

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**ANÁLISE MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA DE DEFESA À SIGATOKA-NEGRA EM
BANANEIRA**

Sávio Luiz Pereira Nunes

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

2020

ANÁLISE MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DE DEFESA À SIGATOKA-NEGRA EM BANANEIRA

SÁVIO LUIZ PEREIRA NUNES

Biólogo

Universidade Federal do Vale do São Francisco – 2017

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

Orientadora: D.Sc. Cláudia Fortes Ferreira

Co-orientador: D.Sc. Edson Perito Amorim

Co-orientadora: D.Sc. Vanusia Batista de Oliveira Amorim

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

N972a

Nunes, Sávio Luiz Pereira

Análise molecular de genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira/ Cheila Bonati do Carmo de Sousa. _ Cruz das Almas, BA, 2020.
67f.; il.

Orientador: Profª. Drª. Cláudia Fortes Ferreira
Co-Orientador: Profª. Drª. Vanusia Batista de Oliveira Amorim

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

1. Banana. 2. Cultivo da Banana 3. Controle de Doença - Sigatoka-negra. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.722

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Neubler Nilo Ribeiro da Cunha (*Bibliotecário - CRB5/1578*)
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

**ANÁLISE MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DE DEFESA
À SIGATOKA-NEGRA EM BANANEIRA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Sávio Luiz Pereira Nunes

Aprovado em 30 de junho de 2020

D.Sc. Cláudia Fortes Ferreira
Embrapa Mandioca e Fruticultura, BA
Orientadora

Profa. D.Sc. Simone Alves Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, BA
Examinadora interna

Profa. D.Sc. Eva Maria Rodrigues Costa
Faculdade Maria Milza, BA
Examinadora externa

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus Pai, à minha mãe, Cícera Sandra, à minha irmã, Bárbara Yanne e à minha sobrinha, Laura Sophia, por todo amor, apoio e fortaleza dispostos a mim, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus Pai, que me guarda em todos os meus caminhos e enche minha vida do Seu amor e misericórdia.

À minha mãe, Cícera Sandra Pereira dos Santos, por todo amor e carinho e por me incentivar em todas as etapas da minha vida profissional.

À minha irmã, Bárbara Yanne Pereira Nunes, pelo amor e apoio de longa data.

À minha sobrinha, Laura Sophia, por me trazer alegria todos os dias.

Ao meu namorado, Ubiratan Neto, por todo amor, apoio e carinho.

À D.Sc. Cláudia Fortes Ferreira pela orientação, apoio e paciência, sem os quais este trabalho jamais poderia ter sido realizado.

Aos D.Sc. Vanusia Amorim e Rogério Merces por toda assistência e disponibilidade em me auxiliar na execução deste trabalho.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade de ser discente do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Mandioca e Fruticultura pela estrutura fornecida à execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro a este estudo.

Ao pessoal dos Laboratórios de Cultura de Tecidos e de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial a Andresa e Raimundo, sempre prestativos e pacientes na rotina de trabalho.

Aos amigos que o mestrado me proporcionou: Caique, Hilçana e Glendon por todo apoio e carinho.

À D.Sc. Carolina Vianna Morgante, pelo incentivo em seguir na genética e por todo o apoio na minha carreira profissional.

À Profa. D.Sc. Jane Eyre Gabriel, pelo imenso carinho e apoio sempre a mim reservados desde a graduação.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Torne meu sofrimento em testemunho”

Oração - Os arrais

ANÁLISE MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DE DEFESA À SIGATOKA-NEGRA EM BANANEIRA

RESUMO: A banana (*Musa spp.*) é o fruto mais consumido no mundo, possuindo um importante papel socioeconômico, principalmente por ser adotada pela agricultura familiar e populações pobres de muitos países em desenvolvimento. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana, no entanto, a *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de Sigatoka-negra, tem acometido os cultivos de bananeiras no Brasil, provocando perdas da ordem de 100% na produção. O controle dessa doença é realizado através da utilização de cultivares resistentes e/ou o controle químico via aplicação de fungicidas e da adoção de medidas que evitem a dispersão do inóculo. No entanto, o uso de cultivares resistentes é a estratégia ideal do ponto de vista ambiental e socioeconômico. Para auxiliar os programas de melhoramento no desenvolvimento de novas cultivares, a biotecnologia pode ser empregada como ferramenta auxiliar, contribuindo na elucidação dos mecanismos de defesa das plantas frente ao ataque de organismos fitopatogênicos por meio da análise do transcrito. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica relativa dos genes candidatos *psl*, *psll*, *irl*, *utp* e *prk*, envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra nas cultivares de bananeira Calcutta-4, Krasan Saichon, Grande Naine e Akondro Mainty por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), além de analisar em detalhes esses genes e proteínas por eles codificadas por meio de ferramentas de bioinformática. Em casa de vegetação, foi imposto o estresse biótico em plantas de 6 meses de idade durante cinco intervalos de coleta. Dos genes avaliados, *utp* e *prk* apresentaram baixa eficiência de qPCR, o que inviabilizou a análise da expressão gênica relativa. Os genes *psll* e *irl* sofreram regulação positiva durante interação incompatível nas cultivares Calcutta-4 e Krasan Saichon, respectivamente, e foram validados neste estudo. Enquanto isso, em Grande Naine, houve regulação negativa precoce dos genes *psl*, *psll* e *irl* durante interação compatível e regulação positiva tardia do gene *psll*. Não houve expressão significativa de nenhum dos genes na cultivar suscetível Akondro Mainty. Quanto às análises de biologia computacional, o gene *utp* apresentou maior número de íntrons e éxons. De modo geral, foram detectados elementos *cis* envolvidos na resposta ao estresse biótico, como as-1, w box e STRE, na região promotora dos genes estudados. Ademais, foram descritas as modificações pós-traducionais bem como os *motifs* e famílias das proteínas analisadas contribuindo, assim, para melhor compreensão das suas funções dentro do patossistema *Musa spp.* x *M. fijiensis*. Os dados deste trabalho corroboram os estudos de fenotipagem das cultivares de bananeira acometidas pela Sigatoka-negra em campo. Assim, os resultados aqui obtidos fornecem tanto informações pertinentes às estratégias de cruzamento, quanto sobre os genes validados de modo que esses possam ser utilizados na seleção assistida por marcadores (SAM), cisgenia e/ou CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Regions*) visando a obtenção de cultivares mais tolerantes e resistentes à Sigatoka-negra.

