,04% do total de SSR presentes em Calcutta 4. Resultado semelhante foi observado em Cavendish Grande Naine (Figuras 10B e 11B) com SSRs trinucleotídicos representando 61,68% das repetições, seguido de di (19,4%), tetra (8,6%), hexa (5,8%) e pentanucleotídeos (3,5%) e repetições acima de heptanucleotídicas representando 1,02% do total de SSRs em unigenes de Cavendish Grande Naine. Entre as repetições trinucleotídeo, (CTC)<sup>n</sup> foi a mais abundante nos dois genótipos seguida de repetições (TCC)<sup>n</sup> e (GAG)<sup>n</sup> para Calcutta 4 e Cavendish respectivamente.

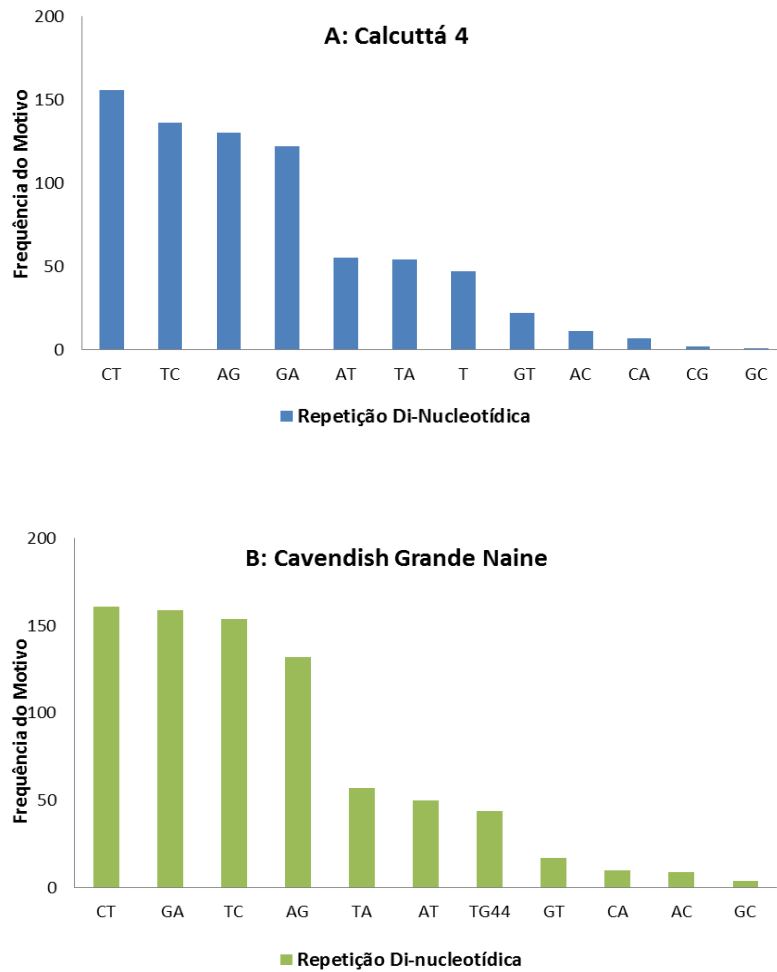
O número de repetições foi inversamente proporcional ao tamanho da repetição, variando de 7,74 repetições em dinucleotídeos a 3,63 repetições em hexanucleotídeos em Calcutta 4. De forma similar, em Cavendish Grande Naine houve uma média de 8,55 repetições dinucleotídicas e 3,70 repetições hexanucleotídicas.

Do subgrupo de 95 marcadores SSR, derivados de unigenes potencialmente relacionados com defesa, validados para a amplificação por PCR e polimorfismo nos 22 genótipos diplóides de *M. acuminata*, um total de 73 (76,8%) marcadores amplificaram no tamanho esperado. Do total inicial, 14 locos (14,7%) apresentaram polimorfismo. A figura 12 ilustra o polimorfismo no loco 2028 nos 22 genótipos diplóides de *M. acuminata*, apresentando quatro alelos visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 4% corado em nitrato de prata. Foi observado um total de 66 alelos, variando de 3 a 8 alelos por loco e média de 4,7. A *He* foi superior a *Ho*, (0,68 e 0,58 respectivamente). O PIC variou de 0,34 a 0,82, com uma média de 0,63 (Tabela 6). Vinte e dois *primers* (23,2%)

não apresentaram produto de amplificação e no loco 1480 foram observadas falhas na amplificação por PCR.



**Figura 10.** Abundância de motivos para repetições microssatélites trinucleotídeos em Calcuttá 4 (A) e Cavendish Grande Naine (B). Fonte: adaptado de Passos *et al.*, 2013



**Figura 11. Abundância de motivos para repetições microssatélites dinucleotídeos em Calcutta 4 (A) e Cavendish Grande Naine (B). Fonte: adaptado de Passos *et al.*, 2013.**



**Figura 12. Amplificação do loco 2028 em 22 genótipos diplóides de *Musa acuminata*, visualizada em gel de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata. As setas indicam a progênie obtida a partir do cruzamento entre genótipos Calcutta 4 (posição 10) e Pisang Berlin (posição 12), repetidos na posição 21 e 22.**

Tabela 6. Marcadores microssatélites derivados de unigenes envolvidos em defesa e resposta a estresses bióticos. He- heterozigosidade esperada. Ho- Heterozigosidade observada. PIC- Conteúdo de Informação Polimórfica. \* Loco polimórfico representado na figura 12.

Loco SSR	Gene-Função Putativa	Motivo de repetição	Tamanho do SSR	Amplificação por PCR	Polimorfismo	Produto esperado (pb)	Amplitude alélica	n° de alelos	He	Ho	PIC
Loco231	Proteína hipotética SORBIDRAFT[ <i>Sorghum bicolor</i> ]	CT	11	Sim	Monomórfico	373	373	1			
Loco330	Serina Treonina Quinase	TG	11	Sim	Monomórfico	214	225	1			
Loco608	Proteína de resistência a doença (CC-NBS-LRR) [ <i>Musa balbisiana</i> ]	TGC	14	Sim	Monomórfico	335	335	1			
Loco674	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	ATG	12	Sim	Monomórfico	258	260	1			
Loco801	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	ATTGA	19	Sim	Monomórfico	129	140	1			
Loco821	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	CGG	14	Sim	Polimórfico	113	170-180	3	0,61	0,52	0,53
Loco945	Germina oxalato oxidase	TGACA	17	Sim	Polimórfico	329	325-330	3	0,62	0,57	0,55
Loco965	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	AAC	12	Sim	Monomórfico	205	215	1			
Loco967	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	CTT	18	Sim	Monomórfico	161	160	1			
Loco1020	Quitinase predita	AT	11	Sim	Monomórfico	293	290	1			
Loco1024	Serina Treonina Quinase	CAC	14	Sim	Monomórfico	553	550	1			
Loco1284	Serina treonina quinase e endoribonuclease ERN1/IRE1, sensor da via de resposta a proteína desdobrada	CTA	12	Sim	Polimórfico	524	270-330	6	0,77	0,65	0,74
Loco1185	<i>Harpin</i> induzido por proteína envolvida na resposta de hipersensibilidade da planta e proteínas relacionadas com a patogênese	GCG	12	Não		374					
Loco1257	Chalcona sintase	AG	11	Não		272					
Loco1309	Proteína quinase mitógeno- ativada	TC	16	Não		456					
Loco1392	Serina Treonina Quinase	TTCGTC	18	Sim	Monomórfico	588	588	1			
Loco1394	Proteína quinase quinase mitógeno- ativada (MAP2K)	GCT	12	Não		399					
Loco1412	Fenilalanina e histidina amônia liase	TGC	15	Sim	Polimórfico	197	175-190	3	0,39	0,14	0,34
Loco1428	Glicosil hidrolase (endo-1, 4-beta-glucanase)	GAGGA	18	Sim	Monomórfico	331	331	1			
Loco1654	Citodromo P450 Superfamília CYP2	CCT	16	Sim	Polimórfico	178	170-200	5	0,70	0,71	0,66
Loco1701	Chalcona sintase	ATGT	19	Não		134					

Loco1732	Serina Treonina Quinase	AGG	17	Sim	Monomórfico	186	180	1			
Loco1739	Serina Treonina Quinase	CCT	14	Não		180					
Loco1800	Germina oxalato oxidase	CAG	12	Sim	Monomórfico	465	300	1			
Loco2108	Proteína quinase mitógeno- ativada	GA	14	Sim	Polimórfico	196	190-220	7	0,81	0,92	0,79
Loco2187	Proteína G, Subunidade beta	ACC	13	Não		144					
Loco2061	Glutaciona S-transferase	AG	19	Sim	Polimórfico	195	190-200	5	0,70	0,52	0,66
Loco2108	Proteína quinase mitógeno- ativada	GA	14	Sim	Polimórfico	196	205-230	8	0,84	0,91	0,82
Loco2112	Beta-1, 3 glucanase	GTC	18	Sim	Polimórfico	149	200-205	3	0,52	0,65	0,46
Loco2306	Caseína-quinase (serina / treonina / tirosina-proteína quinase )	TG	13	Sim	Polimórfico	181	170-185	4	0,74	0,38	0,69
Loco2344	Proteínas relacionadas à patogênese, Grupo 5	AT	19	Sim	Monomórfico	166	170	1			
Loco2363	Fator de transcrição predito	GTA	16	Sim	Monomórfico	587	587	1			
Loco2430	Proteínas relacionadas à patogênese, Grupo 5	TCC	12	Sim	Monomórfico	243	240	1			
Loco2477	Tirosina-quinase específica (GTP-ligada)	GT	18	Sim	Monomórfico	335	335	1			
Loco2496	Glutaciona S-transferase	TTCT	13	Sim	Monomórfico	596	596	1			
Loco2708	Fenilalanina e histidina amônia liase	CTGCCGC	30	Sim	Monomórfico	310	310	1			
Loco2802	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	CTT	14	Sim	Monomórfico	133	130	1			
Loco2826	FOG: repetição anquirina	CT	18	Não		429					
Loco2884	Beta-1, 3 glucanase	TCT	15	Sim	Monomórfico	276	290	1			
Loco2904	Serina Treonina Quinase	CTC	12	Sim	Monomórfico	570	570	1			
Loco2924	Chalcona sintase	CGG	12	Sim	Monomórfico	174	170	1			
Loco2947	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	CT	11	Não		320					
Loco2957	Serina / treonina fosfatase proteína específica PPI, subunidade catalítica	GATC	13	Não		406					
Loco2984	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	TCCT	13	Sim	Polimórfico	116	115-130	7	0,80	0,45	0,77
Loco2991	Beta-1, 3 glucanase	CT	19	Não		399					
Loco2994	Serina Treonina Quinase	AGA	12	Não		496					
Loco3099	Serina / treonina fosfatase	TGA	12	Não		274					
Loco355	FOG: repetições rico em leucina	GAA	12	Sim	Monomórfico	223	220	1			
Loco371	Serina Treonina Quinase	AT	12	Sim	Polimórfico	366	350-360	3	0,56	0,54	0,48
Loco475	Beta-1, 3 glucanase	CTC	17	Não		166					
Loco642	Produto de proteína não conhecida [ <i>Vitis vinifera</i> ]	TCT	12	Sim	Monomórfico	114	115	1			

Loco655	Modulador de resposta Giberelina / Fator de transcrição Predito	CTC	14	Sim	Monomórfico	211	215	1
Loco668	Proteína fosfatase 2A proteína associada	GA	12	Não		276		
Loco777	Fosfatase dupla especificidade	AG	12	Sim	Monomórfico	108	110	1
Loco801	P-glicoproteína 20 [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]	CGAGT	15	Sim	Monomórfico	551	551	1
Loco832	Beta-1, 3 glucanase	TC	16	Não		383		
Loco833	Beta-1, 3 glucanase	CCT	15	Sim	Monomórfico	314	330	1
Loco868	Flavonol redutase / Cinamoil-CoA redutase	GCGGCA	22	Não		321		
Loco913	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	ATTGA	19	Sim	Monomórfico	129	130	1
Loco984	Receptor semelhante a proteína quinase , contendo domínios de lectina	AGC	15	Sim	Monomórfico	500	500	1
Loco1016	BolA (estresse morfogênico induzido por bactéria)-proteína relacionada	AAAT	13	Sim	Monomórfico	418	420	1
Loco1050	Serina Treonina Quinase	CCT	17	Sim	Monomórfico	183	180	1
Loco1290	Flavonol redutase / cinamoil-CoA redutase	GA	26	Não		121		
Loco1310	Proteína G, Subunidade beta	CCT	22	Sim	Monomórfico	548	548	1
Loco1311	Proteína G, Subunidade beta	ACC	13	Não		515		
Loco1378	<i>Harpin</i> induzido por proteína envolvida na resposta de hipersensibilidade da planta e proteínas relacionadas com a patogênese	AT	22	Não		394		
Loco1388	Fatores de transcrição superfamilia WRKY	CGAT	13	Sim	Monomórfico	465	465	1
Loco1433	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	CTT	14	Sim	Monomórfico	263	260	1
Loco1440	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	TCC	23	Sim	Monomórfico	454	454	1
Loco1444	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	CTTC	13	Sim	Monomórfico	98	98	1
Loco1480	Germina oxalato oxidase	TC	14	Sim	Polimórfico	381	FA	-
Loco1686	Beta-1, 3 glucanase	GTC	18	Sim	Monomórfico	117	180	1
Loco1723	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	GGA	15	Sim	Monomórfico	249	240	1
Loco1854	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	TTCC	13	Sim	Monomórfico	597	597	1
Loco1865	Quitinase predita	CCG	12	Sim	Monomórfico	421	421	1
Loco1967	Quitinase predita	AT	13	Sim	Monomórfico	295	295	1

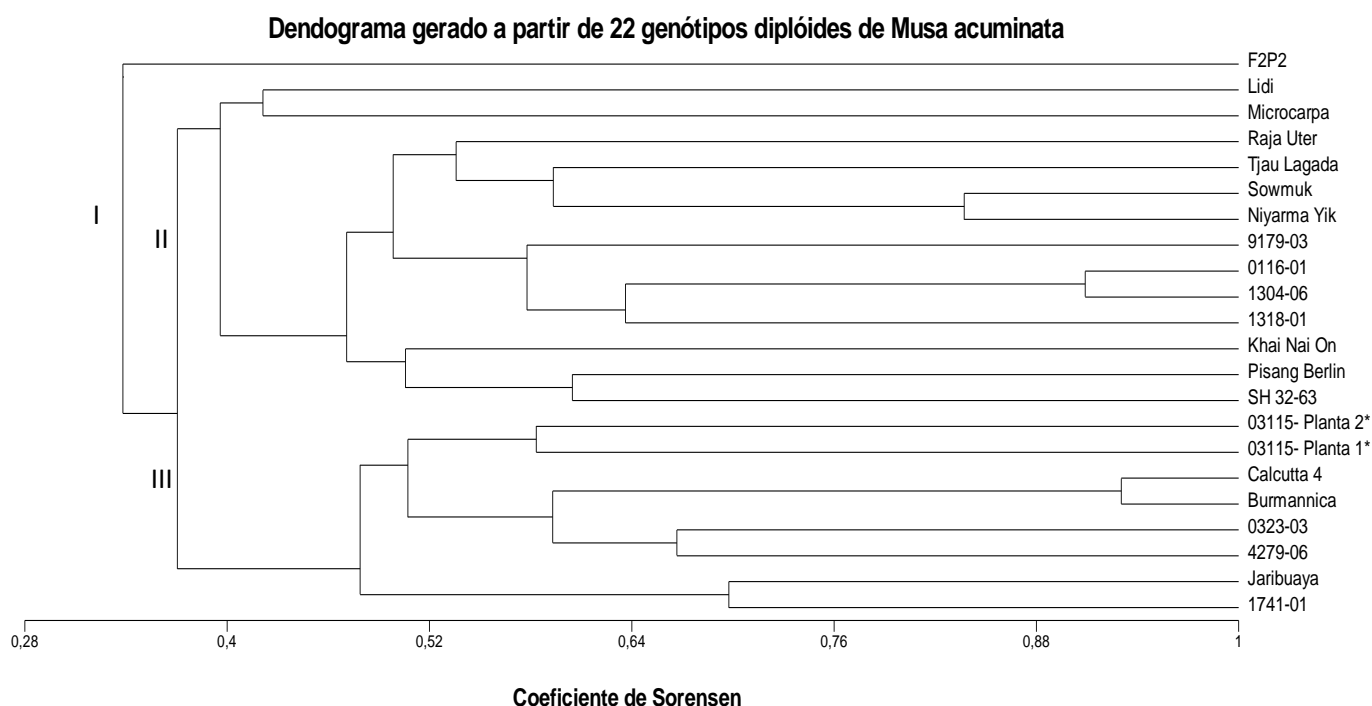


Loco1976	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	CCT	12	Sim	Monomórfico	312	312	1			
Loco2028	A Glicosil hidrolase (endo-1, 4-beta-glucanase)	CTT	17	Sim	Polimórfico	270	280-290	4	0,70	0,75	0,65
Loco2056	Predita endo-1,3-beta-glucanase	TCC	14	Sim	Monomórfico	258	300	1			
Loco2057	Predita endo-1,3-beta-glucanase	CCT	13	Sim	Monomórfico	297	300	1			
Loco2067	Regulador de resposta de resistência a patógenos e genes RPS2 e RPM1	GA	11	Não		99					
Loco2219	Tirosina quinase específica ativada por (ligação GTP)	TC	11	Não		466					
Loco2256	Fator de inibição de migração de macrófago	GA	34	Sim	Monomórfico	89	89	1			
Loco2355	Proteínas relacionadas à patogênese, Grupo 5	TCC	12	Sim	Monomórfico	178	180	1			
Loco2371	Arilacetamide deacetilase	TGG	12	Sim	Monomórfico	426	426	1			
Loco2375	Modulador de resposta Giberelina / Fator de transcrição predito	GAG	13	Sim	Monomórfico	548	458	1			
Loco2472	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	TTC	13	Sim	Monomórfico	403	403	1			
Loco2595	Serina Treonina Quinase	AGC	17	Sim	Monomórfico	511	511	1			
Loco2646	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	TTC	18	Sim	Polimórfico	209	200-220	5	0,73	0,30	0,68
Loco2830	Hidrolase amino ácido-IAA	TAT	12	Sim	Monomórfico	493	493	1			
Loco2853	Receptor proteína quinase contendo repetições LRR	CTC	14	Sim	Monomórfico	202	210	1			
Loco3025	Serina Treonina Quinase	CTC	12	Sim	Monomórfico	388	388	1			
Loco3153	Proteína de resistência tipo NBS RGC5[ <i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> ]	CCTG	17	Sim	Monomórfico	281	280	1			
Loco3190	Putativa proteína de resistência 1 marrom <i>planthopper</i> induzida [ <i>Oryza sativa japonica</i> ]	GA	19	Sim	Monomórfico	317	330	1			
Loco3221	Proteínas relacionadas à patogênese, Grupo 5	AT	14	Sim	Monomórfico	157	160	1			
Médias								4,71	0,68	0,58	0,63