Palavras-chave: biologia computacional; RT-qPCR; *Musa spp.*; *Mycosphaerella fijiensis*

MOLECULAR ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN THE DEFENSE RESPONSE TO BLACK SIGATOKA IN BANANA

ABSTRACT: The banana (*Musa* spp.) is the most consumed fruit in the world, having an important socioeconomic role, mainly because it is adopted by family farming and poor populations in many developing countries. Brazil is the fourth largest banana producer in the world, however, *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of Black Sigatoka, has affected banana plantations in Brazil, causing losses of around 100% in production. The control of this disease is accomplished through the use of resistant cultivars and/or chemical control through the application of fungicides and the adoption of measures that prevent the spread of the inoculum. However, the use of resistant cultivars is the ideal strategy from an environmental and socioeconomic point of view. To assist breeding programs in the development of new cultivars, biotechnology can be used as an auxiliary tool, helping to elucidate the defense mechanisms of plants against attack by phytopathogenic organisms through the analysis of the transcriptome. Therefore, the objective of this work was to evaluate the relative expression of the candidate genes *psl*, *psll*, *irl*, *utp* and *prk* involved in the defense response to Black Sigatoka in banana cultivars Calcutta-4, Krasan Saichon, Grande Naine and Akondro Mainty using the real-time quantitative PCR technique (RT-qPCR), in addition to analyzing in details these genes and proteins encoded by them using bioinformatics tools. In the greenhouse, biotic stress was imposed on 6-month-old plants during five collection intervals. Of the evaluated genes, *utp* and *prk* genes showed low qPCR efficiency, which made it unfeasible to analyze the expression. The *psll* and *irl* genes were positively regulated during the incompatible interaction in the cultivars Calcutta-4 and Krasan Saichon, respectively, and were validated in this study. Meanwhile, in Grande Naine, there was early negative regulation of the *psl*, *psll* and *irl* genes during compatible interaction and late positive regulation of the *psll* gene. There was no significant expression of any of the genes in the susceptible cultivar Akondro Mainty. As for computational biology analyzes, the *utp* gene showed the highest number of introns and exons. In general, cis elements involved in the response to biotic stress, such as as-1, w box and STRE, were detected in the promoter region of the studied genes. Furthermore, post-translational modifications, motifs and the families of the analyzed proteins were described, thus contributing to a better understanding of their functions within the *Musa* spp. X *M. fijiensis* pathosystem. The data of this work corroborate phenotypic studies of banana cultivars affected by Black Sigatoka in field trials. Thus, the results obtained here provide both information pertinent to crossing strategies, as well as about the validated genes so that they can be used in marker assisted selection (MAS), cisgenics and/or CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Regions) in order to obtain cultivars that are more tolerant and resistant to Black Sigatoka.

Key words: computacional biology; RT-qPCR; *Musa* spp.; *Mycosphaerella fijiensis*

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
aa	Aminoácido
ACT1	Actina 1
Avr	Avirulência
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
cDNA	DNA complementar
Cq	Ciclo ótimo de quantificação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EF1	Fator de alongação 1
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETI	Imunidade acionada por efetor
ETS	Suscetibilidade acionada por efetor
GC	Guanina-citosina
GRAVY	Média de hidropaticidade
ha	Hectare
HR	Resposta hipersensitiva
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
Mw	Peso molecular
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
NTC	Controle negativo
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pI	Ponto isoelétrico
PMGB	Programa de Melhoramento Genético da Banana
PRR	Receptores de reconhecimento patogênico
PTI	Imunidade acionada por PAMPs
R	Resistente
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
RT-qPCR/ qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
S	Suscetível
SA	Sigatoka-amarela
Ser	Serina
SN	Sigatoka-negra
Thre	Treonina
ton	Tonelada
Tyr	Tirosina
UTR	Região não-traduzida
ΔΔCq	Quantificação relativa do ciclo ótimo de quantificação comparativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento da Sigatoka-negra em bananeira, adaptado de Agrios (2005).....	3
Figura 2. Estádios de desenvolvimento da Sigatoka-negra, adaptado de Marín et al. (2003)	4
Figura 3. Grupos controle e tratamento compostos pelas cultivares de bananeira estudadas, Embrapa Mandioca e Fruticultura, BA, 2020.....	8
Figura 4. Bioensaio: Patossistema <i>Musa</i> spp. x <i>M. fijiensis</i> , Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	9
Figura 5. Esquema experimental de inoculação por cultivar considerando os intervalos de coleta: 0, 3, 9, 15 e 21 dias após a inoculação (DPI). Os círculos evidenciam o terço médio foliar coletado em cada planta para análise molecular, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	10
Figura 6. Amostras de RNA total de folhas de bananeira 21 dias após a inoculação, visualizadas por separação eletroforética em gel de agarose 1%, evidenciando as bandas correspondentes ao rRNA 28S (superior) e 18S (inferior). Poço M: Marcador 1 kb. Poços 1 e 2: Calcutta-4/Planta1/Replicata 1. Poços 3 e 4: Calcutta-4/Planta1/Replicata 2. Seta – DNA no gel de agarose. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	15
Figura 7. Amostras de RNA total de folhas de bananeira 21 dias após a inoculação após tratamento com DNase, visualizadas por separação eletroforética em gel de agarose 1%. As bandas correspondentes ao rRNA 28S (superior) e 18S (inferior) são evidenciadas pelas setas. Poço M: Marcador 1 kb. Poço 1: Calcutta-4/Planta 1. Poço 2: Calcutta-4/Planta 2. Poço 3: Calcutta-4/Planta 3, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	15
Figura 8. Produtos de PCR para verificação da viabilidade de cDNA 21 dias após a inoculação, visualizados por separação eletroforética em gel de agarose 2%. As bandas correspondentes ao amplicon gerado pelo primer 25S (106 pb) são evidenciadas pela seta. Poço M: Marcador 50 pb. Poço 1: Calcutta-4/Planta 1. Poço 2: Calcutta-4/Planta 2. Poço 3: Calcutta-4/Planta 3, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	16
Figura 9. Produtos de PCR utilizando os iniciadores tubulina e EF1, visualizados por separação eletroforética em gel de agarose 2%. As setas evidenciam as bandas inespecíficas. Poço M: Marcador 50 pb. Poços 1 e 6: Calcutta-4/Planta 1. Poços 2 e 7: Grande Naine/Planta 2. Poços 3 e 8: Krasan Saichon/Planta 1. Poços 4 e 9: Akondro Mainty/Planta 2. Poços 5 e 10: Controle negativo (NTC), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020....	17

Figura 10. Produtos de PCR utilizando os iniciadores 25S e ACT1, visualizados por separação eletroforética em gel de agarose 2%. Os parênteses evidenciam as bandas correspondentes aos amplicons dos iniciadores. Poço M: Marcador 50 pb. Poço 1: Calcutta-4/Planta 3. Poço 2: Krasan Saichon/Planta 1. Poço 3: Controle negativo (NTC). Poços 4 e 5: Krasan Saichon/Planta 1. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	17
Figura 11. Curva padrão para o iniciador 25S gerada pelo programa 7500 (Applied Biosystems). As amostras padrão foram diluídas em um fator 1:5. Eficiência: 98,707%, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	18
Figura 12. Curva padrão para o iniciador ACT1 gerada pelo programa 7500 (Applied Biosystems). As amostras padrão foram diluídas em um fator 1:5. Eficiência: 89,128%, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	18
Figura 13. Curvas de dissociação (<i>melting</i>) obtidas a partir da amplificação dos genes mostrando um pico bem definido, que confirma amplificação específica da molécula alvo. (A) gene <i>psI</i> , (B) gene <i>psII</i> , (C) gene <i>irI</i> , (D) gene <i>act1</i> . Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	21
Figura 14. Curvas de dissociação (<i>melting</i>) obtidas a partir da amplificação dos genes mostrando picos diversos, que confirmam amplificação inespecífica da molécula alvo. (A) gene <i>utp</i> , (B) gene <i>prk</i> , Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	22
Figura 15. Razão entre os níveis de mRNA dos genes <i>psI</i> , <i>psII</i> e <i>irI</i> entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Calcutta-4 (resistente à Sigatoka-negra) em escala logarítmica para cada intervalo de coleta em dias após a inoculação (DPI). Os dados foram normalizados pelos genes da actina 1 e 25S. (*) Valores de expressão com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de randomização de alocação fixa em pares no programa REST 2009 (PFAFFL et al., 2002), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	23
Figura 16. Razão entre os níveis de mRNA dos genes <i>psI</i> , <i>psII</i> e <i>irI</i> entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Krasan Saichon (resistente à Sigatoka-negra) em escala logarítmica para cada intervalo de coleta em dias após a inoculação (DPI). Os dados foram normalizados pelos genes da actina 1 e 25S. (*) Valores de expressão com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de randomização de alocação fixa em pares no programa REST 2009 (PFAFFL et al., 2002), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	25
Figura 17. Razão entre os níveis de mRNA do gene <i>psII</i> entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Grande Naine	

(suscetível à Sigatoka-negra) em escala logarítmica para cada intervalo de coleta em dias após a inoculação (DPI). Os dados foram normalizados pelos genes da actina 1 e 25S. (*) Valores de expressão com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de randomização de alocação fixa em pares no programa REST 2009 (PFAFFL et al., 2002), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020..... 27

Figura 18. Razão entre os níveis de mRNA dos genes *psl*, *psII* e *irl* entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Akondro Mainty (suscetível à Sigatoka-negra) em escala logarítmica para cada intervalo de coleta em dias após a inoculação (DPI). Os dados foram normalizados pelos genes da actina 1 e 25S. (*) Valores de expressão com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de randomização de alocação fixa em pares no programa REST 2009 (PFAFFL et al., 2002), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020..... 28

Figura 19. *Motifs* conservados em proteínas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra obtidos pelo programa MEME. Name: Proteína. *P-value*: significância estatística. *Motif locations*: localização dos *motifs*. *Symbol*: símbolo. *Motif consensus*: sequência consenso do *motif*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cultivares de bananeira e suas características, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	8
Tabela 2. Iniciadores correspondentes aos genes de referência descritos por Podevin et al. (2012), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	11
Tabela 3. Desenho de iniciadores, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	20
Tabela 4. Quantidade de íntrons e éxons nos genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	29
Tabela 5. Região aberta de leitura de genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.	30
Tabela 6. Elementos reguladores de ação <i>cis</i> dos promotores de genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	32
Tabela 7. Quantidade de elementos <i>cis</i> responsivos a estresse biótico e suas posições, identificados na região promotora de genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	34
Tabela 8. Modificações pós-traducionais de proteínas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	37
Tabela 9. Características de proteínas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1 Material genético.....	7
2.2 Bioensaio: Patossistema <i>Musa</i> spp. x <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	8
2.3 Análise Molecular.....	10
2.3.1 Extração e tratamento de RNA.....	10
2.3.2 Síntese e viabilidade de cDNA.....	10
2.3.3 Desenho de iniciadores.....	11
2.3.4 Validação de genes de referência.....	11
2.3.5 Análise da expressão gênica.....	12
2.4 Análise de Bioinformática.....	13
2.4.1 Análise gênica.....	13
2.4.2 Análise proteica.....	13
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
3.1 Análise Molecular.....	14
3.2 Análise de Bioinformática.....	29
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A bananeira é uma planta monocotiledônea do gênero *Musa*, pertencente à família Musaceae e ordem Zingiberales (TOMLINSON, 1969). O sudeste asiático e oeste do Pacífico têm sido relatados na literatura como o centro de origem dessa cultura (DE LANGHE et al., 2009) e os principais centros de diversidade estão localizados na Malásia ou Indonésia (DANIELLS et al., 2001). A bananeira foi trazida à América do Sul por volta dos séculos XV e XVI pelos colonizadores portugueses (SILVA et al., 2011). Sob ponto de vista morfológico, a bananeira é uma planta herbácea com caule subterrâneo de reserva, o rizoma, de onde emergem as raízes adventícias e primárias. A copa é formada por folhas largas e compridas que possuem nervura central desenvolvida. As bainhas foliares se unem formando o pseudocaule. Do centro da copa desponta a inflorescência com brácteas ovulares e roxo-avermelhadas, em cujas axilas se localizam as flores. Essas flores, em conjunto, formam as pencas com número variado de frutos partenocárpicos a depender da cultivar (BORGES et al., 2009).

Ademais, a bananicultura é característica de regiões tropicais e subtropicais e amplamente adotada pela agricultura familiar, tornando-se vital para a segurança alimentar (SILVA et al., 2011). Em 2018, a produção mundial de banana ficou em torno de 115,7 milhões de toneladas (ton) e a área colhida por volta de 5,7 milhões de hectares. Os maiores produtores do mundo são Índia, China, Indonésia e Brasil, respectivamente. A produção nacional de banana atingiu, em 2018, cerca de 6,7 milhões de toneladas, já a área colhida foi de aproximadamente, 466 mil hectares (FAOSTAT, 2020).

No entanto, o baixo nível de adoção de tecnologias e os problemas provocados por estresses abióticos e bióticos, têm afetado drasticamente o sistema produtivo da bananeira. Além disso, ainda é incipiente o número de cultivares passíveis de exploração comercial que forneçam frutos apreciados pelo mercado e sejam tolerantes a estresses bióticos (doenças e pragas). As doenças de maior expressão econômica para a cultura da banana são as viroses, o Moko da bananeira, a Fusariose e as Sigatokas. As viroses são causadas por *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) e *Banana Streak Virus* (BSV). O Moko da bananeira tem como agente etiológico a raça 2 da bactéria *Ralstonia solanacearum*. As principais doenças fúngicas, são a Fusariose

(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) e as Sigatokas amarela (*Mycosphaerella musicola*) e negra (*Mycosphaerella fijiensis*) (SILVA et al., 2013).

Das cultivares mais utilizadas pelos agricultores brasileiros a Prata-Anã, Pacovan, Grande Naine, Terra Maranhão e Maçã são muito suscetíveis a Sigatoka-negra. Com relação à Fusariose, as cultivares Grande Naine e a Terra são resistentes, a banana Maçã é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis (CORDEIRO et al., 2016).

A Sigatoka-negra ou Doença da Estria Negra da Bananeira, é a mais importante da cultura, uma vez que sua distribuição abrange as áreas tropicais de cultivo e tem impacto negativo na produção de frutos. Essa doença foi inicialmente descrita em 1963, nas Ilhas Fiji, Oceania, porém amostras de herbários sugerem a ocorrência mesmo antes disso, nas regiões da Ásia e Pacífico (CORDEIRO, 2011). O primeiro registro de ocorrência de Sigatoka-negra no Brasil foi em 1998, no Estado de Amazonas e ela rapidamente se disseminou atingindo, em 1999, a região central do país (CORDEIRO, 2011). A região nordeste foi considerada livre de Sigatoka-negra até 2015, quando houve o primeiro relato da doença no recôncavo do Estado da Bahia (RAMOS et al., 2018).