#### 4.2. Análise fenética a partir de 22 genótipos diplóides de *Musa acuminata*

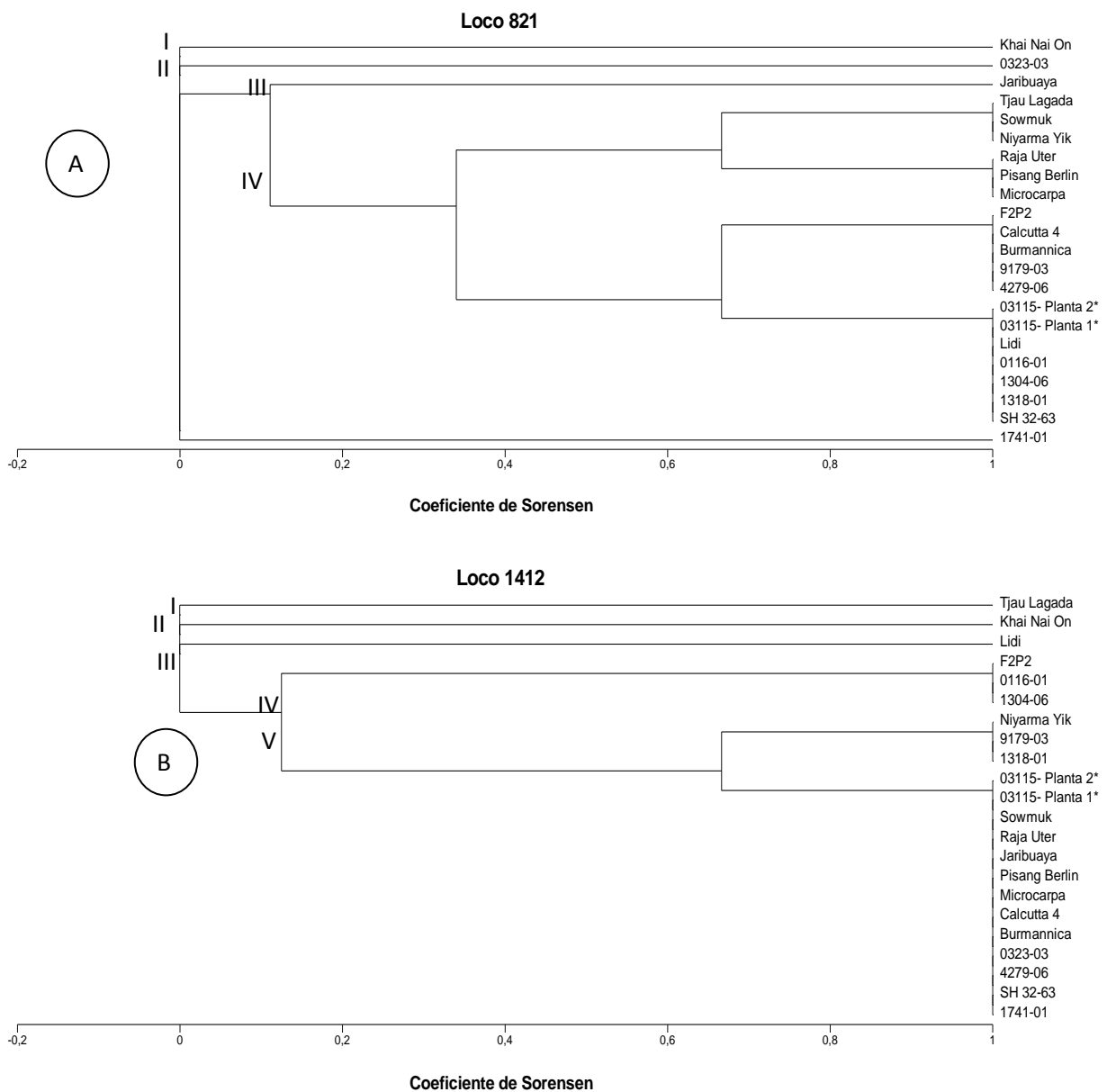
A análise fenética realizada a partir dos 66 alelos identificados nos 14 locos SSR polimórficos, mostrou que três *clusters* maiores foram montados com similaridade de aproximadamente 0,34. No *cluster* um ficou apenas o genótipo F2P2 que apresentou o menor índice de similaridade em relação a todos os outros genótipos (0,34) (Figura 13). O *cluster* dois foi formado por 13 genótipos. Os híbridos 0116-01 e 1304-06, apresentaram alta similaridade genética (0,90). O genótipo que apresentou maior similaridade (0,63) com estes foi 1318-01, seguido de 9179-03 (0,58), todos estes resistentes as Sigatokas (Tabela 4). Sowmuk e Niyarma Yik apresentaram similaridade de 0,84 entre si. O genótipo mais próximo destes foi Tjau Lagada, com 0,6 e o segundo mais próximo, foi Raja Uter, com 0,53.

O *cluster* três foi formado por oito genótipos: Planta 1 e Planta 2, 1741-01, 4279-06, 0323-03, Jaribuaya, Burmannica e Calcutta 4. Os dois últimos apresentaram similaridade de 0,93 entre si. O grau de similaridade entre Planta1 e planta2, que são progênies resultantes do cruzamento entre Calcutta 4 e Pisang Berlin, foi de 0,58. Nos locos, 945, 1284, 2108 e 2061, esses genótipos apresentaram alelos ausentes nos genitores. Quando esses locos foram excluídos das análises, a similaridade entre os dois genótipos foi de 0,81.



**Figura 13.** Análise fenética de 22 genótipos diplóides de *Musa acuminata* em 14 locos SSR gênicos realizada no software MVSP pelo método UPGMA utilizando o Coeficiente de Sorensen.

Quando os 14 locos foram analisados separadamente, o loco 821 apresentou 4 agrupamentos principais. A maioria dos genótipos resistentes mostrou alto grau de similaridade entre si e ficou em um mesmo *cluster*, o IV separados em 4 *subclusters*. Uma exceção foi F2P2 que é um genótipo suscetível às Sigatokas e para esse loco foi agrupado com Calcutta 4, Burmannica, 9179-03 e 4279-06 que são resistentes. Resultado semelhante ocorreu no loco 1214, para o qual dos 13 genótipos agrupados no *subcluster* pertencente ao *cluster* V, apenas Sowmuk e Raja Uter são suscetíveis, (Figura 14 A e B). Planta 1 e 2 também fizeram parte deste *subcluster* apresentaram similaridade 1 entre si nesses locos dois locos.



**Figura 14. Análise fenética de 22 genótipos diplóides de *Musa acuminata* em dois locos SSR gênicos, A- loco 821 e B-loco 1412 pelo método UPGMA utilizando o Coeficiente de Sorensen.**

### 4.3. Desenho de *primers* específicos para RT-qPCR

Das 44 sequências de cDNA (*contigs*) selecionadas para análise por RT-qPCR que foram submetidas ao Blastn contra o banco de dados de ESTs de *Musa* spp., 26 apresentaram similaridade com *e-value* entre 0 e  $9e-59$  e foram utilizadas para desenhar *primers* específicos (Tabela 7). Destas 26 sequências, 17 apresentaram *e-value* igual a 0. Do total inicial de 44 sequências, 18 não apresentaram similaridade com sequências do banco de dados de ESTs de *Musa* spp. e foram desconsideradas para análise por RT- qPCR.

Após o desenho de *primers*, o PCR eletrônico realizado contra o banco de sequências de transcrito (*contigs* e *singlets*) de *M. acuminata* oriundas do sequenciamento 454, as sequências gênicas de arroz recuperadas no *Phytozome* e as sequências do genoma de *M. acuminata* DH Pahang mostrou que todos os 26 pares de *primers* desenhados anelaram no máximo duas vezes em *contigs* de *M. acuminata*. Esse anelamento ocorreu uma vez na sequência a partir da qual o *primer* foi desenhado e com produto de amplificação correspondente ao tamanho esperado, ou duas vezes sendo uma vez em uma sequência do genótipo Calcutta 4 e a outra em Cavendish Grande Naine (tabela 8). Não foram observados anelamentos em *singletons* e no genoma de arroz e apenas cinco deles anelaram em sequências do genoma de *Musa acuminata* DH Pahang. Assim, a estratégia de desenho adotada a fim de garantir a especificidade dos *primers* mostrou o resultado esperado no teste *in silico*.

**Tabela 7. Primers desenhados para RT- qPCR derivados de genes- candidatos envolvidos com defesa na interação *M. acuminata*- *M. musicola*.**

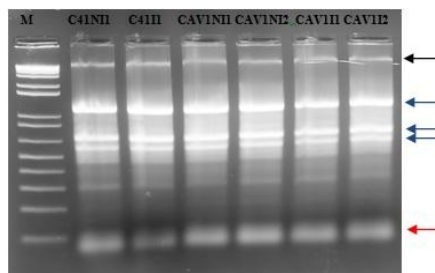
Abreviação do Gene	Primer Forward/Reverse	Função Putativa	Tamanho esperado do Amplicon
1CHIT	CACCATCTCCTGCAAGCATA GCAGTCATTCCTCGTTGTCA	Quitinase	123
2STK	TCATGTTGGCTTCATCATCC TGCAATCCACACTCTTAACTCG	Serina treonina quinase	116
3P450	GGCGCTGTTCCCTTCTTTTCT GCCCTTTAGCAACCCATTTT	Citocromo P450 subfamília CYP2	100
4GER	CGCTCAAGAATATGGACAACG AACCATGCACCGAGGTAAC	Germina/oxalato oxidase	130
5SORB	TGGAACCACCGAACTCTTTC GGGTGACTCCCAGAATCGTA	Hipotética proteína Sorbidraft	161
6OSM	GGCACCAACTACAGGGTGT ACCTGCCATCAGTCTTGACA	Osmotina/ PR5	142
7THAU	CCGGTGGGACTAATTACAGG CAATTCGGATGTCAATGCAG	Taumatina/ Proteína relacionadas à patogênese PR5	165
8GLU	GCGCAGTTGGGTTTATGAAT TGAAAGCCAGCACAAAGAAAG	Glutathione-S-transferase	169
9CHAL	CTCCACAGCGTGCAAATCTA GTGACGCGAAAACAAGTG	Chalcona sintase	179
10RPK	CGGAGAAGACTGATGTTTTTGGT CACTAGGCAGTTCTGGATCA	Receptor de proteína quinase contendo repetição de LRR	176
11MAP2K	TGAAACATCCCTTCCTGAGC AGCAGCAGCCTTGAGTAGG	Proteína quinase quinase mitógeno ativada (MAP2K)	140
12WRKY	AGCAGCTTGACATGGAGTT CACTTGAGGTGGTAGCAGCA	Fator de transcrição da superfamília WRKY	114
13STK	CGAAGAAGGTGTTCCCTCTCG AACCGACCGATCTCAAAGAA	Serina/treonine específica proteína fosfatase PPI, subunidade catalítica	120
14GLU	ACCTCATGAAAAACCCCAAG TCTCCCCCTGATGTACCAAC	Glutathione S-transferase	174
15GPROT	ATGGAGGAGCTAATCCGAAA TGAGAATAGCTTCGAAGAGC	Proteína G subunidade beta	150
16FER	GCTGATCGAGCAGATGAACA AGCTTCCAGACCTTGGGTTT	Ferritina	165
17GER	GTTTCCACCGTCATCGATCT TTGGACAACATGACCCGATA	Germina/oxalato oxidase	111
19MAC	GCCATCCTCGAGACCAAGTT AGAATTTGACCCCAACATGC	Fator de inibição de migração de macrófagos	152
20PR5	CCGAATTGATGAGTGTGTTG TTGATGCCAACAAGAGATCC	Proteína relacionada à patogênese PR5	118
21STK	AAGTTGTCCAAGGATTCTCCAGT CAAGTGATGTGCAAACAGC	Serina treonina quinase	172
22STK	TGGGAAAGGAAGTTGATTTCG AACCCATTGCCACTCATAGG	Serina treonina quinase	190
23BETAGLU	CTCCTCCTGATTGCCATTTG TCACCCAACTTTTGCACAG	1, 3-beta-glucanase	116
24PH	TATAAAGCCAATGGGGTTG ATCCATACGCCAACCATCTC	Fosfatidilinositol-fosfolipase C específica	152
25GER	GTGCAGCTTAGCAAGACGAC TGTCCAACCACTGCATCTAAG	Germina/oxalato oxidase	123
26PRR	GTGAATGGGATTTTCGAGGAA CTCACGCACCTTGACCTTGA	Regulador de respostas de resistência de patógenos e de RPS2 RPM1 genes	151
27IAA	TGTTGGGATGGTGAATGAGA TGGATGACAAAGGAGTGTGC	Amino ácido Hidrolase- IAA	152

**Tabela 8. Resultado do PCR eletrônico com os *primers* desenhados para RT-qPCR. Os números indicam quantas vezes cada par de *primers* anelou em sequências de *M. acuminata* Calcutta 4, Cavendish Grande Naine e no genoma de *Musa acuminata* DH pahang. Crh- Cromossomo.**

Locus	Primer	Anelamento do primer em contigs e singletons de <i>M. acuminata</i> Calcuttá 4 e Cavendish Grande Naine		Anelamento do primer no genoma de <i>M. acuminata</i> DH Pahang										
		Calcuttá 4	Cavendish	Crh1	Crh2	Crh3	Crh4	Crh5	Crh6	Crh7	Crh8	Crh9	Crh10	Crh11
locus1020	1CHIT	1	1					3		3				
locus1392	2STK	1	1											
locus1654	3P450	1	0											
locus1800	4GER	1	0											
locus231	5SORB	1	0											
locus2344	6OSM	1	0											
locus2430	7THAU	1	0											
locus2496	8GLU	1	0						1					
locus2924	9CHAL	1	0		1									
locus674	10RPK	1	0											
Locus1394	11MAP2K	1	0											
Locus1396	12WRKY	1	0											
Locus1863	13STK	1	0											
Locus2061	14GLU	1	0											
locus1310	15GPROT	1	1											
locus1388	16FER	0	1											
locus1480	17GER	0	1											
locus2256	19MAC	0	1						1					
locus2355	20PR5	0	1											
locus3025	21STK	1	1											
locus777	22STK	0	1											
locus832	23BETAGLU	1	1					1						
Locus46	24PH	0	1											
locus241	25GER	1	1											
Locus2067	26PRR	0	1											
Locus2830	27IAA	1	1											

#### 4.4. Extração e quantificação de RNA e síntese de cDNA

Todas as amostras de RNA total, extraídas pelo Kit Concert®, apresentaram integridade dos fragmentos. A figura 15 representa um gel de agarose 1% com seis amostras de RNA total. As amostras apresentaram boa qualidade após passarem pela coluna de purificação Invisorb. As razões 260/280nm medidas no espectrofotômetro Nanodrop 2000 ficaram entre 2,11 e 2,19, as razões 230/260nm apresentaram valores entre 1,89 e 2,31 e todas as curvas apresentaram forma de “sino” como demonstrado na amostra 31-CAV111(ANEXO I).



**Figura 15. Análise eletroforética em gel de agarose 1% RNase free. M-Marcador DNA Ladder 1Kb. Nas amostras de RNA total, as siglas C4 e CAV correspondem ao genótipo, o primeiro número após o genótipo corresponde ao número da planta, I- inoculada, NI- não inoculada e o último número corresponde ao dia após inóculo. Seta preta- DNA genômico. Setas azuis- RNA 28S, 18S e 5S em ordem decrescente. Seta vermelha- pequenos RNAs.**

Após a síntese de cDNA as reações de RT- PCR com um *primer* para o gene *Elongation Factor* flanqueando uma região intrônica mostraram que as amostras de cDNA não apresentaram contaminação com DNA genômico. Apenas a reação que continha um DNA genômico como molde utilizado como controle positivo apresentou um produto de RT- PCR superior ao esperado (605pb). Na Figura 16 pode ser observado que quando a PCR foi realizada com amostras de cDNA, o produto de RT- PCR extendido por este *primer* é de aproximadamente 600 a 650pb enquanto que a reação com o controle positivo resultou em um fragmento de aproximadamente 850 pb.



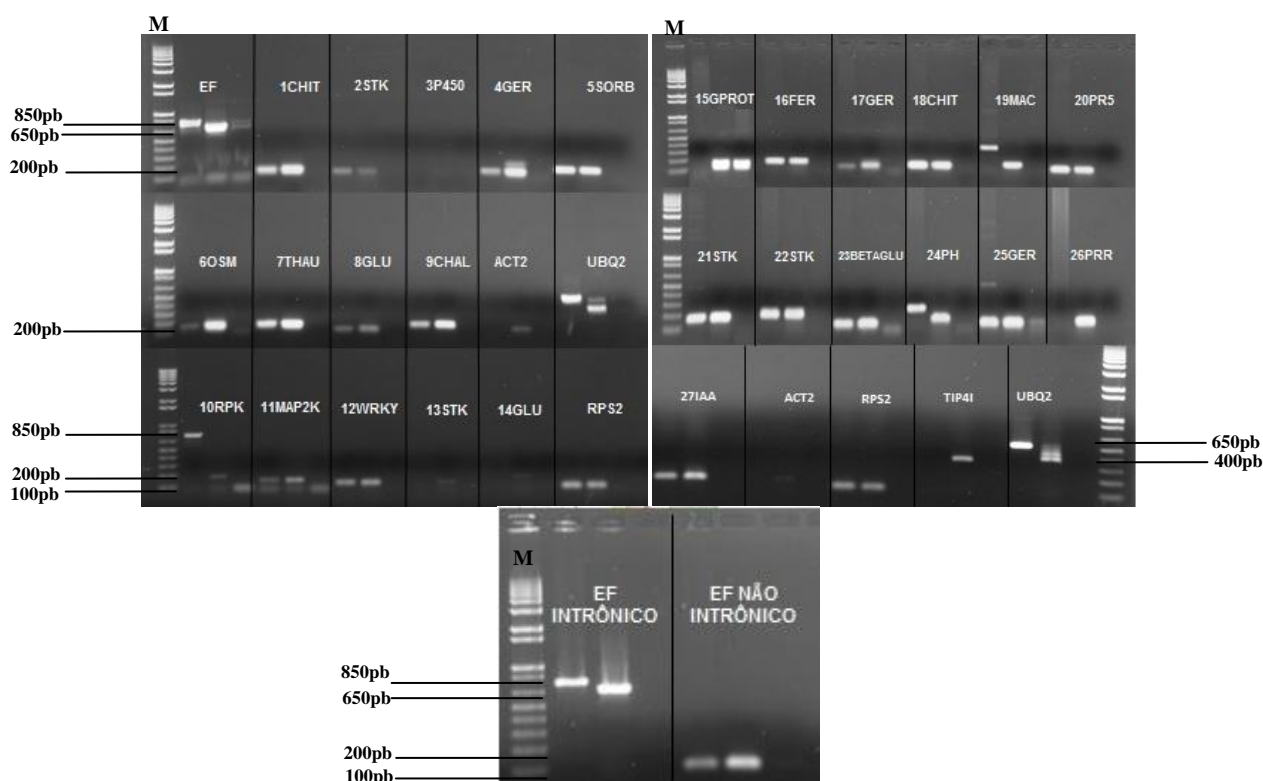
Figura 16. Produtos da reação de RT- PCR utilizando um par de *primers* intrônicos para 18 amostras de cDNA sintetizadas a partir das amostras de RNA total de Calcutta 4. M-Marcador DNA ladder 1Kb. 1- Controle positivo com DNA genômico. 2-19 amostras de cDNA.

#### 4.5. Especificidade dos *primers* desenhados para RT- qPCR

Após a reação de RT- PCR, dos 26 pares de *primers*, 23 mostraram especificidade, amplificando apenas um fragmento no tamanho esperado a partir das amostras de cDNA. Os produtos de PCR são visualizados em gel de agarose 1% na Figura 17. Os três pares de *primers* restantes, CP450, 13STK e 14GLU, não apresentaram produto de amplificação por RT- PCR. Os pares de *primer* para os genes 26RRP e TIP4I anelaram apenas no cDNA e não anelaram no DNA genômico utilizado como controle positivo. Os pares de *primers* 10RPK, 19MAC e 24PH, assim como no par de *primer* para o gene *Elongation Factor* flanqueando uma região intrônica, apresentaram *amplicon* de tamanho superior ao esperado no controle positivo (gDNA).

Dos cinco pares de *primers* para genes candidatos a gene de referência, três apresentaram especificidade (EF, RPS2 e TIP4I), apresentando apenas um produto de amplificação por RT- PCR no tamanho esperado. Estes genes foram selecionados por serem os mais documentados em plantas como estáveis em diversas condições experimentais e tecidos (Bastolla, 2007; Kim, 2003; Brunner, 2004) e especificamente em condições de estresses bióticos em bananeira (Chen *et al.*, 2011). No entanto

UBQ2 apresentou amplificação inespecífica e em ACT2 ocorreram falhas de amplificação por PCR.