Aliás, o agente etiológico da Sigatoka-negra é o fungo hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (fase anamórfica *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton) pertencente ao Filo Ascomycota. O caráter hemibiotrófico desse micro-organismo permite que ele colonize e se alimente tanto de tecidos vegetais vivos (fase biotrófica) quanto de tecidos mortos (fase necrotrófica), garantindo o sucesso da disseminação da doença mesmo após a morte dos tecidos do hospedeiro. O ciclo de *M. fijiensis* é composto pelas fases de germinação dos esporos assexuais (conídios) e/ou sexuais (ascósporos), seguida por penetração no hospedeiro, desenvolvimento de sintomas e, por fim, produção de conídios e/ou ascósporos, conforme evidencia a Figura 1, adaptada de Agrios (2005) (CHURCHILL, 2011).

Sabendo-se disso, é possível identificar o principal sintoma da doença, a saber, manchas diminutas que coalescem em estrias negras paralelas à venação foliar, que se fundem causando necrose. Fouré (1985) organizou os sintomas da Sigatoka-negra em seis estádios, de acordo com a Figura 2, adaptada de Marín et al. (2003). No estágio I são visíveis pontos amarelados na porção abaxial da folha. No estágio II os pontos se alongam em estrias de coloração marrom-avermelhada. Em seguida, no estágio III, as estrias crescem em largura e comprimento e sua coloração fica mais

próxima do marrom. Depois, no estágio IV, as estrias na superfície abaxial apresentam coloração marrom escura e, na superfície adaxial, ficam enegrecidas. No estágio V há formação de um halo clorótico em torno das manchas negras e necróticas, que denotam uma leve depressão. Finalmente, no estágio VI, as lesões apresentam centros de coloração cinza nos quais é possível observar pontos pretos, os pseudotécios, onde os ascósporos são produzidos.

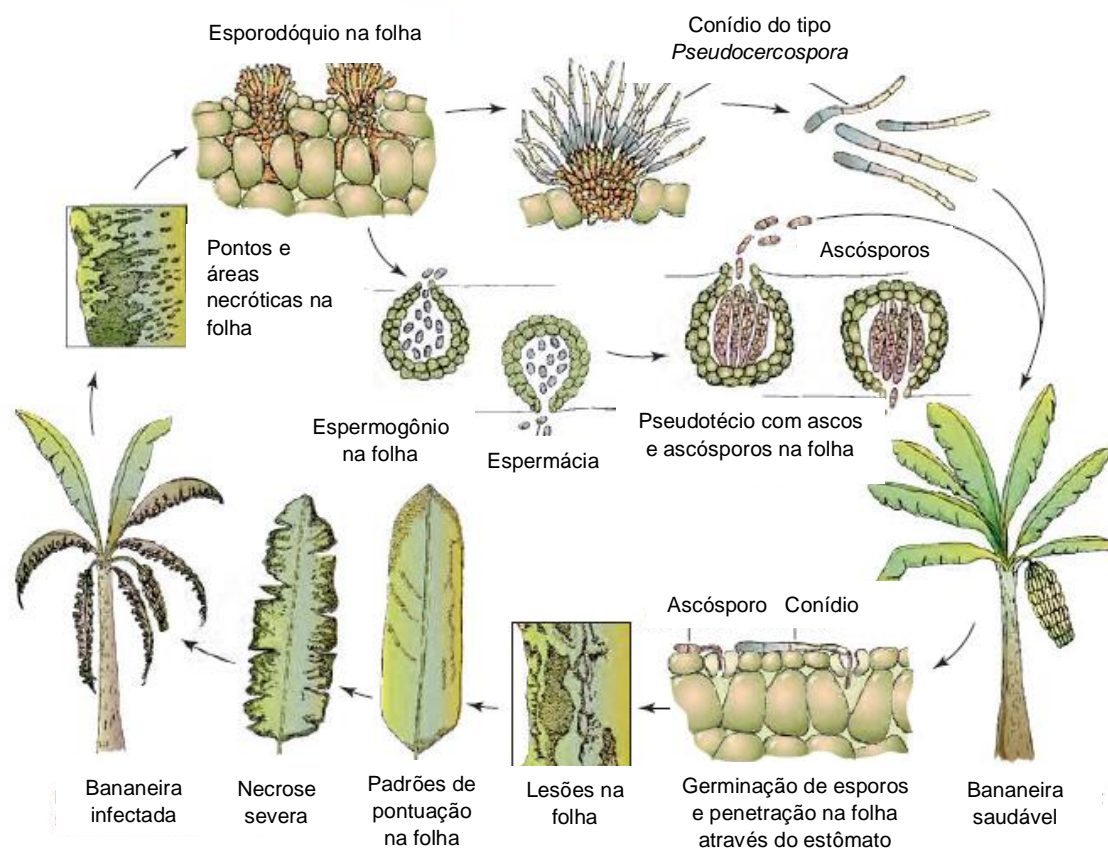


Figura 1. Desenvolvimento da Sigatoka-negra em bananeira, adaptado de Agrios (2005).

Assim, a Sigatoka-negra é classificada no grupo V de doenças de plantas proposto por McNew (1960). As doenças pertencentes a esse grupo afetam a fotossíntese e são caracterizadas pela formação de manchas foliares. Na Sigatoka-negra, o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas são afetados pelo comprometimento da capacidade fotossintética e perda acelerada de folhas. Por isso, ocorre redução da produtividade e maturação precoce dos frutos em plantas infectadas (SANTOS et al., 2006).

Os principais métodos de controle da Sigatoka-negra são o cultural, químico e genético. O método cultural visa estabelecer condições microclimáticas que desfavoreçam o desenvolvimento da doença, impedindo, por exemplo, a dispersão do

inóculo, como a drenagem, desfolha sanitária e combate a plantas espontâneas (daninhas). O controle químico é o método mais utilizado atualmente e se dá por meio da aplicação de fungicidas sistêmicos e protetores, gerando gastos exorbitantes aos produtores. Por fim, o controle genético se presta como uma alternativa mais interessante do ponto de vista ambiental e socioeconômico, pois busca substituir cultivares suscetíveis por resistentes a fim de eliminar ou reduzir o uso de fungicidas (CORDEIRO et al., 2011).