**Figura 17.** Gel de agarose 1% mostrando os produtos de PCR amplificados por 26 pares de *primers* desenhados a partir de seqüências unigenes de Cacuttá 4 e Cavendish Grande Naine. Para cada *primer* o primeiro poço do gel corresponde a um DNA genômico, o poço do meio a um cDNA e o terceiro poço a um controle negativo (sem *template*); M- DNA *Ladder* 1Kb *plus*. ACT2, RPS2, TIP4I, UBQ2 e EF não intrônico são candidatos a gene de referência. O par de *primers* EF intrônico flanqueia uma região intrônica. O par 18CHIT= 1CHIT.

#### 4.6. Validação de unigenes de defesa por RT-qPCR

Dos 23 pares de *primers* submetidos à análise por RT-qPCR, 22 apresentaram apenas um produto de amplificação observado na curva de dissociação e eficiências entre 90- 110% (Tabela 9). O par de *primers* 6OSM apresentou dois produtos de amplificação e foi descartado das análises. Os 22 genes restantes foram analisados quanto à sua expressão relativa com os quatro *pools* de cDNA (C4NI, C4I, CAVNI, CAVI).

Dos três pares de *primers* para genes candidatos a gene de referência que haviam apresentado especificidade por PCR quando testados por RT-qPCR TIP4I apresentou dois produtos de amplificação na curva de dissociação e RPS2 não

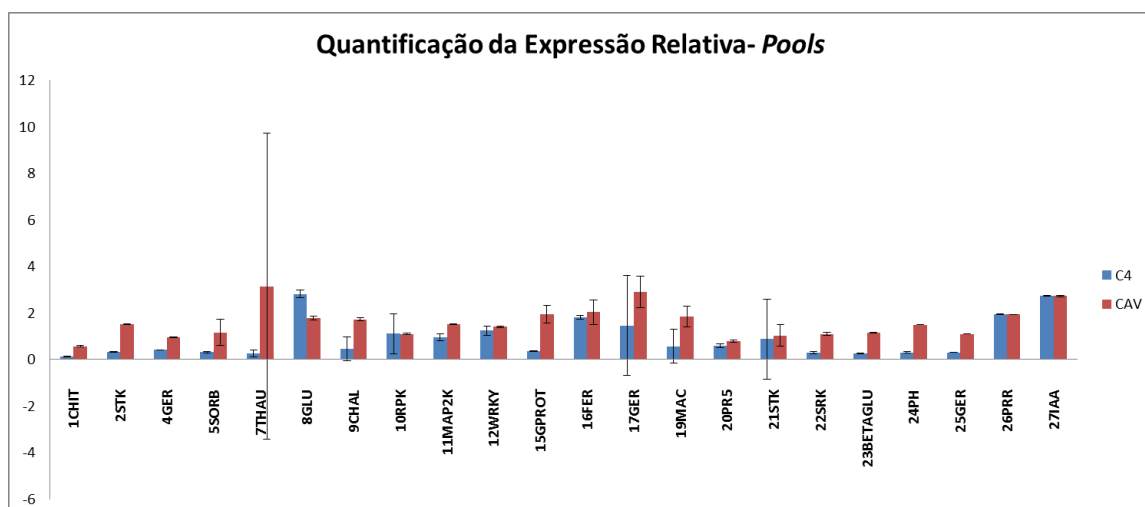


apresentou valores de CTs constantes para todos os tratamentos (variando entre 15 e 17). Logo, apenas o *Elongation Factor* foi utilizado para normalização dos dados.

**Tabela 9. Eficiência de 22 primers derivados de genes envolvidos em resposta de defesa durante a interação *M. acuminata*- *M. musicola* analisada por RT- qPCR.**

Abreviação do Gene	Função Putativa	Tamanho esperado do Amplicon	Eficiência (%)	SD da Eficiência(±)
1CHIT	Quitinase	123	96%	0,008
2STK	Serina treonina quinase	116	103%	0,017
4GER	Germina/oxalato oxidase	130	97%	0,005
5SORB	Hipotética proteína Sorbidraft	161	100%	0,008
7THAU	Taumatina/ Proteína relacionadas à patogênese PR5	165	98%	0,011
8GLU	Glutaciona-S-transferase	169	108%	0,014
9CHAL	Chalcona sintase	179	98%	0,016
10RPK	Receptor de proteína quinase contendo repetição de LRR	176	106%	0,013
11MAP2K	Proteína quinase quinase mitógeno ativada (MAP2K)	140	103%	0,007
12WRKY	Fator de transcrição da superfamília WRKY	114	98%	0,016
15GPROT	Proteína G subunidade beta	150	102%	0,005
16FER	Ferritina	165	107%	0,054
17GER	Germina/oxalato oxidase	111	102%	0,028
19MAC	Fator de inibição de migração de macrófagos	152	107%	0,013
20PR5	Proteína relacionada à patogênese PR5	118	102%	0,031
21STK	Serina treonina quinase	172	101%	0,023
22STK	Serina treonina quinase	190	104%	0,024
23BETAGLU	1, 3-beta-glucanase	116	105%	0,012
24PH	Fosfatidilinositol-fosfolipase C específica	152	106%	0,009
25GER	Germina/oxalato oxidase	123	102%	0,006
26PRR	Regulador de respostas de resistência de patógenos e de RPS2 RPMI genes	151	101%	0,012
27IAA	Amino ácido Hidrolase- IAA	152	104%	0,015

Embora os pares de *primers* para cada um dos 22 genes tenham sido desenhados para sequências identificadas em apenas um dos genótipos (Calcutta 4 ou Cavendish Grande Naine), todos eles apresentaram produto de amplificação nos dois, o que possibilitou uma comparação na expressão de cada gene em ambos (Figura 18).



**Figura 18. Expressão relativa (controle/inoculada) de 22 genes candidatos a genes de defesa durante a interação *M. acuminata*-*M. musicola* em Calcutta 4 (C4) e Cavendish Grande Naine (CAV). Amostras em *pools*.**

Dos 22 genes testados por RT-qPCR, 10 apresentaram um comportamento de expressão semelhante ao cálculo de DDD. Foram eles uma quitinase (1CHIT), taumatina (7THAU), glutathione S-transferase (8GLU), MAP2K (11MAP2K), proteína G-subunidade beta (15GPROT), ferritina (16FER), germina oxalato oxidase (17GER), fosfatidilinositol-fosfolipase C específica (24PH), regulador de respostas de resistência de patógenos e de genes RPS2 e RPM1 (26PRR) e um amino ácido hidrolase (27IAA). Destes, apenas 8GLU e 11MAP2K não foram considerados significativos em Calcutta 4 com base nos resultados de RT-qPCR (Tabelas 10 e 11).

Um total de sete genes a partir dos 22 iniciais foram selecionados para avaliação por dia após inóculo (3, 6 e 9 DAI) em amostras de Calcutta 4 (genótipo resistente) do bioensaio por apresentarem diferença de expressão em entre Calcutta e Cavendish nas amostras em *pools* ou por serem descritos na literatura como genes envolvidos em ETI e PTI. Foram eles, 1CHIT, 2STK, 7THAU, 11MAP2K (proteína quinase quinase mitógeno ativada), 8GLU, 9CHAL (chalcona sintase) e 12WRKY (fator de transcrição WRKY).

A quitinase apresentou regulação negativa (*down regulated*) em relação ao DDD, bem como nas análises de RT-qPCR em *pools* para o genótipo Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine, porém nesse genótipo o resultado não foi significativo. Nos três tempos após inóculo analisados com amostras de Calcutta 4 esse gene apresentou a mesma tendência de regulação negativa, sendo 0,35, 040 e 0,47 em 3, 6 e 9 DAI respectivamente (Figura 19 A).

O gene serina/treonina/quinase foi positivamente regulado (*up regulated*) nos dados de DDD, negativamente regulado em Calcutta 4 e positivamente regulado em Cavendish Grande Naine nas análises com as amostras em *pools*. No tempo 3DAI, esse gene mostrou-se positivamente regulado (3,24). Em 6 e 9 DAI houve uma tendência de diminuição nos níveis de expressão (0,95 e 0,86 respectivamente) embora os resultados de expressão relativa nesses tempos não tenham sido significativos (figura 19 B). Um elevado desvio padrão foi observado principalmente no tempo 3DAI. Nas análises de expressão basal (dados não mostrados), as três plantas do tempo 3DAI apresentaram valores de expressão diferentes (0,06, 1,14 e 0,56) para este gene. A diferença de expressão reflete no alto desvio-padrão quando a expressão média das triplicatas é calculada no REST.

O gene taumatina foi negativamente regulado no DDD e no RT-qPCR para o genótipo Calcutta 4. Para o genótipo Cavendish Grande Naine esse gene foi positivamente regulado. Nas análises por tempo de inoculação em Calcutta 4, no

tempo 3 DAI a expressão não foi considerada significativa. Em 6 e 9 DAI foi negativamente regulada (0,37 e 0,53 respectivamente) (Figura 19 C). Nas análises com as amostras em *pools* o desvio-padrão foi elevado. Ao visualizar os dados brutos de Cts e a análise de expressão basal (dados não mostrados) em cada planta assim como para o gene MAP2K, foi observado que as plantas 1, 2 e 3 apresentam diferenças de expressão entre si para este gene.

A expressão do gene da glutationa S-transferase foi positivamente regulada para os dados de DDD e para os testes de RT- qPCR com amostras de Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine, porém em Calcutta 4 esse resultado não foi considerado significativo. Esse gene foi positivamente regulado em 3DAI, mas apenas em 6DAI a expressão negativamente regulada foi considerada significativa (0,37) (Figura 19 D).

Para o gene da chalcona sintase a expressão de acordo com os resultados de DDD foi positivamente regulada. Quanto a análise em Calcutta 4 por RT- qPCR essa expressão não foi considerada significativa e em Cavendish Grande Naine foi positivamente regulada. Para este gene, assim como para o gene MAP2K os valores de expressão nas análises por RT- qPCR não foram significativos para os três tempos testados, embora em ambos os casos a tendência seja uma diminuição na expressão em 6DAI apresentando valores de expressão 1,34, 0,92, 1,26 e 0,72, 0,70, 0,90 respectivamente em 3,6 e 9 DAI (Figura 19 E). O gene MAP2K foi negativamente regulado segundo os dados de DDD e RT- qPCR para o genótipo Calcutta 4 (resultado não significativo) e positivamente regulado em Cavendish Grande Naine (Figura 19 F).

O fator de transição WRKY apresentou tendência contrária a 9CHAL e 11 MAP2K nas análises por DAI com um aumento da expressão em 6DAI (0,98) em relação a 3DAI (0,50) e 9DAI (0,57). Apenas em 6 DAI os dados foram significativos. Nos resultados de DDD esse gene mostrou-se negativamente regulado e positivamente regulado nas análises por RT- qPCR com as amostras em *pools* tanto em *Calcutta* quanto em *Cavendish Grande Naine*, embora apenas no último o resultado tenha sido considerado significativo (Figura 19 G). Os resultados acima estão representados na tabela 12 e nas figuras 19A-19G.

O desvio padrão em amostras 3DAI apresentou-se elevado em 2STK e 8GLU. Análises de expressão gênica basal revelaram que há diferença de expressão entre as plantas dentro de um mesmo ponto de coleta (dados não mostrados).

**Tabela 10.** Comparação entre os dados de DDD derivados de sequenciamento 454 e dados de expressão relativa por RT-qPCR utilizando o software REST para 10 genes derivados de sequências de Calcutta 4. NS- não significativo. SD- desvio padrão. Valores abaixo de 1- regulação negativa e valores acima de 1- regulação positiva. Resultados de DDD- número de reads. C4I/C4NI e CAVI/ CAVNI amostra inoculada em relação a amostra controle.

Gene	DDD				RT-qPCR						
	C4I	C4NI	C4I/C4NI	Expressão (up/down)	C4I/C4NI	SD (±)	Expressão (up/down)	CAVI/CAVNI	SD (±)	Expressão (up/down)	
1CHIT*	1	15	0,07	DOWN	0,12	0,01	DOWN	0,57	0,02	NS	
2STK	4	3	1,33	UP	0,31	0,02	DOWN	1,526	0,02	UP	
4GER	800	648	1,23	UP	0,41	0,00	NS	0,957	0,01	NS	
5SORB	5	0	5,00	UP	0,31	0,03	DOWN	1,162	0,57	NS	
7THAU*	5	21	0,24	DOWN	0,26	0,14	DOWN	3,146	6,56	UP	
8GLU*	18	10	1,80	UP	2,82	-0,17	NS	1,79	-0,08	UP	
9CHAL	29	23	1,26	UP	0,45	0,51	NS	1,725	0,05	UP	
10RPK	0	2	0,00	DOWN	1,11	0,86	NS	1,092	0,03	NS	
11MAP2K*	5	7	0,71	DOWN	0,94	0,15	NS	1,523	0,02	UP	
12WRKY	5	6	0,83	DOWN	1,24	0,20	NS	1,399	0,03	UP	

$p < 0,05$ , bootstrap 2000 iterações. \*Comportamento de expressão semelhante no DDD e RT- qPCR.

**Tabela 11.** Comparação entre os dados de DDD derivados de sequenciamento 454 e dados de expressão relativa por RT-qPCR utilizando o software REST para 12 genes derivados de sequências de Cavendish Grande Naine. NS- não significativo. SD- desvio padrão. Valores abaixo de 1- regulação negativa e valores acima de 1- regulação positiva. Resultados de DDD- número de reads. C4I/C4NI e CAVI/ CAVNI amostra inoculada em relação a amostra controle.

Gene	DDD				RT-qPCR						
	CAVI	CAVNI	CAVI/CAVNI	Expressão (up/down)	CAVI/CAVNI	SD(+/-)	Expressão (up/down)	C4I/C4NI	SD(+/-)	Expressão (up/down)	
15GPROT*	37	24	1,54	UP	1,95	0,37	UP	0,368	0,02	DOWN	
16FER*	82	2	41,00	UP	2,04	0,53	UP	1,823	0,08	NS	
17GER*	33	10	3,30	UP	2,90	0,68	UP	1,457	2,14	NS	
19MAC	56	32	1,75	UP	1,85	0,45	NS	0,569	0,74	NS	
20PR5	11	9	1,22	UP	0,79	0,06	NS	0,578	0,09	DOWN	
21STK	92	26	3,54	UP	0,37	0,45	NS	0,875	1,73	NS	
22STK	18	1	18,00	UP	1,82	0,07	DOWN	0,291	0,06	DOWN	
23BETAGLU	5	3	1,67	UP	1,46	-0,02	DOWN	0,263	0,02	DOWN	
24PH*	13	1	13,00	UP	1,495	-0,01	UP	0,295	0,04	DOWN	
25GER	30	21	1,43	UP	1,099	0,01	NS	0,301	0,00	DOWN	
26PRR*	18	11	1,64	UP	1,43	0,00	UP	1,936	0,01	NS	
27IAA*	48	22	2,18	UP	1,93	0,03	UP	2,732	0,02	NS	

$p < 0,05$ , bootstrap 2000 iterações. \*Comportamento de expressão semelhante no DDD e RT- qPCR.

**Tabela 12.** Expressão relativa baseada em dados de RT-qPCR de sete genes- candidatos envolvidos com resposta de defesa calculada em 3, 6 e 9 DAI em plantas de *M. acuminata* Calcutta 4 inoculadas com conidiósporos de *M. musicola*. SD- Desvio- padrão. Valores calculados pelo *software* REST. Valores acima de 1 são exemplos de regulação positiva, valores abaixo de 1 são exemplos de regulação negativa.

GENE	3DAI	SD (±)	down/up	6DAI	SD (±)	down/up	9DAI	SD (±)	down/up
1CHIT	0,35	0,02	DOWN	0,40	0,04	DOWN	0,47	0,28	DOWN
2STK	3,24	5,02	UP	0,95	0,58	NS	0,86	0,18	NS
7THAU	0,78	0,19	NS	0,37	0,25	DOWN	0,53	0,49	DOWN
8GLU	1,17	2,84	NS	0,37	0,25	DOWN	0,90	0,24	NS
9CHAL	1,34	0,41	NS	0,92	0,31	NS	1,26	0,22	NS
11MAP2K	0,72	0,93	NS	0,70	0,25	NS	0,90	0,75	NS
12WRKY	0,50	0,35	DOWN	0,98	0,65	NS	0,57	0,86	NS

**p < 0,05, bootstrap 2000 iterações.**

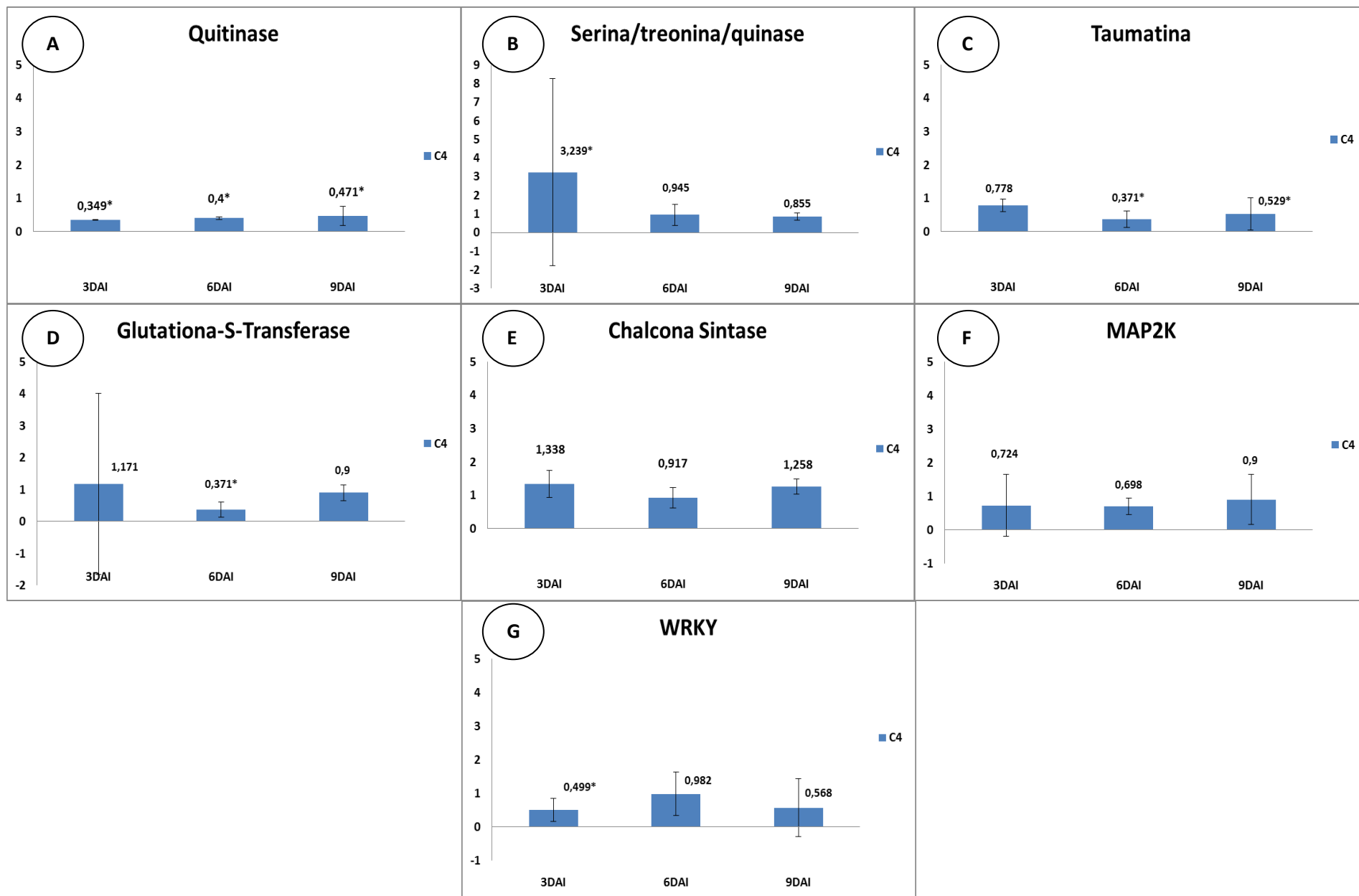


Figura 19. Expressão relativa baseada em dados de RT-qPCR de sete genes candidatos a genes de defesa calculada em três tempos de inoculação (3, 6 e 9 DAI) em plantas de Calcutta 4 no patossistema *M. acumina*- *M.musicola*. \*resultado significativo.

## V. DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização de Marcadores SSRs gênicos e Análise Fenética

Em sequências de Calcutta 4 foram encontradas 36,384 sequências unigene, sendo 24,259 *contigs* e 35,269 unigenes dos quais 23,729 são *contigs*. Esse número de unigenes que inclui *contigs* e *singletons* observados nos dois genótipos corroboram com o número de genes estimado por D'hont e colaboradores (2012) no genoma de referência de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang onde foram encontrados 36,542 genes. O número de *contigs* identificados em cada genótipo foi semelhante também ao obtido por Wang e colaboradores 2012 que anotaram 25,158 unigenes durante a interação *M. acuminata*- *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc TR4).

A estratégia de sequenciamento *de novo* é passível de superestimar o número real de genes em virtude de artefatos de montagem. Os erros de sequenciamento podem dificultar o processamento de sequências para muitas aplicações biológicas como montagem *de novo* de genomas (Salzberg *et al.* (2012). Como consequência, sequências reunidas em *contigs* são consideradas unigenes distintos quando na verdade podem pertencer a um mesmo gene. Os resultados encontrados podem estar refletindo uma boa qualidade na estratégia de montagem *de novo* adotada nesse estudo, pois embora a superestimação do número de genes tenha sido observada quando os *contigs* foram mapeados no genoma de DH Pahang, uma elevada porcentagem de *contigs* foi mapeada para éxons (dados não mostrados). Logo, a estratégia de montagem *de novo* realizada nesse estudo, associada às informações disponíveis no genoma de referência serão de grande importância para estudos de transcrito de *M. acuminata* durante a interação planta-patógeno.

Foram identificados 4068 e 4095 SSR gênicos em Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine, respectivamente. Para os dois genótipos, as repetições trinucleotídicas foram o tipo mais frequente. Em sequências de transcrito, a abundância de repetições trinucleotídeos é esperada e pode estar relacionada com a supressão de repetições não- trinucleotídicas em regiões codificadoras reduzindo a ocorrência de mutações *frameshift*. Mutações desse tipo são causadas por inserções ou deleções de nucleotídios não múltiplos de três resultando em alterações no códon, na leitura durante a tradução e na proteína produzida (Streisinger *et al.*, 1966; Metzgar *et al.*, 2000; Thiel *et al.*, 2003).

O polimorfismo em locos microssatélites é consequência de possíveis deslizamentos (*slippage*) da enzima DNA polimerase durante a replicação de DNA na região repetitiva (Levinson e Gutman, 1987; Schlotterer e Tautz, 1992) e subsequente

atividade exonuclease 3'-5' realizada como mecanismo de reparo, que remove ou adiciona nucleotídeos em uma das fitas.

Os 14 marcadores polimórficos associados a possíveis genes de defesa apresentaram 66 alelos e foram considerados altamente informativos com um PIC médio de 0,63. Segundo Botstein *et al.* (1980), valores abaixo de 0,25 são pouco informativos, entre 0,25 e 0,5 são medianamente informativos e valores acima de 0,5 são considerados muito informativos. Estes marcadores associados a possíveis genes de defesa serão ferramentas importantes em estudos de melhoramento genético do gênero *Musa*, como genotipagem de populações segregantes, mapeamento genético, seleção assistida por marcadores e estudos de QTL.

As falhas de amplificação por PCR em alguns locos podem estar associadas com a presença de alelos nulos. De acordo com Paetkau *et al.* (2005) estas falhas podem ser devido a ocorrência de mutações, inserções ou deleções nas regiões flangeadoras dos microssatélites impedindo o anelamento do *primer* e amplificação do fragmento (Holm *et al.*, 2001; Vornam *et al.*, 2004). Em bananeira, essas falhas de amplificação foram constatadas também por Crouch *et al.* (1998) e Creste *et al.* (2003). A presença desses alelos em proporção elevada pode resultar em uma superestimação de homozigose nos locos, fato que pode estar relacionado com a heterosigozidade esperada nesse estudo ter sido superior a observada (Chybicki e Burczyk, 2008).

Na análise fenética com 14 locos SSR gênicos polimórficos e 22 genótipos de *Musa* contrastantes para resistência às Sigatokas, três *clusters* principais foram formados. Foram observados também *subclusters* contendo apenas indivíduos resistentes ou suscetíveis as Sigatokas. Houve ainda agrupamentos de genótipos resistentes com alta similaridade quando os locos foram analisados separadamente. Entretanto, os 14 SSR gênicos utilizados nesse estudo não foram suficiente para discriminar todos os genótipos quanto a resistência. Não houve separação perfeita entre híbridos melhorados e genótipos selvagens provavelmente em decorrência do compartilhamento de alelos entre eles uma vez que poucos genitores são utilizados nos cruzamentos (Amorim *et al.*, 2008).

O *cluster* principal um, foi composto apenas pelo silvestre F2P2, que pode ter sido agrupado pela sua localização geográfica (Equador), uma vez que a maioria dos outros acessos são silvestres provenientes do continente asiático ou são híbridos melhorados. O agrupamento por localização geográfica foi observado por Grapin *et al.* (1998) e Amorim *et al.* (2008).

No *cluster* principal dois, foram agrupados 13 genótipos entre silvestres e híbridos. Sowmuk e Niyarma Yik são genótipos silvestres provenientes de Papua Nova



Guiné e apresentaram 0,84 de similaridade. Ambos são suscetíveis à Sigatoka amarela, sendo Niyarma suscetível também à Sigatoka negra. O agrupamento entre os dois foi observado também por Ferreira *et al.* (2004). Os híbridos 0116-01 e 1304-06, apresentaram alta similaridade genética (0,90) e resistência às duas sigatokas. O genótipo que apresentou maior similaridade (0,63) com estes foi 1318-01, seguido de 9179-03 (0,58) sendo todos estes resistentes as Sigatokas. Estes genótipos presentes no mesmo *subcluster* não possuem a mesma origem ou localização geográfica, mas apresentaram alta similaridade e reação semelhantes às sigatokas, sugerindo que estes agrupamentos podem ser devido a resistência ou suscetibilidade às Sigatokas.

A maior similaridade observada foi entre Burmannica e Calcutta 4, membros do *cluster* 3 que apresentaram 0,93 de similaridade. Segundo Amorim *et al.* (2008) ambos são o mesmo genótipo apenas com local de coleta diferenciados justificando o alto grau de similaridade entre eles. Calcutta 4 é muito utilizado em programas de melhoramento por ser um potencial doador de genes de resistência. Além disso, eles foram agrupados juntamente com Planta 1 e 2 provenientes do cruzamento entre Calcutta 4 e Pisang Berlin, os híbridos 0323-03 (no qual Calcutta 4 foi utilizado como um dos genitores), 4279-06 (resultante do cruzamento M 53 x (Tuu Gia x Calcutta 4)), 1741-01 (Jaribuaya x (Calcutta 4 x Madang)). Jaribuaya, um genótipo silvestre, também foi classificado no mesmo *cluster*, o qual todos os indivíduos apresentam resistência às Sigatokas Negra e/ou Amarela. Essa tendência de agrupamentos entre genótipos aparentados reforça a eficiência dos SSRs em agrupar genótipos segundo sua origem, grupo genômico ou genealogia (Amorim *et al.*, 2008; Creste *et al.*, 2003, 2004; Jesus *et al.*, 2006). Ferreira *et al.* (2004), utilizando marcadores RAPD com esses mesmos acessos, também encontrou alta similaridade entre híbridos nos quais um dos genitores era Calcutta 4 e estes também apresentam reação similar as Sigatokas.

Os locos 945, 1284, 2108 e 2061 podem estar apresentando inespecificidade, pois quando excluídos das análises, o grau de similaridade entre Planta 1 e 2 gerados a partir do cruzamento entre Calcutta 4 e Pisang Berlin passou de 0,58 utilizando os 14 locos para 0,81 utilizando 10 locos.

O loco 821 e o loco 1214 analisados individualmente mostraram que utilizando marcadores SSR é possível de separar os indivíduos em relação ao parentesco. Este resultado é mais claro observando o *subcluster* V no qual dos 13 genótipos membros apenas Sowmuk e Raja Uter são suscetíveis as sigatokas e Planta 1 e 2 não há informação quanto a resistência. No entanto esses dois genótipos, assim como a maioria deles possuem Calcutta 4 como um de seus genitores (Tabela 4).

A identificação de marcadores SSR gênicos é de grande importância na escolha de parentais com maior diversidade genética para programas de melhoramento de

bananeira e potenciais doadores de alelos segregando juntamente com a resistência a doenças, no intuito de introgridir esta característica em cultivares comerciais. Este trabalho representa um desenvolvimento em larga escala de marcadores SSR gênicos para o gênero *Musa*. Para cada genótipo foram encontrados aproximadamente 4000 SSRs e destes apenas 95 foram caracterizados aqui, logo existe ainda um banco de mais de 3000 SSRs com potencial para estarem associados com a resistência as Sigatokas e outras doenças da bananeira. Estes marcadores complementam o banco de 2000 SSRs identificados por D' hont *et al.* (2012).

## 5.2. Análise de expressão gênica por RT-qPCR

Das 44 sequências (*contigs*) de *Musa acuminata* Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine submetidas a busca de similaridade pela ferramenta BLASTn, 26 apresentaram similaridade com sequências de ESTs de *Musa* spp. com *e-value* entre 0 e  $9^{-59}$ . Destas, 17 apresentaram *e-value* igual a 0. Quanto mais baixo o *e-value*, ou mais próximo de zero, mais significativa a correspondência entre a sequência investigada e a sequência depositada no banco. Porém, alinhamentos praticamente idênticos, mas curtos, têm *e-value* relativamente altos. Isto ocorre porque o cálculo do *e-value* leva em conta o tamanho da sequência de consulta. Nesses casos, valores elevados fazem sentido porque sequências mais curtas têm uma maior probabilidade de ocorrência ao acaso no banco de dados.

As 26 sequências que apresentaram similaridade com ESTs de *Musa* spp. com *e-value* menor que  $9e-59$  utilizando a ferramenta BLASTn foram utilizadas para desenhar *primers* específicos para análise expressão dos genes por meio de RT-qPCR. O resultado do PCR eletrônico mostrou que os 26 pares de *primers* desenhados anelaram em duas condições: uma vez na sequência específica para o qual foram desenhados ou duas vezes, sendo uma vez em uma sequência de Calcutta 4 e uma segunda vez em uma sequência de Cavendish Grande Naine (Tabela 8).

Os 26 pares de *primers* não anelaram em nenhuma das sequências de arroz. Isso sugere que a estratégia de verificar e excluir o domínio conservado no CDD durante o desenho fez com que a região escolhida fosse específica em banana, pois as sequências de arroz utilizadas para o banco no PCR eletrônico foram sequências de genes ortólogos aos unigenes identificados em *M. acuminata* Calcutta 4 e Cavendish Grande naine.

Apenas cinco pares de *primers* amplificaram em sequências de *M. acuminata* DH Pahang. Os *primers* foram desenhados a partir de sequências de bibliotecas de cDNA, ou seja, derivadas de mRNA quando o genoma de referência ainda não havia sido publicado. Logo, para o desenho não foram consideradas a existência de regiões intrônicas. Segundo You *et al.* (2009), a maioria das espécies economicamente importantes tem um grande número de seqüências ESTs disponíveis em bancos de dados públicos, mas falta informações sobre suas seqüências genômicas e posições de íntrons e éxons. A informação sobre a posição de íntrons e éxons em sequências de DNA é relevante em estudos de RT- qPCR cujo molde para a reação é cDNA. Nesses estudos, o desenho de *primers* flanqueando regiões intrônicas permite detectar possíveis contaminações com o gDNA pois neste o produto amplificado terá um tamanho maior. Tanto em sequências de gDNA de *Musa*, como em sequências gênicas de arroz é possível que haja regiões intrônicas de tamanho superior ao que pode ser amplificado por PCR. Os *primers* podem ter sido desenhados flanqueando uma ou mais regiões intrônicas, o que resultaria em produção de fragmentos apenas em sequências de cDNA. Nas sequências genômicas de *Musa* podem ter ocorrido ainda a presença de SNPs e indels na região onde o *primer* anela. Logo, para os testes *in silico*, a estratégia e os parâmetros utilizados para o desenho dos *primers* garantiu a especificidade na PCR.

Os unigenes identificados nesse estudo foram mapeados no genoma de *M. acuminata* DH Pahang (dados não mostrados). Isso orientará futuros estudos de análise de expressão gênica em banana, pois novos *primers* poderão ser desenhados em regiões que flanqueiam introns, possibilitando avaliação de contaminação com DNA genômico durante a síntese de cDNA, ou em regiões 3' UTR (*untranslated region*) garantindo a especificidade da PCR. Poderão ser identificados também genes com expressão constitutiva candidatos a gene de referência para serem utilizados como normalizadores em experimentos de RT-qPCR.

Um pré- requisito para uma correta análise por RT- qPCR é uma eficiente extração de RNA total (Bustin e Nolan, 2004; Deng *et al.*, 2005; Bustin *et al.* 2009). Todas as amostras de RNA de folha de *M. acuminata* infectadas e não- infectadas com *M. musicola*, extraídas com o método Concert apresentaram integridade de fragmentos quando visualizadas em gel de agarose 1% e boa qualidade após passarem pela coluna de purificação Invisorb. As razões 260/280nm medidas no espectrofotômetro Nanodrop 2000 ficaram entre 2,11 e 2,19. Estas são utilizadas para avaliar a contaminação do RNA por proteínas, sendo o valor de referência próximo de 2.0 (Thermo Scientific, 2009). As razões 230/260nm apresentaram valores entre 1,89

e 2,31 e são uma medida de contaminação por outros compostos com valor de referência também próximo de 2.0.

Segundo Bustin e Nolan (2004), a extração de RNA total intacto é trabalhosa devido a rápida degradação do RNA, porém uma boa extração garante a reprodutibilidade das análises e o significado biológico das amostras.

A partir do RNA total extraído das amostras, foi sintetizado o cDNA correspondente utilizado nas análises de RT- qPCR. Não foram observadas contaminações por gDNA nas reações de RT- PCR realizadas com o *primer Elongation factor* flanqueando uma região intrônica. Isso pode ser visualizado em gel de agarose no qual o produto de PCR com DNA genômico foi de aproximadamente 850pb e o produto com cDNA foi de aproximadamente 600pb (Figura 15). Logo, foi comprovada a não-contaminação do cDNA sintetizado.

Os resultados de RT- PCR confirmaram a especificidade dos pares de *primers* verificada *in silico*. Não foram observados fragmentos inespecíficos na PCR realizada com os 26 primers específicos desenhados. Para três pares de *primers* (3P450, 13STK e 14GLU) não foram observados fragmentos tanto no gDNA (controle positivo), quanto no cDNA, o que sugere que apenas para esses *primers* a estratégia de desenho não foi eficaz. Os pares de *primers* 26RRP e TIP4I anelaram somente no cDNA enquanto os pares de *primers* 10RPK, 19MAC e 24PH, apresentaram produto de tamanho superior ao esperado no controle positivo utilizando o gDNA como molde na reação de PCR. Estes dois últimos resultados sugerem que alguns *primers* podem ter sido desenhados flanqueando regiões intrônicas.

Três dos cinco pares de *primers* para genes candidatos a gene de referência apresentaram especificidade nas reações de PCR (EF, RPS2 e TIP4I). Os genes Ubiquitina2 e Actina2 são amplamente utilizados como genes referência, inclusive em estudos com banana (Chen *et al.*, 2011; Portal *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Porém este fato não foi verificado neste estudo pois o par *primers* UBQ2 apresentou fragmentos inespecíficos, enquanto o par de *primers* ACT2 apresentou falha de amplificação por PCR. Nos testes por RT- qPCR TIP4I e RPS2 também foram descartados. O primeiro por apresentar mais de um produto de amplificação visualizado na curva de dissociação do par de *primers* e o segundo por apresentar expressão variável entre os tratamentos. O gene *Elongation Factor* foi estável e foi utilizado como normalizador nas reações de RT- qPCR. A RT-qPCR é uma técnica bastante sensível, logo todas as etapas desde a extração de RNA, a síntese de cDNA, o desenho dos *primers* e escolha de genes de referência ideais para normalização dos dados são muito importante para a acurácia da quantificação da expressão gênica.

Os testes *in silico*, por RT-PCR e RT- qPCR mostraram que a estratégia e os parâmetros utilizados no desenho de *primers* foram suficientes para garantir a especificidade de 22 dos 26 *primers* desenhados evitando que eles anelassem em outras regiões diferentes das regiões- alvo e evitando a formação de homodímeros, heterodímeros e *harpins* entre os *primers*.

Dos 22 genes-alvo analisados por RT-qPCR com as amostras em *pools*, sete foram analisados por tempo de inoculação Calcutta 4 (3, 6 e 9DAI) que é um genótipo resistente às sigatokas negra e amarela. Os genes selecionados e os *primers* utilizados foram respectivamente: quitinase (1CHIT); serina/ treonina/ quinase (2STK); taumatina (7THAU); proteína quinase quinase mitógeno-ativada (11MAP2K) e o fator de transcrição WRKY (12WRKY), glutathione S- tranferase (8GLU) e chalcona sintase (9CHAL).

### 5.2.1 Quitinase

O gene da quitinase apresentou regulação negativa (*down regulated*) tanto em Calcutta 4 como em Cavendish Grande Naine quando as amostras foram analisadas em *pools*. As quitinases fazem parte dos grupos de proteínas PR3, 4, 8 e 11 e em plantas podem apresentar atividade antifúngica *in vitro* (Punja e Zhan, 1993; Van Loon e Van Strien, 1999; Van Loon, 2006). As quitinases são enzimas que hidrolisam o polímero de quitina N-acetilglucosamina, componente da parede celular dos fungos, evitando seu crescimento e níveis elevados de quitinases ocorrem em tecidos resistentes que expressam uma resposta de hipersensibilidade (Punja e Zhan, 1993). Porém, a análise da expressão da quitinase em 3, 6 e 9 DAI em Calcutta 4, revelou uma regulação negativa da expressão deste gene em plantas inoculadas em relação às plantas controle, embora tenha sido observado um leve aumento da expressão nesses tempos de inoculação. Esses resultados corroboram com os níveis de expressão previstos nos resultados de DDD para esse genótipo. Torrez e Calderón (2012)

Ainda segundo Punja e Zhan (1993), o nível de proteção por ação das quitinases em plantas é variável e pode ser influenciado por fatores como: a atividade específica da enzima, sua localização e concentração no interior da célula, as características do fungo patogênico e pela natureza da interação patógeno-hospedeiro. Em função da complexidade das interações fungo-planta, a expressão da quitinase combinada com a expressão de outras proteínas antifúngicas pode ter um maior efeito sobre a redução do desenvolvimento da doença. Maximova *et al.* (2005) demonstraram que oito linhagens de cacau (*Theobroma cacao*) transformadas com o

gene *TcChi1*, que codifica para uma quitinase classe I, apresentaram superexpressão desse gene e inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da mancha preta, em relação às linhagens não- transformadas.