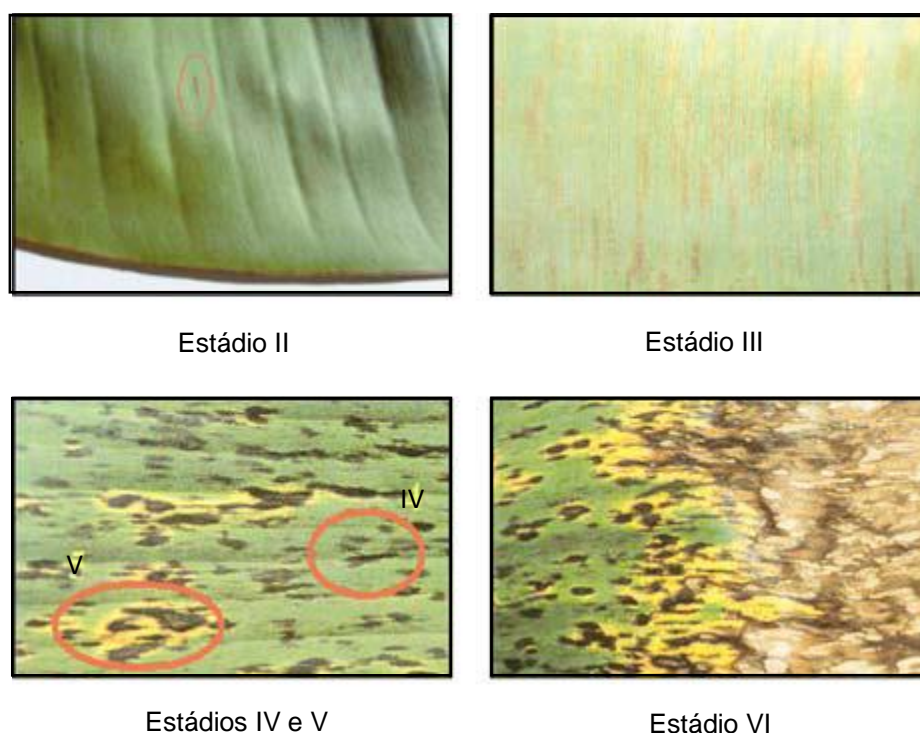


Figura 2. Estádios de desenvolvimento da Sigatoka-negra, adaptado de Marín et al. (2003).

Diante dos entraves à bananicultura, em 1976, foi implementado o Programa de Melhoramento Genético da Banana (PMGB) pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Mandioca e Fruticultura, na cidade de Cruz das Almas – BA. O PMGB é o principal programa de melhoramento da banana do Brasil e se baseia em estratégias como cruzamento, duplicação de cromossomos e indução de mutação no desenvolvimento de cultivares. Entre essas cultivares estão BRS Caprichosa, BRS Garantida, BRS Japira, BRS Preciosa e BRS Princesa. Também foram recomendadas pela Embrapa variedades como Caipira, Thap Maeo, Maravilha e Pacovan Ken, resistentes à Sigatoka-negra. Ainda vale acrescentar que coletas nacionais e

internacionais subsidiaram a criação do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Banana, essencial ao estabelecimento do PMGB (AMORIM et al., 2016).

A esse Banco de Germoplasma pertencem as cultivares Calcutta-4 (DE LANGHE, 1969), Krasan Saichon (resistentes à SN), Akondro Mainty e Grande Naine (suscetíveis à SN) (SILVA et al., 1999). Essas cultivares são importantes nos cruzamentos realizados no âmbito do PMGB visando a obtenção de cultivares resistentes à Sigatoka-negra e também por apresentarem características contrastantes em estudo de fenotipagem em campo desenvolvido por Nascimento (2019), no qual foram estimadas a área abaixo da curva do progresso da doença, o índice de severidade da doença e o aumento da severidade da doença, que permitiu a identificação eficiente de acessos de bananeira com resistência à Sigatoka-negra.

Além disso, estudos como os de Portal et al. (2011) e Rodriguez et al. (2016) têm identificado genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira. Isso é possível devido aos avanços nas análises de transcrito e expressão gênica, que permitem a elucidação de processos celulares e fisiológicos envolvidos em diferentes condições ambientais, tais como o estresse biótico. A Reação em cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (RTqPCR ou qPCR) é uma técnica experimental que permite a validação de genes envolvidos nesses processos biológicos e possibilita o refinamento de dados de bibliotecas de cDNA e transcrito (RNA-Seq) (MORGANTE; BLAWID, 2016).

A qPCR consiste em uma amplificação exponencial de determinado fragmento de DNA ou cDNA seguida de uma quantificação, por meio de medidas de fluorescência, associada à síntese de um *amplicon*. A combinação de amplificação e quantificação confere a essa técnica robustez, sensibilidade e alta reprodutibilidade para medidas quantitativas da expressão gênica (MORGANTE; BLAWID, 2016).

Dentre os genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira estão *psI*, *psII*, *irl*, *utp* e *prk*, previamente identificados na interação *Musa* spp. x *M. fijiensis* por Mendoza-Rodríguez et al. (2018) e Timm et al. (2016), foram escolhidos para o presente estudo. Os genes *psI* e *psII* codificam, respectivamente, a subunidade N do centro de reação do Fotossistema I e o Fotossistema II, e estão relacionados ao metabolismo primário. Os Fotossistemas I e II consistem em complexos de proteína-pigmento presentes na membrana dos tilacóides dos cloroplastos de organismos fotossintetizantes (PAKRASI, 1995). É interessante analisar a expressão dos genes *psI* e *psII* pois os cloroplastos estão envolvidos na

síntese de mediadores da resposta imune, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e hormônios (SERRANO et al., 2016).

Ademais, o gene *irl*, codificante da isoflavona redutase (enzima da cadeia de biossíntese da medicarpina), desempenha um papel importante na via fenilpropanoide ou dos flavonoides derivados, uma das vias responsáveis pela produção de compostos secundários vegetais, como as isoflavonas, ligninas e antocianinas. Esses metabólitos apresentam funções variadas, como pigmentação, atração floral e defesa contra patógenos, inibindo o crescimento fúngico. Além disso, o estudo da expressão gênica dos fenilpropanoides é relevante porque esses compostos também estão envolvidos na sinalização local e sistêmica para indução de genes de defesa (PAIVA et al., 1991; DIXON et al., 2002).

Além desse gene, o gene *utp* também atua na defesa contra a Sigatoka-negra. Esse gene codifica a glicose-1-fosfato uridililtransferase, enzima com papel fundamental nos metabolismos de galactose, amido e sacarose, que envolvem a síntese da parede celular vegetal. O estudo da expressão do gene *utp* é também interessante no sentido de que ele contribui para a manutenção da parede celular, uma das barreiras à infecção por patógenos (GUTMANIS et al., 2003). A enzima glicose-1-fosfato uridililtransferase também está envolvida no amadurecimento do fruto da bananeira (PUA et al., 2000).

Por fim, o gene *prk*, codificante da fosforribuloquinase, apresenta diversas funções, tais como atividade quinase e fosfotransferase. A enzima fosforribuloquinase tem função importante na fixação de carbono, pois gera o substrato de carbono C₅ essencial para atividade da Rubisco (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase). A expressão do gene *prk* é tecido-específica, regulada pela luz e de acordo com o desenvolvimento vegetal, sendo reprimida durante a senescência. Observar a expressão desse gene também apresenta relevância visto que ele tem sido relatado na resposta ao estresse em bananeira e a compreensão dessa expressão pode contribuir para o entendimento da fosforilação na defesa vegetal (RAINES et al., 1989; MICHALOWSKI et al., 1992; MARRI et al., 2005).

Vale acrescentar que Ortiz e Vuylsteke (1994) propuseram um modelo genético para a resistência à Sigatoka-negra que consiste na herança de três alelos: *bs₁* (recessivo), *bsr₂* e *bsr₃* (independentes e com efeitos aditivos). Esses pesquisadores perceberam que a resistência em diploides de bananeira é resultado de homozigose nos três locos correspondentes a esses alelos. Eles relataram ainda que, se o loco

referente ao alelo *bsr*₂ ou *bsr*₃ for heterozigoto e o loco do alelo *bs*₁ se mantiver em homozigose recessiva, a cultivar exibe menor suscetibilidade à doença.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo validar genes candidatos de resistência à Sigatoka-negra por meio de análise de expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real, além de detalhar esses genes de interesse e as proteínas por eles codificadas, por meio de ferramentas de bioinformática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

O material genético utilizado no presente trabalho consistiu em 4 cultivares de bananeira provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e que exibem contraste na resposta à Sigatoka-negra (SN), conforme a Tabela 1. O diploide Calcutta-4 e a cultivar Grande Naine são descritas na literatura como resistente (R) e suscetível (S) à doença, respectivamente e, por isso, compuseram o grupo controle do presente estudo, conforme mostra a Figura 3 (DE LANGHE, 1969; SILVA et al., 1999).

Por sua vez, os diploides contrastantes Krasan Saichon e Akondro Mainty, foram escolhidos a partir de fenotipagem prévia em campo (NASCIMENTO, 2019) na qual evidenciaram, respectivamente, resistência e suscetibilidade à doença e foram designados como grupo tratamento do presente trabalho (Figura 3). Além disso, Krasan Saichon e Akondro Mainty foram estudadas aqui pois são ancestrais próximos dos materiais comerciais e possíveis ancestrais do subgrupo de cultivares AAA denominado Cavendish.

As cultivares aqui estudadas foram escolhidas devido à sua grande importância nos cruzamentos realizados no âmbito do PMGB visando a obtenção de cultivares resistentes à Sigatoka-negra.

Tabela 1. Cultivares de bananeira e suas características, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Cultivar	Grupo Genômico	Resposta à Sigatoka-negra	Referência
Calcutta-4	AA	Resistente	De Langhe (1969)
Grande Naine	AAA	Suscetível	Silva et al. (1999)
Krasan Saichon	AA	Resistente	Nascimento (2019)
Akondro Mainty	AA	Suscetível	Nascimento (2019)

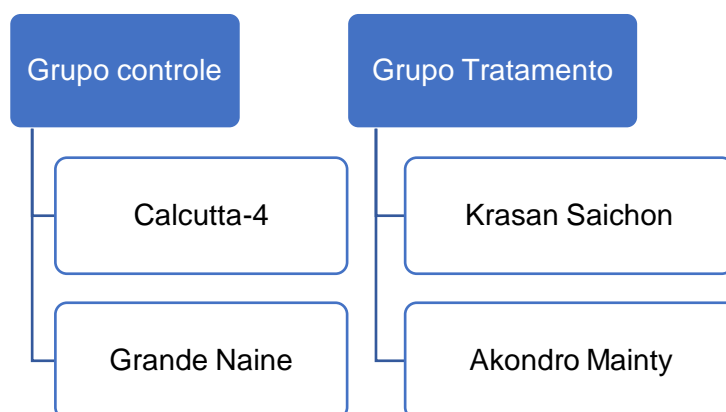


Figura 3. Grupos controle e tratamento compostos pelas cultivares de bananeira estudadas, Embrapa Mandioca e Fruticultura, BA, 2020.

2.2 Bioensaio: Patossistema *Musa spp.* x *Mycosphaerella fijiensis*

O bioensaio foi conduzido em Casa de Vegetação da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas, Bahia, Brasil, com coordenadas geográficas 12°40'19"S e 39°06'22"W', 220 metros acima do nível do mar. A temperatura anual média é de 24,5°C e a precipitação anual média de 1250 mm (AGRITEMPO, 2020). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições.

O isolamento de *M. fijiensis* foi realizado por meio do método indireto (câmara úmida), a partir de folhas infectadas da cultivar Grande Naine, proveniente do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os fragmentos de folha nos estágios de 4 a 6 de desenvolvimento da doença foram lavados em água corrente e detergente neutro, dispostos em recipientes gerbox contendo algodão úmido e armazenados em BOD a 25°C, fotoperíodo de 12 horas, para crescimento do micélio. Em seguida, fragmentos foliares foram transferidos para placas de Petri preenchidas com meio BDA para obtenção de uma cultura pura.

O inóculo utilizado consistiu em 10 mL de suspensão de $9,1 \times 10^6$ de fragmentos de micélio mL⁻¹ de *M. fijiensis*. A inoculação seguiu o método descrito por Leiva-Mora et al. (2010). A suspensão foi pincelada nas folhas 2 e 3 de bananeiras dos grupos controle e tratamento de 6 meses de idade com 60 cm de altura, cultivadas em sacos plásticos de 10 litros com solo supersimples (adubo de gado, areia e casca de pinus). As folhas pinceladas foram envolvidas com saco plástico e algodão umedecidos com água destilada a fim de se criar um ambiente apropriado para o sucesso da infecção fúngica, de acordo com a Figura 4.

Foram utilizadas 15 plantas por cultivar, totalizando 60 plantas (amostras) no experimento, conforme a Figura 5. Cinco intervalos de tempo de coleta foram estabelecidos: 0 (controle - plantas não pinceladas), 3, 9, 15 e 21 dias após a inoculação (DPI). Esses intervalos foram escolhidos em razão dos genes a serem validados responderem precocemente à doença, além de seguir o padrão de coleta em dias dos estudos de expressão gênica em resposta à Sigatoka-negra (PORTAL et al., 2011; TIMM et al., 2016; MENDOZA-RODRÍGUEZ et al., 2018).

A cada intervalo de tempo estabelecido, o terço médio da folha 3 de 3 plantas por cultivar foi coletado com o auxílio de uma tesoura esterilizada com álcool. Em seguida, a amostra foi embalada em papel alumínio e imediatamente congelada com nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenada em ultrafreezer a -80°C.



Figura 4. Bioensaio: Patossistema *Musa* spp. x *M. fijiensis*, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

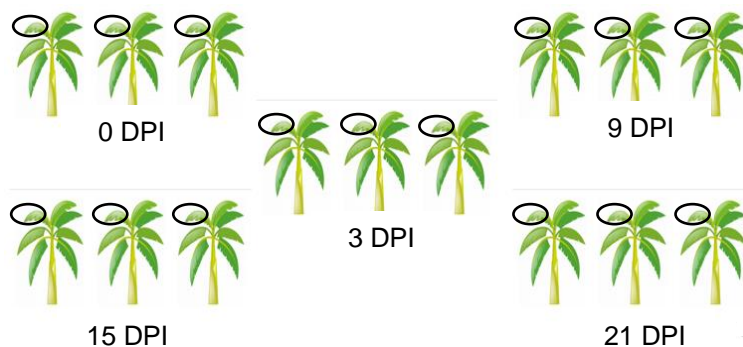


Figura 5. Esquema experimental de inoculação por cultivar considerando os intervalos de coleta: 0, 3, 9, 15 e 21 dias após a inoculação (DPI). Os círculos evidenciam o terço médio foliar coletado em cada planta para análise molecular, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

2.3 Análise Molecular

2.3.1 Extração e tratamento de RNA

O RNA total foliar foi extraído a partir de 100 mg de tecido de cada planta (total de 60 amostras), seguindo o protocolo descrito por Zhao et al. (2012) com modificações. A integridade do RNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio. O RNA foi submetido ao tratamento com DNase utilizando o kit *TURBO DNA-free DNase Treatment* (Ambion), obedecendo o protocolo estabelecido pelo fabricante e armazenado em ultrafreezer (-80°C).