Estudos de transformação genética visando resistência a fungos em plantas, a partir de quitinases de arroz, foram relatados. São exemplos os estudos com morango, roseira, crisântemo, arroz, videira, sorgo, amendoim e bananeira (Asao *et al.*,1997; Marchant *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*,1999; Datta *et al.*, 2001; Lin *et al.*,1995; Nishizawa *et al.*,1999; Yamamoto *et al.*,2000; Krishnaveni *et al.*, 2001; Iqbal *et al.*, 2012; Kovács *et al.*, 2013). Kovács *et al.* (2013) relataram que *M. acuminata* 'Gross Michel' apresentou resistência à sigatoka negra quando transformada com o gene da quitinase de arroz, sugerindo que este pode ser um gene com potencial para respostas de defesa em bananeira durante a interação *M. acuminata-Mychosphaerella* sp. e estudos de transformação genética em bananeira.

### 5.2.2 Quinases

O gene serina/treonina/quinase foi positivamente regulado (*up regulated*) em Cavendish Grande Naine e negativamente regulado em Calcutta 4, diferente dos resultados de DDD onde este gene foi positivamente regulado em Calcutta 4. Essa divergência na expressão pode ser um reflexo da reunião das amostras em *pools* durante as análises de RT- qPCR. Nas análises de RT- qPCR em 3, 6 e 9 DAI foi observada uma tendência de diminuição nos níveis de expressão nas amostras controle em relação as inoculadas. As serinas treoninas quinases fazem parte das classes de genes de resistência 3 e 4 e estão envolvidas em mecanismos de transdução de sinal. As proteínas-quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP ou GTP em alguns casos, para treonina, (Ser/ Tre), a histidina (his) ou tirosina (Tir) (Chevalier e Walker, 2004). A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo para o controle da atividade de proteínas.

Na via de sinalização MAPK (Proteína quinase mitógeno-ativada) durante PTI, a cascata de fosforilação é formada por três quinases (MAPK, MAPKK e MAPKKK). Sinais extracelulares são captados por receptores ativando MAPKKK, que fosforila a MAPKK, que por sua vez fosforila a MAPK, resultando na ativação da transcrição de genes de defesa e resposta estresses (Hardie, 1999; Souza e Silva, 2002; Parthibane *et al.*, 2012). Nesse estudo, o gene MAP2K (11MAP2K) apresentou-se negativamente regulado nos dados de DDD e de RT- qPCR (porém não foi significativo) para as

amostras de Calcutta 4 em *pools*. Em Cavendish Grande Naine, que é uma cultivar suscetível às sigatokas, esse gene foi positivamente regulado.

### 5.2.3 WRKY

Após a cascata de fosforilação MAPK durante o PTI induzido por PAMPs ou MAMPs, como descrito anteriormente, a expressão dos fatores de transcrição WRKY é ativada. A atuação desses fatores de transcrição na resposta de defesa em plantas é bastante documentada tanto em PTI (Eulgem, 1999; Eulgem e Somssich, 2007; revisado por Pandey e Somssich, 2009) como ETI, SAR (Derlandes *et al.*, 2002) e vias de sinalização do ácido salicílico e ácido jasmônico (Li *et al.*, 2004). Nesse estudo, WRKY apresentou-se negativamente regulado nos dados de DDD, baixos níveis de expressão nas análises por RT-qPCR nas amostras de Calcutta 4 em *pools* e positivamente regulado em Cavendish Grande Naine. Nas análises em 3, 6 e 9 DAI em Calcutta 4 esse gene foi negativamente regulado sendo a expressão significativa no tempo 6DAI.

### 5.2.4 Taumatina

A taumatina é uma proteína do grupo PR-5. Em tabaco e outras espécies de plantas, as proteínas pertencentes a este grupo exibem atividade de inibição do crescimento de hifas ou germinação de esporos de diferentes fungos *in vitro*, provavelmente através de um mecanismo de permeabilização de membranas (Vigers *et al.*, 1992; Stintzi *et al.*, 1993). As proteínas PR-5 também apresentaram resposta de defesa em plantas contra bactérias e vírus (Bonasera *et al.*, 2006; Elvira *et al.*, 2008). O gene da taumatina apresentou regulação negativa nos dados de DDD e nas análises por RT-qPCR nas amostras de Calcutta 4 em *pools* e regulação positiva em Cavendish Grande Naine. As análises de expressão nas amostras de Calcutta 4 em 3, 6 e 9 DAI mostraram que a Taumatina foi negativamente regulada seguindo a mesma tendência de diminuição na expressão no tempo 6DAI que o gene MAP2K. Em Elvira *et al.* (2008) observa-se na interação *Capsicum chinese* (pimenta) com vírus PMMoV um aumento na expressão de proteínas relacionadas com a patogenicidade do grupo PR5 semelhantes a Osmotina, que também faz parte deste grupo, nos estágios iniciais de infecção, diminuição algum tempo após inóculo e aumento em seguida. A presença dessas proteínas estava associada com plantas que exibiram reação de hipersensibilidade. Propriedades antifúngicas da taumatina foram observadas em *Arabidopsis* e outras plantas cujos níveis de expressão durante a infecção com fungos

aumentaram tanto em cultivares resistentes quanto em cultivares suscetíveis (Elkereamy *et al.*, 2011). A atividade antifúngica desse gene o torna um candidato para a engenharia genética na produção de plantas resistentes a doenças. Plantas de bananeira transgênicas expressando o gene TLP (*Thaumatococcus*-like Protein) de arroz desafiadas com fungo *Fusarium* apresentaram maior resistência a *Fusarium oxysporum* sp. cubense (raça 4) em relação a plantas não- inoculadas (Mahdavi *et al.*, 2012).

### 5.2.5 Glutathione- S Transferase

A glutathione- S transferase foi positivamente regulada nos resultados de DDD e apesar do valor de expressão por RT-qPCR ter sido 2,82 esse resultado não foi significativo. Em Cavendish Grande Naine esse gene também foi positivamente regulado. Em plantas as glutathionas S- transferases são induzidas pela presença de metais pesados, ataque patogênico, etileno e ozônio. Um efeito comum a todos esses processos é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROIs), produzidas durante estresse oxidativo. Em resposta, as glutathionas S- transferases são induzidas para proteger os componentes celulares da planta (Levine *et al.*, 1994; Ulmasov *et al.*, 1994; Tenhaken *et al.*, 1995).

### 5.2.6 Chalcona Sintase

A chalcona sintase, segundo os dados de DDD, foi positivamente regulada. Nas análises por RT-qPCR em Calcutta 4, o resultado de expressão não foi considerado significativo e em Cavendish Grande Naine a expressão foi positivamente regulada. Esse gene descrito pela primeira vez em 1970 além de fazer parte do desenvolvimento da planta, tem sua expressão induzida sob tratamento com a luz UV e estresses bióticos, como a infecção bacteriana ou fúngica. A expressão da Chalcona sintase provoca o acúmulo de fitoalexinas, flavonóides e isoflavonóides (Napoli *et al.*, 1990; Shirley, 1996 ; Ferrer *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2001; Austin e Noel, 2003). Segundo Dao *et al.* (2011), a chalcona sintase está envolvida também na via de defesa do ácido salicílico.

Por ser uma técnica muito sensível a RT-qPCR pode apresentar problemas com relação a repetibilidade e reprodutibilidade. Foi observado nesse estudo que plantas de um mesmo tempo de inoculação dentro de um mesmo bioensaio podem apresentar diferenças de expressão gênica entre si. Essas diferenças podem ser determinantes para os resultados quando a expressão do mesmo gene gênica é



analisada em diferentes bioensaios. Embora estudos relatem que a superexpressão de determinados genes promove a resistência em plantas a patógenos fúngicos, dos sete genes analisados nesse estudo, seis foram negativamente regulados no genótipo resistente a Sigatoka amarela e positivamente regulados na cultivar suscetível.

Novos bioensaios com um número maior de plantas devem ser realizados para identificar se essa diferença de expressão dos genes é resultante das etapas de manipulação das amostras (Bioensaio, extração de RNA, síntese de cDNA, reação de RT- qPCR) ou se há uma diferença real de expressão gênica entre as plantas. Esses bioensaios servirão de réplicas biológicas para validação dos resultados apresentados nesse estudo.

## VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho representa um desenvolvimento em grande escala de novos marcadores gênicos-SSR para aplicação no melhoramento genético, complementando os cerca de 2.000 SSRs identificados em BACs e *scaffolds* de DH-Pahang (D'hont *et al.*, 2012). Os 14 marcadores microssatélites polimórficos identificados, servirão como ferramentas úteis em estudos de mapeamento genético, genotipagem de população segregante e seleção assistida por marcadores (MAS). Cerca de 300 genes envolvidos em resposta de defesa contendo SSRs para cada genótipo (Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine) também foram identificados nesse estudo. Desses, apenas 95 foram caracterizados quanto ao polimorfismo nos locos SSRs e 22 foram analisados quanto a expressão diferencial em genótipos contrastes para a resistência. Logo, há um grande número de potenciais genes de defesa que podem ser avaliados quanto a sua expressão gênica.

A análise da expressão diferencial de genes- candidatos envolvidos em respostas de defesa no patossistema *Musa-Mycosphaerella* é de grande importância para estudos futuros de transformação genética de bananeira, pois uma compreensão profunda sobre como e em que etapa durante a resposta de defesa esses genes atuam é necessária para o desenvolvimento de novas estratégias de resistência durável em *Musa* sp. Para tanto, novos bioensaios envolvendo genótipos contrastantes para a resistência as Sigatokas como *M. acuminata* Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine devem ser realizados.

Com o mapeamento dos transcritos no genoma de referência *M. acuminata* DH Pahang, amplia-se as possibilidades de descoberta de novos genes envolvidos em

resistência a doenças em bananeira. Além disso, novos genes com expressão estável podem ser identificados como genes de referência e novos *primers* em regiões específicas como as regiões 3'UTR podem ser desenhados para genes- candidatos facilitando os estudos de expressão gênica por RT- qPCR.

A análise da expressão de genes candidatos contendo microssatélites e potencialmente envolvidos em respostas de defesa no patossistema *M. acuminata-Myco-sphaerella* realizada nesse estudo será de grande importância para estudos futuros de seleção assistida por marcadores (MAS), transformação genética e melhoramento genético de bananeira.

## VII. BIBLIOGRAFIA

ASAO, H.; NISHIZAWA, Y.; ARAI, S.; SATO, T.; HIRAI, M.; YOSHIDA, K.; SHINMYO, A.; HIBI, T.; Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca humuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. *Plant Biotechnology*, v.14, n.3, p.145-149, 1997.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.

ALVES, E.J. Programa de melhoramento genético da banana e plátano na Embrapa-CNPMP: planejamento, implantação e progressos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, BA, v.15, n.3, p.83-94, 1993.

ALLEGRE, M.; ARGOUT, X.; BOCCARA, M.; FOUET, O.; ROGUET, Y.; BERARD, A.; THEVENIN, J. M.; CHAUVEAU, A.; RIVALLAN, R.; CLEMENT, D.; COURTOIS, B.; GRAMACHO, K.; BOLAND-AUGE, A.; TAHI, M.; UMAHARAN, P.; BRUNEL, D.; LANAUD C. Discovery and mapping of a new expressed sequence tag-single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat panel for large-scale genetic studies and breeding of *Theobroma cacao* L. *DNA Research*, v.19, p. 23-35, 2011.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase no feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.30, n.4, p.333-342, 2005.

AMORIM, E.P.; REIS, R.V.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S.O. Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* v. 43, n.8, p.1045–1052, 2008.

AMORIM, E. P.; LESSA, L. S.; LEDO, C. A. DA S.; AMORIM, V. B. DE O.; DOS REIS, VIANA, R.; SANTOS-SEREJO, J. A.; E SILVA, S. DE O. Caracterização agrônômica e molecular de genótipos diplóides melhorados de bananeira, *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, n. 1, p. 154-161, 2009.

AMORIM, E.P.; SILVA, P.H.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, V.B.O.; SANTOS, V.J.; VILARINHOS, A.D.; SANTOS, C.M.R.; SOUZA JÚNIOR, M.T.; MILLER, R.N.G. 2012. New microsatellite markers for bananas (*Musa* spp). *Genetics and Molecular Research* v.11, n.2.1093-1098.

ANDERSON, J.A.; CHURCHILL, G.A.; AUTRIQUE, J.E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181-186, 1993.

APTROOT, A. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 2. Conspectus of *Mycosphaerella*. CBS Biodiversity Series, Utrecht, The Netherlands: v.5: p.1–231, 2006.

ARAÚJO FILHO, J.B. de; GHEYI, H.R.; AZEVEDO, N.C.; SANTOS, J.G.R. Tolerância da bananeira à salinidade na fase inicial de desenvolvimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.30, n.7, p.989-997, 1995.

ARX VON, J.A.; MÜLLER, E.; A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. *Studies in Mycology*, n9, p.1–159, Zurich, 1975.

AUSTIN, M. B.; NOEL, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports Article*, v. 20, p. 79–110, 2003.

BARBOSA NETO, J. F.; AMARAL, A. L. do; CARLI, M. L. de; TESSELE, C.; SOGLIO, F. K D. QTL associado à Mancha Branca do milho. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 3, 2005, Gramado. Anais, 2005.

BASTOLLA, F.M. Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus*. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

BELALCÁZAR CARVAJAL, S.L. El cultivo del plátano en trópico. Manual de Assistência Técnica. Cali, Colombia, n50, 1991, 375p.

BELKHADIR, Y.; NIMCHUK, Z.; HUBERT, D. A.; MACKEY, D.; DANGL, J. L. Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator, and is not required

for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell*, v.16, p.2822–2835, 2004.

BESTWICK, C.S.; BROWN, I.R.; BENNETT, M.H.; MANSFIELD, J.W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell*. v. 9, n.2, 209-221,1997.

BHAT, K.V.; JARRET, R.L.; RANA, R.S. DNA profiling of banana and plantain cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Electrophoresis*, v.16, n.9, p.1736-1745, 1995.

BLAIR, M.W.; PEDRAZA, F.; BUENDIA, H.F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S.E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v.107, p.1362–1374, 2003.

BLAIR, M.W.; CORTÉS, A.J.; PENMETSA, R.V.; FARMER, A.; CARRASQUILLA-GARCIA, N.; COOK, D.R. A high-throughput SNP marker system for parental polymorphism screening, and diversity analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Theoretical and Applied Genetics*, v.126, n.2, p. 535-548, 2013.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biol*, v. 60, p.379–406, 2009.

BONASERA, J.M.; KIM, J.F.; BEER, S.V. PR genes of apple: Identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BioMed Central Plant Biology*, v. 6, p.23-34, 2006.

BORÉM A.; MILACH, S. K. O. Melhoria de Plantas na Virada do Milênio. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília. Encarte Especial. n. 7, p. 68-72, 1999.

BRAMMER, S.P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoria genética vegetal. *Embrapa Trigo: Documentos Online*, Passo Fundo,

Embrapa Trigo: n.3, 7p., 2000. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do03.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm)>. Acesso em: 18 abr. 2010.

BOTSTEIN, D.; AYMOND, L.; WHITE.; MARK, S.; DAVIS, R. W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, v32, p.314-331, 1980.

BROOKES, A.J. The essence of SNPs. *Gene*. Uppsala, Sweden v.234, n.2, p.177-186, 1999.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression Studies. *BMC Plant Biology*, v. 4, n.14, 2004.

BRUNINI, O. Exigências climáticas e aptidão agroclimática da bananicultura. In.: Simpósio Brasileiro sobre Bananicultura. Anais. 1984, Jaboticabal, SP, FCAVJ/UNESP, p.99 -117.

BUSO, G.S. C.; CIAMPI, A.Y; MORETZON, M.C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v.7, n.30, p.46-50, 2003. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br/revista/bio30/marcadores.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

BUHARIWALLA, H. K.; JARRET, R.L.; JAYASHREE, B.; CROUCH, J.H.; ORTIZ, R. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana*. *Molecular. Ecology Notes*, v.5, p.327–330, 2005.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v.55, n.4, p.611- 622. 2009.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, v.15, n.3, p.155-166, 2004.

BYRON G. LANE. Oxalate, Germins, and Higher-Plant Pathogens. Review Article. IUBMB Life, v.53, p.67–75, 2002.

CORDEIRO, Z.J.M.; KIMATI, H. Doenças da Bananeira (*Musa* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. 3a .d. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.112 – 136, 1997.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P. Mal do Panamá, Fim do Bananal? Cultivar HF. Artigo técnico, Cruz das Almas, Embrapa-CNPMPF, p.27-29, 2003. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=494>. Acesso em: Março de 2011.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.de; MEISSNER FILHO, P.E. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A.L.; SOUZA, L. da S. (orgs). O cultivo da bananeira. Cruz das Almas, Embrapa-CNPMPF :1ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.146-180, 2004.

CORDEIRO, Z.J.M., MATOS, A.P.; KIMATI, H.. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In KIMATI, H.; Amorin, L.; RRZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.99-117, 2005.

CHEESMAN, V. E. Classification of the bananas II. Kew Bulletin, v. 2, n.2, 1947, p.106-117, 1947.

CHEN, J.; CHEN, J.Y.; WANG, J.N.; KUANG, J.F.; SHAN, W.; LU, W.J. Molecular characterization and expression profiles of MaCOL1, a CONSTANS-like gene in banana fruit. Gene, v.496, n.2, 110-117, 2012.

CHEN, H.; HE, H.; ZOU, Y.; CHEN, W.; YU, R.; LIU, X.; YANG, Y.; GAO, Y.M.; XU, J.L.; FAN L.M; LI, Y.; LI, Z.K.; DENG, X.W. Development and application of a set of breeder-friendly SNP markers for genetic analyses and molecular breeding of rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, v.123, p.869–879, 2011.

CHEN.L.; ZHONG, H-Y.; KUANG, J-F. ; LI, J-G.; LU, W-J.; CHEN, J-Y. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. Planta, v.234, p.377–390, 2011.

CHEVALIER, D.; WALKER, J.C. Functional genomics of protein kinases in plants. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, v.3. n. 4, p.362–371, 2005.

CHEUNG, F.; TOWN, C.D.; A BAC end view of the *Musa Accuminata* genome. *BMC Plant Biology*, v.7, n. 29, 2007.

CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B. J. Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* v.124, p 803–14, 2006.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v.19, n.4, p.299-306, 2001.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. *Euphytica*, v.132, p.259-268, 2003.

CRONQUIST, A. The divisions and classes of plants. *Botanical Review*, New York, v.26, n. 4, p. 425-82, 1981.

CROUCH, H, K.; CROUCH, J.H.; JARRET, R.L.; CREGAN, P. B.; ORTIZ, R.; Segregation at Microsatellite Loci in Haploid and Diploid Gametes of *Musa*. *Crop Science*, v. 38 n. 1, p. 211-217, 1998.

CHYBICKI, I.J.; BURCZYK, J. Simultaneous Estimation of Null Alleles and Inbreeding Coefficients *Journal of Heredity*, v.100, n.1, p.106–113, 2009.

DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W. dos S.; CORDEIRO, Z.J.M.; SILVA, S. de O. e; ALVES, E.J.; SOUZA, A. da S.; OLIVEIRA, M. de A. Programa de melhoramento genético da bananeira em execução no CNPMF/Embrapa. Cruz das Almas, BA. Documentos, n.47, 1993,43p.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* , v.411 p.826-833, 2001.



DOCHEZ, C.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R.; WHYTE, J.; DE WAELE, D. Host plant resistance to *Radopholus similis* in a diploid banana hybrid population. *Nematology*. v.11, p.329–335, 2009.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry*, v.10, p.397–412, 2011.

DATTA, K.; TU, J.; OLIVA, N.; ONA, I.; VELAZHAHAN, R.; MEW, T.W.; MUTHUKRISHNAN, S.; DATTA, S.K. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci*, v.160, p. 405–414, 2001.

DE OLIVEIRA, S.; ALVES, S. É. J.; CORDEIRO, Z. J. M.; DE MATOS, A. P.; E DE JESUS, S. C. Variabilidade genética e melhoramento da bananeira. In Queiroz, M.A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas Para O Nordeste brasileiro (on line) version 1.0. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, novembro 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/index.html> .