2.3.2 Síntese e viabilidade de cDNA

Após o processo de extração e tratamento, os RNAs mensageiros (mRNA) foram utilizados como molde para obtenção de DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA se deu por meio do kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems), seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro *Nanodrop ND-2000* (Thermo Scientific), diluídas a 100 ng/μL e armazenadas em ultrafreezer.

A verificação da viabilidade de cDNA consistiu em uma PCR convencional utilizando o iniciador 25S, considerado gene de referência para a bananeira, expressando-se em qualquer condição fisiológica da planta (PODEVIN et al., 2012). O mix de PCR, com volume final de 20 μL, consistiu em 3 μL de tampão 5x, 1,6 μL de cloreto de magnésio 25 mM, 1,2 μL de dNTP 2,5 mM, 3 μL de iniciadores (*forward* e

reverse primers) a 3 μ M, 0,2 μ L de Taq DNA Polimerase (Promega) e 5 μ L de cDNA. Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio.

2.3.3 Desenho de iniciadores

Os locos gênicos fornecidos por Mendoza-Rodríguez et al. (2018) e Timm et al. (2016) foram submetidos ao banco de dados *The Banana Genome Hub* (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/advanced>) (DROC et al., 2013). Assim, foi possível obter a sequência completa dos genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra. Essas sequências foram utilizadas para o desenho dos iniciadores (*primers*) no programa *Primer Express* (Applied Biosystems). Os parâmetros requeridos à PCR quantitativa em tempo real foram obedecidos, tais como *amplicons* entre 80 e 120 pb, iniciadores entre 20 e 30 nucleotídeos, temperatura de anelamento entre 58 e 60°C e cerca de 50% de conteúdo GC (MORGANTE; BLAWID, 2016).

2.3.4 Validação de genes de referência

A fim de validar genes de referência para os trabalhos de expressão gênica em genótipos de bananeira provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram testados os genes referentes ao 25S, actina 1, tubulina e ao fator de alongação 1 (EF1). Os iniciadores (Tabela 2) utilizados para os referidos genes foram descritos por Podevin et al. (2012), exceto o da actina 1, desenhado no presente trabalho. Para isso, realizou-se uma PCR convencional e, em seguida, uma qPCR para testar a eficiência de amplificação dos iniciadores.

Tabela 2. Iniciadores correspondentes aos genes de referência descritos por Podevin et al. (2012), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Gene*	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>tubulina</i>	TGTTGCATCCTGGTACTGCT	GGCTTTCTTGCACTGGTACAC	112
25S	ACATTGTCAGGTGGGGAGTT	CCTTTTGTCCACACGAGATT	106
<i>ef1</i>	CGGAGCGTGAAAGAGGAAT	ACCAGCTTCAAACCACAG	185

* *ef1*: Fator de alongação 1.

O mix da PCR convencional, com volume final de 20 μL , consistiu em 2 μL de tampão 10x, 1,6 μL de cloreto de magnésio 25 mM, 1,2 μL de dNTP 2,5 mM, 2 μL de iniciadores a 10 μM , 1 μL de Taq DNA Polimerase (Cellco) e 5 μL de cDNA. Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio.

Os testes de eficiência dos iniciadores foram realizados por meio de curva padrão e R^2 resultante no equipamento *ABI 7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), em um volume final de 10 μL . O mix foi composto por: 1 μL de cDNA em diluição seriada (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 ng/ μL), 1 par de iniciadores (0,3 μL de *primers forward* e *reverse* a 10 μM), 5 μL de *Sybr Green PCR mix* (Ludwig Biotech) e 3,5 μL de água livre de nuclease.

2.3.5 Análise da expressão gênica

A análise da expressão dos genes *psl*, *psII*, *irl*, *utp* e *prk* envolvidos na resposta à Sigatoka-negra em bananeira foi realizada pela técnica de PCR quantitativa em tempo real no equipamento *ABI 7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Para isso, o cDNA sintetizado foi diluído a 100 ng/ μL e utilizado na reação com o *Sybr Green PCR mix* (Ludwig Biotech), nas seguintes proporções: 3,5 μL de *Sybr Green mix*, 1 μL de cDNA e iniciadores na concentração final de 3 μM (*Psl* e *PsII*) e 2,5 μM , em 10 μL de volume final.

Foram utilizadas triplicatas técnicas de cada amostra foliar para cada um dos genes analisados e triplicatas biológicas para cada cultivar de bananeira. A RT-qPCR ocorreu nas seguintes condições: 50°C (20 s), 95°C (10 min), seguidos de 40 ciclos de: desnaturação a 95°C (15 s), anelamento e extensão a 57°C (iniciador *Irl*) e 59 °C (iniciadores *Psl*, *PsII*, 25S e ACT1) (60 s). A curva de dissociação (ou *melting*) foi gerada a partir da desnaturação do produto amplificado no fim da reação para detectar a presença de possíveis contaminantes ou formação de dímeros de iniciadores (95°C - 15 s, 60°C - 60 s e 95°C - 15 s), com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão.

Os dados foram avaliados por meio do método de quantificação relativa do ciclo ótimo de quantificação (C_q) comparativo ($\Delta\Delta C_q$). Os C_q s foram calculados por meio do algoritmo *Real Time PCR Miner* (ZHAO; FERNALD, 2005). A razão entre os níveis de mRNA entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) foi calculada

estatisticamente por meio do programa *REST* 2009 versão 2.0.13 (PFAFFL et al., 2002), que se baseia no Teste de randomização de alocação fixa em pares (*Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*), descrito por Livak e Schmittgen (2001). Esse teste considera intervalo de significância $p < 0,05$. Para a normalização dos dados foram utilizados o gene da actina 1, desenhado no presente trabalho (Tabela 2) e o gene 25S (Tabela 2), conforme Podevin et al. (2012).

2.4 Análise de Bioinformática

2.4.1 Análise gênica

Além do estudo da expressão gênica, foi realizada análise por ferramentas de bioinformática com o objetivo de fornecer mais informações acerca dos genes validados e proteínas por eles codificadas, enriquecendo a compreensão sobre eles dentro do patossistema. Os locos gênicos fornecidos por Mendoza-Rodríguez et al. (2018) e Timm et al. (2016) foram submetidos ao banco de dados *The Banana Genome Hub* (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/advanced>) (DROC et al., 2013). Assim, foi possível obter a sequência completa dos genes.