DENG, M.Y.; WANG, H.; WARD, G.B.; BECKHAM, T.R.; MCKENNA, T.S. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.17, n.6, p.574-578, 2005.

DESLANDES, L.; OLIVIER, J.; FRÉDÉRIC, T.; HIRSCH, J.; FENG, D. X.; BITTNER-EDDY, P.; BEYNON, J.; MARCO, Y. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, no. 42, p.404- 2409, 2002.

DESPRES, C.; DELONG, C.; GLAZE, S.; LIU, E.; FOBERT, P.R.; The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, v.12, n.279-290, 2000.

D' HONT, A.; DENOEUDE, F.; AURY, J.M.; BAURENS, F.C.; CARREEL, F.; GARSMEUR, O.; NOEL, B.; BOCS, S.; DROC, G.; ROUARD, M.; DA SILVA, C.; JABBARI, K.; CARDI, C.; POULAIN, J.; SOUQUET, M.; LABADIE, K.; JOURDA, C.;

LENGELLÉ, J.; RODIER-GOUD, M.; ALBERTI, A.; BERNARD, M.; CORREA, M.; AYYAMPALAYAM, S.; MCKAIN, M.R.; LEEBENS-MACK, J.; BURGESS, D.; FREELING, M.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; CHABANNES, M.; WICKER, T.; PANAUD, O.; BARBOSA, J.; HRIBOVA, E.; HESLOP-HARRISON, P.; HABAS, R.; RIVALLAN, R.; FRANCOIS, P.; POIRON, C.; KILIAN, A.; BURTHIA, D.; JENNY, C.; BAKRY, F.; BROWN, S.; GUIGNON, V.; KEMA, G.; DITA, M.; WAALWIJK, C.; JOSEPH, S.; DIEVART, A.; JAILLON, O.; LECLERCQ, J.; ARGOUT, X.; LYONS, E.; ALMEIDA, A.; JERIDI M, M.; DOLEZEL, J.; ROUX, N.; RISTERUCCI, A.M.; WEISSENBACH, J.; RUIZ, M.; GLASZMANN, J.C.; QUETIER, F.; YAHIAOUI, N.; WINCKER, P. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 2012, doi:10.1038/nature11241.

DUTTA, S.; KUMAWAT, G.; SINGH, B. P.; GUPTA, D. K.; SINGH, S.; DOGRA, V.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T.R.; RAJE, R.S.; BANDHOPADHYA, T.K.; DATTA, S.; SINGH, M.N.; BASHASAB, F.; KULWAL, P.; WANJARI, K.B.; VARSHNEY, R. K.; COOK, D.R.; SINGH, N.K. Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in *Pigeonpea* [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. *BMC Plant Biology*, v.11 n.17, 2011.

DOORENBOS, J.; KASSAM, A. H. Efeito da água no rendimento das culturas. *FAO Irrigação e Drenagem*, v.33, 1994, 306 p.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* v.42, p.185-209, 2004.

ESTERAS, C.; GOMEZ, P.; MONFORTE, A.J.; BLANCA, J.; VICENTE-DOLERA, N.; ROIG, C.; NUEZ, F.; PICO, B. High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. *BMC Genomics* v.13, p.80, 2012.

ELLIS, J.; DAVID, J. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v.1, p.268-293,1998,

EL-KEREAMY, A.; EL-SHARKAWY, I.; RAMAMOORTHY, R.; TAHERI, A.; ERRAMPALLI, D.; KUMAR, P.; JAYASANKAR, S. Prunus domestica PathogenesisRelated Protein-5 Activates the Defense Response Pathway and Enhances the Resistance to Fungal Infection. *PLoS ONE*, v.6, n.3, 2001.

ELVIRA, M. I.; GALDEANO, M. M.; GILARDI, P.; GARCIA-LUQUE, I.; SERRA, M. T. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 6, p. 1253–1265, 2008.

EMBRAPA. Empresa Brasileira Agropecuária. Sistema de Produção, 2009. Disponível em:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaFormoso/importancia.htm>. Acesso em: 25 mai. 2010.

EPPLE, P.; APEL, K., H.; BOHLMANN, AN. *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins, *Plant Physiology*, v.109, n.3, p.1995 813–820.

EULGEM, T.; SOMSSICH, I.E.; Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology Journal*, v.10, p.366–371, 2009.

EULGEM, T.; RUSHTON, P. J.; SCHMELZER, E.; HAHLBROCK, K; SOMSSICH, I. E. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *The EMBO Journal*, v.18, n.17, p. 4689- 4699, 1999.

EMYGDIO, B. M.; ANTUNES, I. F.; CHOER, E.; NEDEL, J. L. Efficiency of similarity coefficients based on RAPD markers in common bean genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n.2, p. 243-250, 2003.

FAO. Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Bananas \\_ Mundo \\_ 2010](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Bananas_Mundo_2010.pdf)>. pdf. Acesso em: Outubro de 2012.

FANG, F. C. Perspectives Series: Host/Pathogen Interactions. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. *The American Society for Clinical Investigation*, v.99,n.12, p.2818–2825, 1997.

FAURÉ, S.; NOYER, J.L.; HORRY, J.P.; BAKRY, F.; LANAUD, C.; GONZALÉZ-DE-LEÓN, D. A molecular marker-based linkage map of diploid banana (*Musa acuminata*). *Theoretical and Applied Genetics*, v.87, p.517-526, 1993.

FERNANDES, C.F. Doenças da bananicultura: Moko da bananeira. Circular Técnica. n.77, Embrapa Rondônia, 2005, 3p.

FERRARI, J.T.; NOGUEIRA, E.M.C. Sigatoka negra: Como identificar e combater a Sigatoka negra da bananeira. Comunicado técnico, 2008. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=16](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=16)>. Acesso em: Março de 2012.

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

FERREIRA, C. F.; SILVA, S.O.; SOBRIHNO, N.P.; PAZ, O.P.; Molecular characterization of banana (AA) diploids with contrasting levels of black and yellow Sigatoka resistance. *American Journal of Applied Sciences*, v.1, n.4, p.276–278, 2004.

FERREIRA, L. G.; TELES, F. L.; DAVI, G. S.; BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; MELO, L. C.; DEL PELOSO, M. J.; BASSINELLO, P. Z.; SIBOV, S.T.; CARNEIRO, M. S. Mapa Genético do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) baseado em marcadores microssatélites e RAPD. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. Anais eletrônicos do III Seminário de pesquisa e pós-graduação. [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006.

FERRER, J.; JEZ, J. M.; BOWMAN, M. E.; DIXON, R. A.; NOEL, J. P. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature structural biology*, v.6, n.8, 1999.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review Plant Pathology* v.9, 275–96, 1971.

FRICANO, A.; BAKAHER, N.; DEL CORVO, M.; PIFFANELLI, P.; DONINI, P.; STELLA, A.; IVANOV, N. V.; POZZI, C. Molecular diversity, population structure, and linkage disequilibrium in a worldwide collection of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *BMC Genetics*, v.13, n.18, 2012, 13p.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; HANADA, E.R.; MONTARROYOS, A.V.V.; Sigatoka-Negra da bananeira. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2006. 177 p.

GAUTAMI, B.; FONCEKA, D.; PANDEY, M.K.; MORETZSOHN, M.C., SUJAY, V.; QIN, H.; HONG, Y.; FAYE, I.; CHEN, X.; BHANUPRAKASH, A.; SHAH, T.M.; GOWDA,

M.V.C.; NIGAM, S.N.; LIANG X.; HOISINGTON, D.A.; GUO, B.; BERTIOLI, D.J.; RAMI J.F., VARSHNEY, R.K.; An International reference consensus genetic map with 897 marker loci based on 11 mapping populations for tetraploid groundnut (*Arachis hypogaea* L.) PLoS ONE, v.7, n.7, e41213. doi:10.1371/journal.pone.0041213, 2012.

GELETA, M., HERRERA, I., MONZ, A.; BRYNGELSSON, T. Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers. The Scientific World Journal.v. 2012, ID 939820, 2012, 11p.

GOMES, E. W.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. M.; SILVA S. DE O.; CAMARA, T. R.; MEUNIER, I. M. J. Diplóides (AA) de bananeira submetidos ao estresse salino. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.39, n.6, p. 525-531, 2004.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review Phytopathology, v.43, p.205-227, 2005.

GRAPIN, A.; NOYER, J.L.; CARREEL, F.; DAMBIER, D.; BAURENS, F.C.; LANAUD, C., LAGODA, P.J. Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellite sites. Electrophoresis, v. 9, n. 8-9, p.1374-80, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. Genetics Society of America, USA, v137, n4, 1121-37, 1994.

GREEN, T.R.; RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. Science, v.175, n. 4023. p776-777, 1972.

HAMEED, U.; PAN, Y.B.; MUHAMMAD, K.; AFGHAN, S.; IQBAL, J. Use of simple sequence repeat markers for DNA fingerprinting and diversity analysis of sugarcane (*Saccharum* spp) cultivars resistant and susceptible to red rot. Genetic and Molecular Research. ed. 11, n,2, p1195-1204, 2012.

HARDIE, D. G. Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v.50, p.97-131, 1999.

HARDY, G. H. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, v.28, p. 49–50, 1908.

HIPPOLYTE, I.; BAKRY, F.; SEGUIN, M.; GARDES, L.; RIVALLAN, R.; RISTERUCCI A.M.; JENNY, C.; PERRIER, X.; CARREEL, F.; ARGOUT, X.; PIFFANELLI, P.; KHAN, I.; MILLER, R.N.G.; PAPPAS, G.J.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; MATSUMOTO, T.; DE BERNARDINIS, V.; HUTTNER, E.; KILIAN, A.; BAURENS, F.C.; D'HONT, A.; COTE, F.; COURTOIS, B.; GLASZMANN, J.C.; A saturated SSR/DaT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. *BMC Plant Biology*, v.10, n.65, 2010.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, Salt Lake City, USA, v.72, p. 761-769, 1986.

HOLM L-E, LOESCHCKE V, BENDIXEN C. Elucidation of the molecular basis of a null allele in a Rainbow trout microsatellite. *Marine Biotechnology*, v. 3, n.6, p. 555–560, 2001.

HOLT, B.F.; HUBERT, D.A.; DANGL, J.L. Resistance gene signaling in plants-complex similarities to animal innate immunity. *Current Opinion Immunology*.v.15, n.1, p.20-5, 2003.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, v.6, p.279–284, 2005.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: [http://cnpmpf.embrapa.br/planilhas/Banana\\_Brasil\\_2010.pdf](http://cnpmpf.embrapa.br/planilhas/Banana_Brasil_2010.pdf). Acesso em: Outubro de 2011.

JARRET, R.L.; RBHAT, K.V.; CREGAN, P.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, V. Isolation of Microsatellite DNA markers in *Musa*. *Infomusa*, v.3, n.2, 1994.

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

JONES, J.D.G., DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature*, v.444, n.7117, p.323–329, 2006.

KAEMMER, D.; FISCHER, D.; JARRET, R.L.; BAURENS, F.C.; GRAPIN, A.; DAMBIER, D.; NOYER, J.L.; LANAUD, C.; KAHL, G.; LAGODA, P.J.L. Molecular breeding in genus *Musa*: a strong case for STMS marker technology. *Euphytica*, Wageningen, v.96, n.1, p.49-63, 1997.

KESSLER, A. BALDWIN, I.T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, v.53, n.1, p.299–328, 2002.

KAUR, S.; COGAN, N. O.; PEMBLETON, L. W.; SHINOZUKA, M.; SAVIN, K. W.; MATERNE, M., FORSTER, J. W. Transcriptome sequencing of lentil based on second-generation technology permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. *BMC Genomics*, v.12, n.265, p.1471-2164, 2011.

KIM, B. R; NAM, H. Y.; KIM, S. U.; KIM, S. I.; CHANG, Y. J. Normalization of reverse transcription quantitative- PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters*, v.25, n. 1, p.1869–1872, 2003.

KIM, Y.J.; LIN, N.C.; MARTIN, G.B. Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell*, v.109, n. 5, p.589–98, 2002.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. ed. *Manual de Fitopatologia*. v.2. *Doenças das Plantas Cultivadas*. 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005, 666p.

KIMATI, H., GALLI, F. *Doenças da bananeira: Musa sp.* In: GALLI, F. (Coord.). *Manual de fitopatologia*. Agronômica Ceres. v. 2. *Doenças das plantas cultivada*, 1980, p. 87-101.

KOVÁCS, G.; SÁGI, L.; JACON, G.; ARINAITWE, G.; BUSOGORO, J.P.; THIRY, E.; STROSSE, H.; SWENNEN, R.; REMY, S. Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. *Transgenic Research*, v.22, n.1, p.117-30, 2013.

KRISHNAVENI, S.; JEOUNG, J.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G. Transgenic sorghum plants constitutively expressing a rice chitinase gene show improved resistance to stalk rot. *Journal of Genetics and Breeding*, v. 55, p.151–158, 2001.

KLEINHOF, A. The North American barley genome mapping project progress report. In: II Public Workshop of the International Triticeae Mapping Initiative. 1991, Manhattan, Kansas (ed. B.S. Gill, W.J. Raupp, and H. Corke). *Anais*. n.10,1992. Genetic Resources Conservation Program, Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, Davis p. 20--26.

KOBE, B.; KAJAVA, A.V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*. v.11, n.6, p.725-732, 2001.

KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F. A. Procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, n.4, p. 403–410, 1993.

KOVACH, W.L.; MVSP: A Multivariate Statistical Package for Windows. Kovach Computing Services, v. 3.11,1999., 133p.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K. SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real- time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicina*, v.2, n.3, p.95-125, 2006.

LAGODA, P.J.L.; NOYER, J.L.; DAMBIER, D.; BAURENS, F.C.; GRAPIN, A.; LANAUD, C. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. *Molecular. Ecology*, v.7, p. 657-666,1998.

LAGRIMINI, L.M., BURKHART, W., MOYER, M., ROTHSTEIN, S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.84, n.21, p.7542–7546, 1987.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 251-275,1997.



LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, n.3, p.203–221, 1987.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H2O2 from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. *Cell*, v. 79, p.583-593,1994.

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

LI, Y.H.; LI, W.; ZHANG, C.; YANG, L.; CHANG, Z. R.; GAUT, B. S.; QIU, L.J. Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci. *New Phytologist* n.188, p.242–253, 2010.

LIN, W.; ANURATHA, C.S.; DATTA, K.; POTRYKUS, I.; MUTHUKRISHNAN, S.; DATTA, S.K. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Nature Biotechnology*, v.13, p.686–691, 1995.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, v.44, n.3, p. 397-401, 1989.

LIU, K.; MUSE, S.V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, v. 21, p. 2128–2129, 2005.

LIU, P.; GOH, C. J.; LOH, C.S.; PUA, E.C. Differential expression and characterization of three metallothionein- like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Physiology Plant*, v.114, n. 2, p. 241–250, 2002.

LORENZEN, J.; TENKOUANO, A.; BANDYOPADHYAY, R.; VROH, B.; COYNE, D.; TRIPATHI, L. Overview of Banana and Plantain (*Musa* spp.) Improvement in Africa: Past and Future. *Acta Horticulturae*, ISHS, v.879, p. 595-604, 2010.

LORENZO, O.; CHICO, J.M.; S´ANCHEZ-SERRANO, J.J., SOLANO R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v.16, p.1938–50, 2004.

LUKASIK, E.; TAKKEN, F.L.W. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 12, n. 4, p. 427- 436, 2009.

MAC KEY, J. Genetic interaction and breeding strategies in relation to fungal cereal diseases. In: SIDDIQUI, K.A.; FARUQUI, A.M. New genetical approaches to crop improvement. Karachi, p.503-525, 1986.

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

MARTIN, G. B.; BOGDANOVE, A. J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, p.23-61, 2003.

MASCARENHAS, G. Análise do mercado brasileiro de banana. *Preços Agrícolas*, v.134, p.4-12, 1997.

MATOS, A.P.; SILVA, S. O.; PEREIRA, J.C.R. Doenças da bananeira no médio Solimões, Amazonas: moko, mal-do-panamá e Sigatoka amarela. *Informativo SBF*, Brasília, v. 15, n. 4, p. 13-17, dez. 1996.

MAXIMOVA, S. N.; MARELLI, J. P.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; VERICA, J. A.; GUILTINAN, M. J. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta*, v.224, n.4, p. 740- 749.

MARCHANT, R.; DAVEY, M.R.; LUCAS, J.A.; LAMB, C.J.; DIXON, R.A.; POWER, J.B. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Molecular Breeding*, p.4, p.187-194, 1998.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. A. Innate Immunity: Minireview The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*, v. 91, n. 3, p.295–298, 1997.

METZGAR, D.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research*, v.10, p.72–80, 2000.

MELOTTO, M.; COELHO, M.F.; PEDROSA-HARAND. A.; KELLY, J.D.; CAMARGO, L.E. The anthracnose resistance Loco Co-4 of common bean is located on chromosome 3 and contains putative disease resistance-related genes. *Theoretical and Applied Genetics*, v.109, n.4, p.690-699, 2004.

MELCHERS, L.S.; APOTHEKER-DE GROOT, M.; VAN DER KNAAP, J.A.; PONSTEIN, A.S.; SELA-BUURLAGE, M.B.; BOL, J.F.; CORNELISSEN, B.J.C.; VAN DEN ELZEN, P.J.M.; LINTHORST, H.J. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, v.5, n.4, p.469- 480, 1994.

MISHINA, T.E.; ZEIER, J.; Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v.50, p. 500–513, 2007.

MILLER, R.N.G; PASSOS, M.A.N; MENEZES N.P.; SOUZA JÚNIOR, M.T.;CARMO, M.M.C.; AZEVEDO, V.C.R; AMORIM, E.P.; PAPPAS JR, G.J.; CIAMPI, A.Y. Characterization of novel microsatellite markers in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4. *BioMed Central Research Notes*, v.3, n.148, p. 18, 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-3-148.pdf>. Acesso em: 15 jun 2010.

MIMURA, Y.; INOUE, T.; MINAMIYAMA, Y.; KUBO, N. An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breeding Science*, v.62, p.93–98, 2012.

MARTIN, G.B. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Current Opinion Plant Biology*, v 2, p.273- 279, 1999.

MORALES, R.G.; RESENDE, J.T.; RESENDE, F.V.; DELATORRE, C.A.; FIGUEIREDO, A.S.; DA-SILVA, P.R. Genetic divergence among Brazilian garlic cultivars based on morphological characters and AFLP markers. *Genetic Molecular Research*, v .12, n.1, p.270- 281, 2013.

MOREIRA, R. S. Banana: teoria e prática de cultivo. 2ed. Fundação Cargill, Campinas. 1999.1667 p.

MORGANTE, C.V.; GUIMARÃES, P.M.; MARTINS, A. C. Q.; ARAÚJO, A.C.G.; LEAL-BERTIOLI, S. C.M; BERTIOLI, D.J.; BRASILEIRO, A.C.M. Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. *BioMed Central Research Notes*, v.4, p. 339–350, 2011.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

MORRIS, E.R.; WALKER, J.C. Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Current Opinion and Plant Biology*, v.6, n.4, p.339-342, 2003.

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

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*, v.48, n.8, p.579-82, 1990.

MOURY, B.; PFLIEGER, S.; BLATTES A.; LEFEBVRE V.; PALLOIX A. A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome*, v. 43, n. 1, p.137-142, 2000.

NAGY, E.D.; GUO, Y.; TANG, S.; BOWERS, J.E.; OKASHAH, R.A.; TAYLOR, C.A.; ZHANG, D.; KHANA, L S.; HEESACKER, A.F.; KHALILIAN, N.; FARMER, A. D.; CARRASQUILLA-GARCIA, N.; PENMETSA, R. V. ; COOK, DOUGLAS; H STALKER, T.; NIELSEN, N.; OZIAS-AKINS, P.; KNAPP, S. J. A high-density genetic map of *Arachis duranensis*, a diploid ancestor of cultivated peanut. *BioMed Central Genomics*, v.13, n.469, 2012.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*, v. 2, p. 279-289, 1990.

NGEZAHAYO, F.; DONG, Y.; LIU, B. Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis. *Journal of Applied Genetics*, v.48, n.4, p.329-336, 2007

NICOT, N.; CHIQUET, V.; GANDON, B.; AMILHAT, L.; LEGEAI, F.; LEROY, P.; BERNARD, M.; SOURDILLE, P. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theoretical and Applied Genetics*, v.109, n.4, p.800-805, 2004.

NICAISE, V.; ROUX, M.; ZIPFEL, C. Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm. *Plant Physiology*, v.150, n.4 p.1638-1647, 2009.

NIKI, T.; MITSUHARA, I.; SEO, S.; OHTSUBO, N.; OHASHI, Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology*, v.39, n.5, p.500-507, 1998.

NISHIZAWA, Y.; NISHIO, Z.; NAKAZONO, K.; SOMA, M.; NAKAJIMA, E.; UGAKI, M.; HIBI, T. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theoretical and Applied Genetics*, v.99, p.383- 390, 1999.

NURNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate Immunity In Plants and Animals: Striking Similarities and Obvious Differences. *Immunology Review*. v.198, p.249- 266, 2004.

OLDROYED, G. E. D.; STASKAWICZ, B. J. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, 10300- 10305, 1998.

OKUSHIMA, Y.; KOIZUMI, N.; KUSANO, T.; SANO, H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, v.42, p.479- 488, 2000.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, v.4, n. 3, p. 347- 354, 1995.

PANDEY, S.P., SOMSSICH, I.E.; The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology*, v.150, n.4, p.1648- 1655, 2009.

PARKER, J.E.; COLEMAN, M. J.; SZABÒ, V.; FROST, L. N.; SCHMIDT, R.; VAN DER BIEZEN, E. A.; MOORES, T.; DEAN, C.; DANIELS, M. J.; JONES, J. D. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. *Plant Cell*, v.9, n.6, p.879-894, 1997.

PARTHIBANE, V.; IYAPPAN, R.; VIJAYAKUMAR, A.; VENKATESHWARI, V.; RAJASEKHARAN, R. Serine/threonine/tyrosine protein kinase phosphorylates oleosin, a regulator of lipid metabolic functions. *Plant Physiology*, v. 159, n.1, p.95-104. 2012.

PASSOS, M.A.N.; CRUZ, V. de O. EMEDIATO, F.L.; DE CAMARGO T. C.; SOUZA JR M.T.; MATSUMOTO, T.; AZEVEDO, V.C.R.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P.; DE ALENCAR, F.L.F.; MARTINS, N.F.; DE JESUS, B. C. M.; BAURENS, F.C.; DA SILVA JR, B. O.; PAPPAS JR, G.J.; PIGNOLET, L.; ABADIE, C.; CIAMPI, A.Y.; PIFFANELLI, P.; MILLER, R.N.G.; Development of expressed sequence tag and EST-SSR marker resources for *Musa acuminata*. *AoB Plants.*, 2012. doi: 10.1093/aobpla/pls030.

PASSOS, M.A.N.; CRUZ, V. de O. EMEDIATO, F.L.; DE CAMARGO T. C, AZEVEDO, V.C.R.; BRASILEIRO, A. C. M. , AMORIM, E.P.; FERREIRA C. F.; MARTINS, N.F.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS JR, G.J.; DA SILVA JR, B. O.; MILLER, R.N.G. Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. *BioMed Central*, v. 14, n.78, 2013. doi:10.1186/1471-2164-14-78.

PATZAK, JOSEF.; PAPERŠTEIN, F.; HENYCHOVÁ , A.; SEDLÁK, J. Comparison of genetic diversity structure analyses of SSR molecular marker data within apple (*Malus × domestica*) genetic resources. *Genome*, v.55, n.9, p.647-665, 2012.

PERAZA-ECHEVERRIA, S.; JAMES-KAY, A.; CANTO-CANCHÉ, B.; CASTILLO-CASTRO, E. Structural and phylogenetic analysis of Pto-type disease resistance gene candidates in banana, v.278, n.4, p.443-453, 2007.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L., COELHO, A.F.S.,URBEN, A.F. Ocorrência da Sigatoka negra da bananeira no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. Resumo. v. 23, 1998, p. 295.

PLOETZ, R.C.; PEGG, K.G. Fungal diseases of root, corm and pseudostem. In: JONES D.R. (ed.) Diseases of Banana, Abacá and Enset. Wallingford, CABI Publishing, p.143-159, 2000.

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

PROMEGA. GenePrint® STR Systems (Silver Stain Detection). Technical Manual. 44p. 2006.

PUNJA, Z. K.; ZHANG, Y. Y. Plant Chitinases and Their Roles in Resistance to Fungal Diseases. Journal of Nematology, n.25, n.4, p.526-540, 1993.

RABBI, I.Y.; KULEMBEKA, H.P.; MASUMBA, E.; MARRI, P.R.; FERGUSON, M. An EST-derived SNP and SSR genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theoretical and Applied Genetics, v.125, p.329-342, 2012.

RAJU, N.L.; GNANESH, B.N.; LEKHA, P.; JAYASHREE, B.; PANDE, S.; HIREMATH P.J.; BYREGOWDA, M.; SINGH, N.K.; VARSHNEY, R.K.; The first set of EST resource for gene discovery and marker development in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). BioMedCentral Plant Biology, v.10, n.4, 2010.

ROMERO, R.A.; SUTTON, T.B. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of banana, to Propiconazole. Phytopathology, v.87, n.1, p.96-100, 1997.

ROZEN, S. SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (eds). Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, TOTOWA, NJ, PP 365-386, 2000.

SAHA, M.C.; MIAN, M.A.; EUJAYL, I.; ZWONITZER, J.C., WANG, L.; MAY, G.D. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. Theoretical and Applied Genetics, v.109, n.4, p. 783-791, 2004.

SALZBERG, S.L.; PHILLIPPY, A.M.; ZIMIN, A.; PUIU, D.; MAGOC, T.; KOREN, S.; TREANGEN, T.J.; SCHATZ, M.C.; DELCHER, A.L.; ROBERTS, M.; MARÇAIS, G.; POP, M.; YORKE, J.A. GAGE: A critical evaluation of genome assemblies and assembly algorithms. *Genome Research*, v.22, n.3, p. 557-56, 2012.

SARGENT, D. J.; PASSEY, T.; SURBANOVSKI, N.; GIRONA, E. L.; KUCHTA, P.; DAVIK, J.; HARRISON, R.; PASSEY, A.; WHITEHOUSE, A. B.; SIMPSON, D. W. A microsatellite linkage map for the cultivated strawberry (*Fragaria 3 ananassa*) suggests extensive regions of homozygosity in the genome that may have resulted from breeding and selection. *Theoretical and Applied Genetics*. v.124, p.1229–1240, 2012.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, v.109, p.365–371, 2000.

SCOTT, K.D.; EGGLE, P.; SEATON, G.; ROSSETTO, M.; ABLETT, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetic*, v.100, n. 5, p.723-726, 2000.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v.12 ,n.133, p.11-19, 1986.

SHEPHERD, K. History and methods of banana breeding In: Report of the First External Program and Management Review of the International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Washington, CGIAR SECRETARIAT, The World Bank, 1992, p.108-110.

SHIRLEY, B. W. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway *Trends in Plant Science*, v.1, n. 11, p.377–382, 1996.

SILVA, L. B. E, NASCIMENTO, J. L. do, NAVES, R. V. E FERREIRA P. H. Comportamento vegetativo de cultivares de banana sob diferentes lâminas de irrigação. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.34, n. 2, p.93-98, 2004.

SILVA NETO, S. P. da; GUIMARÃES, T. G. Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em:



<<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

SHU.Y.; LI, Y.;ZHU, Z.; BAI, X.;AI H.; JI, W.; GUO, D.; ZHU, Y. SNPs discovery and CAPS marker conversion in soybean. *Molecular Biology Reports*, v.38, n.3, p.1841-1846, 2011.

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

SIMÕES, K. da S.; SEREJO, J. A. dos S. Banco de germoplasma *in vitro* de banana. In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 5., 2011, Cruz das Almas. Anais. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2011.

STREISINGER, G.; OKADA ,Y.; EMRICH, J.; NEWTON, J.; TSUGITA, A.;TERZAGHI, E.; INOUE, M. Frameshift mutations and the genetic code.This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v.31, p.77- 84, 1966.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; M'ETRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology*, v.35, p.235- 270, 1997.

SOMSSICH, I.E.; SCHMELZER, E.; BOLLMANN, J.; HAHLBROCK, K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.83, p.2427–2430, 1986.

SOUZA JÚNIOR, M.T. Identificação e caracterização funcional de genes de resistência a estresses bióticos e seqüência promotora de expressão gênica em banana (*Musa spp.*). 27p. 2004. Disponível em: <[http://genoma.embrapa.br/musa/projetos/ProjetoMusaGeneBR\\_CT\\_Biotecnologia.pdf](http://genoma.embrapa.br/musa/projetos/ProjetoMusaGeneBR_CT_Biotecnologia.pdf)>. Acesso em: 05 abr. 2010.

SONG, W.Y.; WANG. G.L.; CHEN, L.L.; KIM, H.S.; PI, L.Y.; HOLSTEN, T.; GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W.X.; ZHU, L.H; FAUQUET, C.; RONALD, P. A receptor kinase-like rotein encoded by the rice disease resistance gene, xa21. *Science*, v.270, n. 5243, p.1804-1806, 1995.

SOTO BALLESTERO, M. Bananos; cultivo e comercializacion. 2<sup>a</sup>. Ed. San José, Costa Rica: Litografia e Imprensa LIL, 1992. 674 p.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES, J.D.G.; Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, v.268, p. 661–667, 1995.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROYA, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, v. 75, n.8, 1993, p.687- 706, 1993.

STOVER, R.H. Banana, plantain and abaca diseases. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1972, 316p.

TAKATSU, Y.; NISHIZAWA, Y.; HIBI, T.; AKUTSU, K. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Science Horticulturae* v. 82, p.113–123, 1999.

TAMELING, W.I.; ELZINGA, S.D., DARMIN, P.S., VOSSEN, J.H., TAKKEN, F.L. HARING, M.A.; CORNELISSEN, B.J. The tomato *R* gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell*. 2002; v.14, n.11, p.2929–2939, 2002.

TANG, X.; XIE, M.; KIM, Y.J.; ZHOU, J.; KLESSIG, D.F.; MARTIN, G.B. Overexpression of *Pto* activates defense responses and confers broad resistance. *Plant Cell*, V.11, n.1, p.15-29, 1999.

TERRAS, F.R.G.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N.V.; OSBORN, R.W.; KESTER, A.; REES, B.S.; TORRENKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKAERT, W.F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense, *Plant Cell*, v.7, n.5, p.573-588, 1995.

THALER, J.S.; OWEN, B., HIGGINS, VJ (The role of the jasmonate response in plant

susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* v.135, p. 530–538, 2004.

THOMMA, B.P.H. J.; PENNINGCKX, I.A.; BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion Immunology*, v.13, p.63–68, 2001.

TENHAKEN, R.; LEVINE, A.; BRISSON, L.F.; DIXON, R.A.; LAMB, C.; Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, p.4158–63, 1995.

THERMO SCIENTIFIC, 2009. Disponível em: <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/NanoDrop%202000%20User%20Manual.pdf>. Acesso em: Outubro de 2012.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R.K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. v. 106, p. 411-422, 2003.

TOKESHI, H.; DUARTE, M. R. L. Moko da bananeira no Território Federal do Amapá. *Summa Phytopathologica*, v. 9, n.3, p. 224-229, 1976.

ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.; The ocs element in the soybean *GH2/4* promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Molecular Biology*, v.26, p.1055–1064, 1994.

VAN DER BIEZEN, E.A.; Jones JDG. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, v.23, p.454-456, 1998.

VAN DER HOORN, R. A.; Kamoun, S. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, v.20, p.2009–2017, 2008.

VAN INGHELANDT, D.; ALBRECHT, E. M.; CLAUDE, L.; BENJAMIN, S. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v.120, p.1289–1299, 2010.

VAN LOON, L.C. Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection, in: R.K.S. Wood (Ed.), *Active Defense Mechanisms in Plants*, Plenum Press, New York, 1982, p. 247–273.

VAN LOON, L.C, VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, v.55, p.85– 97, 1999.

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

VARGAS, V. M. M. Prevencion y manejo de la Sigatoka negra. *Boletim divulgativo*. Instituto Colombiano de Pesquisa Agropecuária, Menizales, Colômbia, 1996, 29 p.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E.; Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, v.23, n.1, p.48-55, 2005.

VERA, P.; CONEJERO, V. Pathogenesis-related proteins of tomato P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology*, v. 87, p.58–63, 1988.

VIGERS, A. J.; WIEDEMANN, S.; ROBERTS, W. K.; LEGRAND, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; BERNARD, F. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science*, v.83, p.155-16,1992.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*. v. 47, p.177-206, 2009.

VORNAM, B.; DECARLI, N.; GAILING, O. Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L) based on microsatellite markers. *Conserv Genet*. v. 5, p.561–570, 2004.

XIAO, S.; WANG, W.; YANG, X. 2008. Evolution of Resistance Genes in Plants. *Innate immunity of plants, animals, and humans*. *Nucleic Acids and Molecular Biology*, v. 21, p.1-25, 2008.

XIAO, F.; LU, M.; LI, J.; ZHAO, T.; YI, S.Y.; THARA, V.K.; TANG, X.; ZHOU, J.M. Pto mutants differentially activate Prf-dependent, avr-Pto-independent resistance and gene-for-gene resistance. *Plant Physiology*, v.131, n.3, p.1239-1249, 2003.

ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B.; BRANN, D.W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. *Neuroendocrinology Basel*, v. 63, p. 397-407, 1996.

WANG, Z.; ZHANG, J.; JIA, C.; LIU, J.; LI, Y.; YIN, X.; XU, B.; JIN, Z. De novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* tropical race 4 infection. *BioMedCentral Genomics*. v. 21, n. 650, 2012.

WANG, JUN-NING; KUANG, JIAN-FEI; SHAN, WEI; CHEN, JIAO; XIE, HUI; LU, WANG-JIN; CHEN, JIAN-WEN; CHEN, JIAN-YE. Expression profiles of a banana fruit linker histone H1 gene MaHIS1 and its interaction with a WRKY transcription factor. *Plant Cell Reporter*, v.3, n.1,p1485–1494, 2012

WANG, M.; SUKUMARAN, S.; BARKLEY, N.; CHEN, Z.; CHEN, C.; GUO, B.; PITTMAN, R.; STALKER, H.; HOLBROOK, C.; PEDERSON, G.; YU, J. Population structure and marker-trait association analysis of the US peanut (*Arachis hypogaea* L.) mini-core collection. *Theoretical and Applied Genetics*, v.123, n.8, p.1307-1317, 2011.

WANG, W.; WEN, Y.; BERKEY, R.; XIAO, S. Specific targeting of the Arabidopsis resistance protein RPW8.2 to the interfacial membrane encasing the fungal Haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew.v.21, n.9, p.2898-2913, 2009.

WANG, G.L.; WU, C.; ZENG, L.; HE, C.; BARAOIDAN, M.; DE ASSIS, G. DA S. F.; WILLIAMS, C.E.; RONALD P.C.; LEUNG. H. Isolation and characterization of rice mutants compromised in Xa21-mediated resistance to *X. oryzae* pv. *Oryzae*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.108, n., p.3379-3384, 2004.

WARD, E.R.; UKNES, S.J.;WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L.; DC ALEXANDER, P AHL-GOY, JP METRAUX, AND JA RYALS. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, v.3, p.1085–1094,1991.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research, California, USA*, v. 18, n. 24, p. 7213-8, 1990.

WENDEHENNE, D.; DURNER, J.; KLESSIG, D.F.; Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion Plant Biology*. v.7, p.449- 455, 2004.

WEI, Y.; ZHANG, Z.; ANDERSEN, C.H.; SCHMELZER, E.; GREGERSEN, P.L.; COLLINGE, D.B.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus, *Plant Mol. Biol.* 36 (1998) 101–112.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.; DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v18, p. 6531-6535, 1990.

YAMAMOTO, T.; IKETAN, H.; IEKI, H.; NISHIZAWA, Y.; NOTSUKA, K.; HIBI, T.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Report*, v.19, p.639–646, 2000.

YAMAZAKI, Y.; SUH, D.Y.; SITTHITHAWORN, W.; ISHIGURO, K.; KOBAYASHI, Y.; SHIBUYA, M; EBIZUKA, Y.; SANKAWA, U. Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant, *Psilotum nudum*. *Planta*, v.214, n.1. p.75-84, 2001.

YANG, R.; SUN, C.; BAI, J.; LUO, Z.; SHI, B.; ZHANG, J.; YAN, W.; PIAO, Z. A putative gene *sbe3-rs* for resistant starch mutated from *SBE3* for starch branching enzyme in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS One*, v.7, n.8, 2012.

YOU, F.M.; HUO, N.X.; GU, Y.Q.; LAZO, G.R.; DVORAK, J.; ANDERSON, O.D. ConservedPrimers 2.0: a high-throughput pipeline for comparative genome referenced intron-flanking PCR primer design and its application in wheat SNP discovery. *BioMedCentral Bioinformatics*, v. 10, n. 331, 2009.

YOUNG, N.D. The genetic architecture of resistance. *Current. Opinion. Plant Biology*, v.3, p.285-290, 2000.

YU, J.K.; Dake, T.M.; Singh, S.; Benscher, D.; Li, W.; Gill, B.; Sorrells, M.E. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. *Genome*, v. 47, n.5, p.805-818, 2004.

YU, J.K.; KOHEL, R.; FANG, D.; CHO, J.; VAN DEYNZE A.; ULLOA, M.; HOFFMAN, S.M. PEPPER A.E.; STELLY, D.M.; JENKINS, J.N.; SAHA, S.; KUMPATLA S.P.; SHAH, M.R.; HUGIE, W.V.; PERCY, R.G. A high-density simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism genetic map of the tetraploid cotton genome. *Genes Genomes Genetics* n2, p. 43–58, 2012.

ZHANG, Z.; COLLINGE, D.B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus, *Plant Journal*, v. 8, p.139–145, 1995.

ZHANG, J.; SHAO, F.; LI, Y.; CUI, H.; CHEN, L.; LI, H.; ZOU, Y.; LONG, C.; LAN, L.; CHAI, J.; CHEN, S.; TANG, X.; ZHOU, J.M. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe*, v.1, 175-185, 2007.

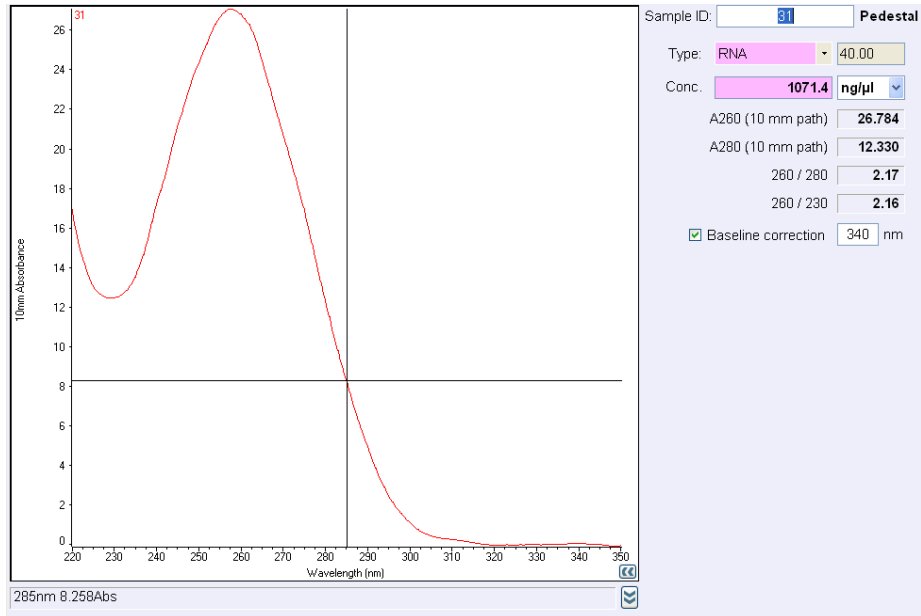
ZHANG, P.; LI, J. ;LI, X.; LIU, X.; ZHAO, X.; LU, Y. Population Structure and Genetic Diversity in a Rice Core Collection (*Oryza sativa* L.) Investigated with SSR Markers. *PLoS ONE*, Toronto, Canadá, v.6, n12, e27565, 2011.

ZHOU, J. M.; TRIFA, Y., SILVA, H.; PONTIER, D.; LAM, E.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.13, p.191-202, 2000.

ZHOU, F.; MENKE, F.L.H.; YOSHIOKA. K.; MODER, W.; SHIRANO, Y.; KLESSIG, D.F. High humidity suppresses *ssi4*- mediated cell death and disease resistance upstream of MAP kinase activation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and defense gene expression. *Plant Journal*, v.39, n.6, 920–32, 2004.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO I



**Curva de quantificação da amostra de RNA 31-CAVII1(forma de sino) após passar pela coluna de purificação Invisorb obtida no espectrofotômetro Nanodrop 2000.**



## ANEXO II

### ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Passos MAN, de Oliveira Cruz V, Emediato FL, de Camargo Teixeira C, Souza Jr MT, Matsumoto T, Azevedo VCR, Ferreira CF, Amorim EP, de Alencar Figueiredo LF, Martins NF, Cavalcante MJB, Baurens FC, da Silva Jr OB, Pappas Júnior GJ, Pignolet L, Abadie C, Ciampi AY, Piffanelli P, Miller RNG. Development of expressed sequence tag and EST-SSR marker resources for *Musa acuminata*. AoB Plants Advance Access published September 26, 2012. doi: 10.1093/aobpla/pls030

### OPEN ACCESS – RESEARCH ARTICLE

#### **Development of expressed sequence tag and EST-SSR marker resources for *Musa acuminata***

Marco A. N. Passos<sup>1</sup>, Viviane de Oliveira Cruz<sup>1</sup>, Flavia L. Emediato<sup>1</sup>, Cristiane de Camargo Teixeira<sup>2</sup>, Manoel T. Souza Jr.<sup>3</sup>, Takashi Matsumoto<sup>4</sup>, Vânia C. Rennó Azevedo<sup>3</sup>, Claudia F. Ferreira<sup>5</sup>, Edson P. Amorim<sup>5</sup>, Lucio Flavio de Alencar Figueiredo<sup>1</sup>, Natalia F. Martins<sup>3</sup>, Maria de Jesus Barbosa Cavalcante<sup>6</sup>, Franc-Christophe Baurens<sup>7</sup>, Orzenil Bonfim da Silva Jr<sup>3</sup>, Georgios J. Pappas Júnior<sup>1,3</sup>, Luc Pignolet<sup>8</sup>, Catherine Abadie<sup>8</sup>, Ana Y. Ciampi<sup>3</sup>, Pietro Piffanelli<sup>7,9</sup>, Robert N.G. Miller<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto de Ciências Biológicas, Asa Norte, CEP 70910-900, Brasília DF, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate program in Genomic Science and Biotechnology, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Módulo B, CEP 70.790-160, Brasília, DF, Brazil

<sup>3</sup>EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, CP 02372, CEP 70.770-900, Brasília, DF, Brazil

<sup>4</sup>National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, 305-8602, Japan

<sup>5</sup>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brazil

<sup>6</sup>EMBRAPA Acre, CP 321 BR 364 Km 14, Rio Branco, AC, Brazil

<sup>7</sup>CIRAD / UMR DAP 1098, TA A 96/03 Avenue Agropolis, 34098 Montpellier Cedex 5, France

<sup>8</sup>CIRAD / UMR BGPI, TA A 54/K Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

<sup>9</sup>Present address: Genomics Platform at Parco Tecnologico Padano, Via Einstein, Località Cascina Codazza 26900 Lodi, Italy

<sup>§</sup>Corresponding author

Corresponding author's e-mail address: robertmiller@unb.br

Running title: Passos *et al.* — Expressed sequence tags and SSR markers for *Musa acuminata*

## **ABSTRACT**

### **Background and aims**

Banana (*Musa acuminata*) is a crop contributing to global food security. Many varieties lack resistance to biotic stress, due to sterility and narrow genetic background. The objective of this study was to develop an expressed sequence tag (EST) database of transcripts expressed during compatible and incompatible banana-*Mycosphaerella fijiensis* (*Mf*) interactions. Black leaf streak disease (BLSD), caused by *Mf*, is a destructive disease of banana. Microsatellite markers were developed as a resource for crop improvement.

### **Methodology**

cDNA libraries were constructed from *in vitro*-infected leaves from BLSD-resistant *M. acuminata* ssp. *burmanicoides* Calcutta 4 (MAC4) and susceptible *M. acuminata* cv. Cavendish Grande Naine (MACV). Clones were 5' end Sanger sequenced, ESTs assembled with TGICL and unigenes annotated using BLAST, Blast2GO and InterProScan. Mreps was used to screen for simple sequence repeats (SSRs), with markers evaluated for polymorphism using twenty diploid (AA) *M. acuminata* accessions contrasting in resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases.

### **Principal results**

A total of 9333 high quality ESTs were obtained for MAC4 and 3964 for MACV, which assembled into 3995 unigenes. Of these, 2592 displayed homology to genes encoding proteins with known or putative function, and 266 to genes encoding proteins with unknown function. Gene ontology (GO) classification identified 543 GO terms, 2300 unigenes were assigned to EuKaryotic Orthologous Groups (KOG) categories and 312

mapped to KEGG pathways. A total of 624 SSR loci were identified, with trinucleotide repeat motifs the most abundant in MAC4 (54.1%) and MACV (57.6%). Polymorphism across *M. acuminata* accessions was observed with 75 markers. Alleles per polymorphic Loco ranged from 2 to 8, totaling 289. Polymorphism information content (PIC) ranged from 0.08 to 0.81.

### **Conclusions**

This EST collection offers a resource for studying functional genes, including transcripts expressed in banana-*Mf* interactions. Markers are applicable for genetic mapping, diversity characterization and marker assisted breeding.

Marco A. N. Passos, Viviane de Oliveira Cruz, Flavia L. Emediato, Cristiane de Camargo Teixeira, Vânia C. Rennó Azevedo, Ana C. M. Brasileiro, Edson P. Amorim, Claudia F. Ferreira, Natalia F. Martins, Roberto C. Togawa, Georgios J. Pappas Júnior, Orzenil Bonfim da Silva Jr, Robert N.G. Miller. Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. BMC Genomics 2013, 14:78.

Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development

Marco A. N. Passos<sup>1</sup>, Viviane de Oliveira Cruz<sup>1</sup>, Flavia L. Emediato<sup>1</sup>, Cristiane de Camargo Teixeira<sup>2</sup>, Vânia C. Rennó Azevedo<sup>3</sup>, Ana C. M. Brasileiro<sup>3</sup>, Edson P. Amorim<sup>4</sup>, Claudia F. Ferreira<sup>4</sup>, Natalia F. Martins<sup>3</sup>, Roberto C. Togawa<sup>3</sup>, Georgios J. Pappas Júnior<sup>1</sup>, Orzenil Bonfim da Silva Jr<sup>3</sup>, Robert N.G. Miller<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, CEP 70.910-900, Brasília D.F., Brazil

<sup>2</sup>Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Módulo B, CEP 70.790-160, Brasília, D.F., Brazil

<sup>3</sup>EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, CP 02372, CEP 70.770-900, Brasília, D.F., Brazil

<sup>4</sup>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa, CEP 44.380-000, Cruz das Almas, BA, Brazil

<sup>§</sup>Corresponding author

Email addresses:

MANP: [marconinomia@gmail.com](mailto:marconinomia@gmail.com)

VOC: [vianne.oliveira@gmail.com](mailto:vianne.oliveira@gmail.com)

FLE: [flavinhaleonel@gmail.com](mailto:flavinhaleonel@gmail.com)

CCT: [crisi.teixeira@gmail.com](mailto:crisi.teixeira@gmail.com)

VCRA: [vania.azevedo@embrapa.br](mailto:vania.azevedo@embrapa.br)

ACMB: [ana.brasileiro@embrapa.br](mailto:ana.brasileiro@embrapa.br)

EPA: [edson@cnpmf.embrapa.br](mailto:edson@cnpmf.embrapa.br)

CFF: [claudiaf@cnpmf.embrapa.br](mailto:claudiaf@cnpmf.embrapa.br)

NFM: [natalia.martins@embrapa.br](mailto:natalia.martins@embrapa.br)

RCT: [roberto.togawa@embrapa.br](mailto:roberto.togawa@embrapa.br)

GJPJ: [georgiospappasjr@gmail.com](mailto:georgiospappasjr@gmail.com)

OBSJ: [orzenil.silva@embrapa.br](mailto:orzenil.silva@embrapa.br)

RNGM: [robertmiller@unb.br](mailto:robertmiller@unb.br)

## **Abstract**

### **Background**

Although banana (*Musa* sp.) is an important edible crop, contributing towards poverty alleviation and food security, limited transcriptome datasets are available for use in accelerated molecular-based breeding in this genus. 454 GS-FLX Titanium technology was employed to determine the sequence of gene transcripts in genotypes of *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* Calcutta 4 and *M. acuminata* subgroup Cavendish cv. Grande Naine, contrasting in resistance to the fungal pathogen *Mycosphaerella musicola*, causal organism of Sigatoka leaf spot disease. To enrich for transcripts under biotic stress responses, full length-enriched cDNA libraries were prepared from whole plant leaf materials, both uninfected and artificially challenged with pathogen conidiospores.

### **Results**

The study generated 846,762 high quality sequence reads, with an average length of 334 bp and totalling 283 Mbp. *De novo* assembly generated 36,384 and 35,269 unigene sequences for *M. acuminata* Calcutta 4 and Cavendish Grande Naine,

respectively. A total of 64.4% of the unigenes were annotated through Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) similarity analyses against public databases.

Assembled sequences were functionally mapped to Gene Ontology (GO) terms, with unigene functions covering a diverse range of molecular functions, biological processes and cellular components. Genes from a number of defense-related pathways were observed in transcripts from each cDNA library. Over 99% of contig unigenes mapped to exon regions in the reference *M. acuminata* DH Pahang whole genome sequence. A total of 4068 genic-SSR loci were identified in Calcutta 4 and 4095 in Cavendish Grande Naine. A subset of 95 potential defense-related gene-derived simple sequence repeat (SSR) loci were validated for specific amplification and polymorphism across *M. acuminata* accessions. Fourteen loci were polymorphic, with alleles per polymorphic Locus ranging from 3 to 8 and polymorphism information content ranging from 0.34 to 0.82.

## **Conclusions**

A large set of unigenes were characterized in this study for both *M. acuminata* Calcutta 4 and Cavendish Grande Naine, increasing the number of public domain *Musa* ESTs. This transcriptome is an invaluable resource for furthering our understanding of biological processes elicited during biotic stress in *Musa*. Gene-based markers will facilitate molecular breeding strategies, forming the basis of genetic linkage mapping and analysis of quantitative trait loci.

## **Keywords**

*Musa acuminata*, *Mycosphaerella musicola*, biotic stress, transcriptome, 454 pyrosequencing, SSR

## ANEXO III

### RESUMOS EXPANDIDOS

Passos, MAN, Emediato, FL, Cruz, VO, de Camargo Teixeira C, de Alencar Figueiredo, LF, Martins, NF, Togawa, RC, Costa, MMC, Silva Jr, O, Pappas Jr GJ, Miller, RNG 2011. Understanding plant immunity: Transcriptome Profiling In Musa-pathogen interactions using Next Generation Sequencing. In: International ISHS/ProMusa Symposium - Bananas and Plantains: Toward sustainable global production and improved uses. 10-14 October 2011, Salvador, Bahia State, Brazil

#### **Understanding plant immunity: Transcriptome Profiling In Musa-pathogen interactions using Next Generation Sequencing**

Miller, RNG<sup>1</sup>, Passos, MAN<sup>1</sup>, Emediato, FL<sup>1</sup>, Cruz, VO<sup>1</sup>, de Camargo Teixeira C<sup>2</sup>, de Alencar Figueiredo, LF,<sup>1</sup> Martins, NF<sup>3</sup>, Togawa, RC<sup>3</sup>, Costa, MMC<sup>3</sup>, Silva Jr, O<sup>3</sup>, Pappas Jr GJ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Asa Norte, CEP 70.910-900, Brasília, DF, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Módulo B, CEP 70.790-160, Brasília, DF, Brazil

<sup>3</sup>EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, CP 02372, CEP 70.770-900, Brasília, DF, Brazil

**Keywords:** Plant immunity, *Musa acuminata*, *Mycosphaerella musicola*, 454 transcriptome sequencing

#### Abstract

The development of novel approaches for crop protection requires continued advances in our understanding of the molecular mechanisms controlling plant immunity. Molecular and genomics tools have advanced our understanding, with two key branches currently recognized. In one, plant innate defense is governed by PAMP-triggered immunity (PTI), following host recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Successful pathogens can, however, suppress PTI signaling through evolution of specific effector proteins. Plants, in response, have co-evolved cytoplasmic resistance (R) protein receptors which establish effector-triggered

immunity (ETI), a second immune system branch which recognizes specific pathogen effectors. Although banana (*Musa* sp.) is one of the world's most important edible crops, contributing towards food security, a comprehensive transcriptomic dataset is not yet available for use in accelerated molecular-based breeding. In order to develop a functional genomics resource for this crop which reveals transcriptional changes during plant immunity responses to biotic stress, we performed a pyrosequencing study of expressed genes in *M. acuminata* during compatible and incompatible reactions with the fungal pathogen *Mycosphaerella musicola*, causal organism of Yellow Sigatoka disease. Total RNA samples were prepared from whole plant leaf material from cultivars Calcutta 4 (resistant) and Cavendish Grande Naine (susceptible), both uninfected and artificially challenged with pathogen conidiospores. Full-length enriched cDNA libraries were sequenced using a 454 GS-FLX system pyrosequencer with Titanium chemistry, generating 978133 raw sequencing reads, with an average length of 334 bp and totalling over 460 million bp. Over 35000 unigenes were assembled for each *M. acuminata* cultivar, with approximately 70% displaying no significant identity to any sequences in the public databases. *In silico* analysis identified differentially expressed genes associated with stress and response to biotic stimuli. Datasets were exploited for identification of expressed resistance gene analogs and defense genes, as well as large scale SSR marker development. These resources will contribute to our understanding of plant immunity processes in *Musa*, facilitating disease-management based upon genetic improvement.



## RESUMOS

V.O. Cruz, V.C.R. Azevedo, A.Y. Ciampi, E.P. Amorim, C.C.F. Ferreira, R.N.G. Miller. 2011. Characterization of EST-derived SSR markers in *Musa acuminata*. In: International ISHS/ProMusa Symposium - Bananas and Plantains: Toward sustainable global production and improved uses. 10-14 October 2011, Salvador, Bahia State, Brazil

### Characterization of EST-derived SSR markers in *Musa acuminata*

V.O. Cruz<sup>1</sup>, V.C.R. Azevedo<sup>2</sup>, A.Y. Ciampi<sup>2</sup>, E.P. Amorim<sup>3</sup>, C.C.F. Ferreira<sup>3</sup>, R.N.G. Miller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Brasília, DF, Brazil

<sup>2</sup>EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil.

<sup>3</sup>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, Brazil,

Keywords: *Musa acuminata*, SSR markers, ESTs

Banana (*Musa* spp.) is one of the world's most important monocotyledonous crops. Many cultivars are susceptible to fungal diseases such as Black and Yellow Sigatoka, which attack leaf tissues and can cause production losses of up to 100%. Genetic breeding programs have been based upon selection of resistant individuals. The objectives of this study were to characterize 303 SSR markers derived from cDNA libraries prepared from *Musa acuminata* leaf materials contrasting in resistance and *in vitro* infected with *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka disease, and identify potential association with Sigatoka resistance. A total of 170 primer pairs were designed from *M. acuminata* Cavendish subgroup, cultivar Grande Naine (AAA) (susceptible), together with 133 pairs in the cultivar Calcutta 4 (AA) (resistant). Marker polymorphism was initially examined using four DNA bulks obtained from 20 *M. acuminata* diploid individuals contrasting in resistance to Black and Yellow Sigatoka diseases. Primer annealing temperatures were optimized between 50-60°C and polymorphism examined on 4% polyacrylamide gels with silver staining. Currently, 25% of the loci display polymorphism, 25% monomorphism, 34% show problems in amplification and the other 16% are in the process of characterization. Polymorphic markers were tested against individualized bulks in order to determine if members displayed common alleles. Data were analysed using the software Powermaker 3.25. A total of between two and seven alleles per Loco were observed, with an average of four. From an expected heterozygosity ( $H_e$ ) of 0.55, an observed heterozygosity ( $H_o$ ) of 0.48 was observed, with a PIC value of 0.50. Polymorphic markers will be important in genotyping and in genetic map construction for *Musa* segregating populations.

V.O. Cruz, V.C.R. Azevedo, G. J. Pappas Jr, O.S. Junior, R.N.G. Miller. 2011. SSR mining in 454 transcriptome sequencing-derived *Musa acuminata* unigenes. In: International ISHS/ProMusa Symposium - Bananas and Plantains: Toward sustainable global production and improved uses. 10-14 October 2011, Salvador, Bahia State, Brazil

**SSR mining in 454 transcriptome sequencing-derived *Musa acuminata* unigenes**

V.O. Cruz<sup>1</sup>, V.C.R. Azevedo<sup>2</sup>, G. J. Pappas Jr<sup>2</sup>, O.S. Junior<sup>2</sup>, R.N.G. Miller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Brasília, DF, Brazil

<sup>2</sup>EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil.

**Keywords:** SSR markers, genetic improvement, 454 transcriptome sequencing

**Abstract**

Massively parallel pyrosequencing-based transcriptome analysis is an efficient approach for large scale functionally relevant gene-derived SSR discovery. The objectives of this study were to identify SSR loci in unigene sequences generated using 454 transcriptome pyrosequencing, verifying predicted gene function and *in silico*-derived differential expression. cDNA libraries were prepared from total RNA material extracted from leaf material in *M. acuminata* cultivars Calcutta 4 and Cavendish Grande Naine, both uninoculated and inoculated with *Mycosphaerella musicola*, causal agent of Yellow Sigatoka disease. The *M. acuminata* cultivar Calcutta 4 is a wild diploid widely used as a donor of biotic stress resistance genes in conventional breeding programs for improved polyploids. cDNA libraries for each challenged cultivar were submitted to 454 sequencing, with 24246 and 23729 contigs identified for Calcutta 4 and Cavendish Grande Naine, respectively. *In silico*-based gene function prediction was made against the NCBI Genbank database. Contigs were analysed for SSRs using the program mreps and flanking primer pairs designed using Primer3. A total of 4098 and 4096 SSR loci, where flanking primers could be designed, were identified in Calcutta 4 and Cavendish datasets, respectively. From these, 75% are associated with unigenes coding proteins with known function, 0.13% (11) with unigenes potentially involved in defense or stress responses, and 96% associated with genes differentially expressed under conditions of infection and non-infection by *M. musicola*. Overall, microsatellites were present in 24% of unigenes with predicted function. Marker validation in *M. acuminata* diploid material contrasting in resistance to Black and Yellow Sigatoka diseases is currently ongoing. The microsatellites identified, particularly those associated with genes potentially involved in defense or stress responses, will serve as useful tools for employment in *Musa* genetic improvement programs.