Em seguida, a sequência CDS (codificante) dos genes, assim como os transcritos e as sequências de aminoácidos, foram colhidos por meio da Plataforma *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) (GOODSTEIN et al., 2012). A Região Aberta de Leitura (*ORF*) 1 foi identificada com o auxílio do programa *ORFFinder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) no banco de dados *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (WHEELER et al., 2003). Por fim, a região promotora (1,5 kb) de cada um dos genes foi submetida a uma varredura no banco de dados *PlantCARE* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (LESCOT et al., 2002) a fim de identificar elementos reguladores de ação *cis* e suas funções.

2.4.2 Análise proteica

A análise proteica se deu basicamente pela verificação de modificações pós-traducionais. Resíduos fosforilados dos aminoácidos Tirosina (Tyr), Treonina (Thre) e Serina (Ser) foram detectados por meio do servidor *NetPhos* 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (BLOM et al., 1999) nas cinco proteínas

codificadas pelos genes envolvidos na resposta à Sigatoka-negra. Os sítios de glicosilação tipo N foram verificados utilizando o servidor *NetNGlyc* 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (BLOM et al., 2004).

Por meio do domínio proteico conservado foi realizada uma busca no banco de dados *Pfam* 32.0 (<https://pfam.xfam.org/>) (EL-GEBALI et al., 2019) pelas famílias as quais pertencem as proteínas analisadas. Com o auxílio da ferramenta *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) do portal *ExPasy* (<https://web.expasy.org/>) (ARTIMO et al., 2012), informações físicas e químicas das proteínas foram coletadas, a saber, peso molecular, ponto isoelétrico, índice de estabilidade, índice alifático e média de hidropaticidade. A localização subcelular das proteínas foi verificada pelo preditor *DeepLoc*-1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>) (ALMAGRO ARMENTEROS, 2017) e a presença de peptídeo sinal pelo servidor *SignalP*-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (ALMAGRO ARMENTEROS, 2019). Finalmente, os *motifs* proteicos conservados foram detectados por meio da ferramenta *MEME Suite* 5.1.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) (BAILEY et al. 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise Molecular

As amostras de RNA total foliar não apresentam traços de degradação, visto que foi possível visualizar, em gel de agarose, as bandas correspondentes ao RNA ribossomal (28S e 18S) (Figura 6). Após a extração, as amostras de RNA total passaram por tratamento com DNase (Figura 7) para eliminação de DNA.

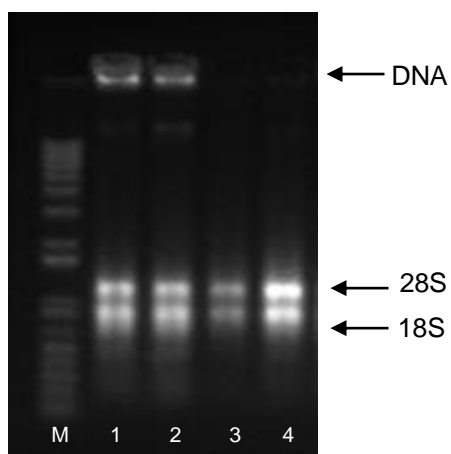


Figura 6. Amostras de RNA total de folhas de bananeira 21 dias após a inoculação, visualizadas por separação eletroforética em gel de agarose 1%, evidenciando as bandas correspondentes ao rRNA 28S (superior) e 18S (inferior). Poço M: Marcador 1 kb. Poços 1 e 2: Calcutta-4/Planta1/Replicata 1. Poços 3 e 4: Calcutta-4/Planta1/Replicata 2. Seta – DNA no gel de agarose. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

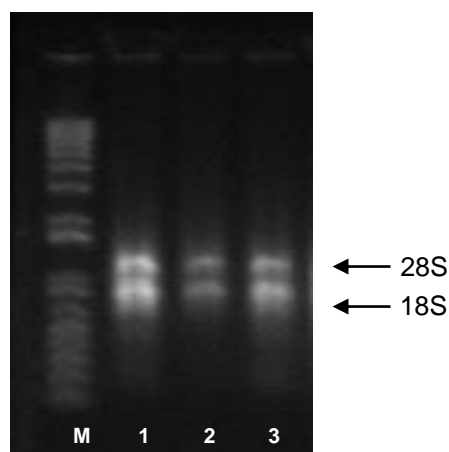


Figura 7. Amostras de RNA total de folhas de bananeira 21 dias após a inoculação após tratamento com DNase, visualizadas por separação eletroforética em gel de agarose 1%. As bandas correspondentes ao rRNA 28S (superior) e 18S (inferior) são evidenciadas pelas setas. Poço M: Marcador 1 kb. Poço 1: Calcutta-4/Planta 1. Poço 2: Calcutta-4/Planta 2. Poço 3: Calcutta-4/Planta 3, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Obteve-se êxito na síntese de cDNA e sua viabilidade para utilização como molde na RT-qPCR foi verificada por meio de PCR convencional, como mostra a Figura 8. O iniciador utilizado na reação foi o 25S, que é referência para os estudos moleculares em bananeira (PODEVIN et al., 2012). Segundo Morgante e Blawid (2016), uma boa viabilidade e qualidade da molécula alvo são essenciais para que a qPCR seja bem-sucedida.

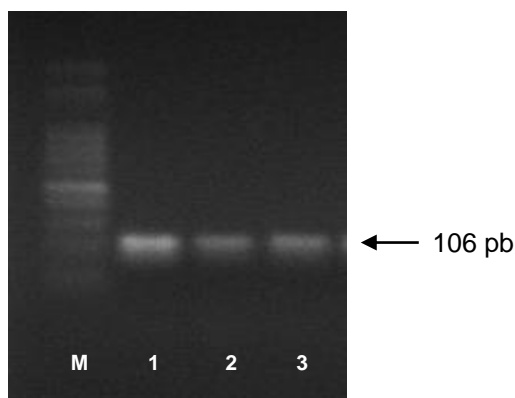


Figura 8. Produtos de PCR para verificação da viabilidade de cDNA 21 dias após a inoculação, visualizados por separação eletroforética em gel de agarose 2%. As bandas correspondentes ao *amplicon* gerado pelo *primer* 25S (106 pb) são evidenciadas pela seta. Poço M: Marcador 50 pb. Poço 1: Calcutta-4/Planta 1. Poço 2: Calcutta-4/Planta 2. Poço 3: Calcutta-4/Planta 3, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

A Figura 9 demonstra a PCR convencional realizada com amostras controle (tempo 0 DPI) aleatórias das cultivares Calcutta-4, Krasan Saichon, Grande Naine e Akondro Mainty utilizando os iniciadores referentes à tubulina e ao EF1, obedecendo às suas respectivas temperaturas de anelamento, 61 e 62°C. Os genes correspondentes ao 25S, tubulina e fator de alongação 1 (EF1) foram relatados por Podevin et al. (2012) como referência para os estudos de expressão gênica relativa em bananeira, bem como Portal et al. (2011) relataram o gene da actina 1.

Nota-se pela Figura 9 que, para os dois iniciadores, houve formação de bandas inespecíficas, visto que os fragmentos obtidos a partir da tubulina e do EF1 são de 112 e 185 pb, respectivamente. Isso sugere a inviabilidade de uso desses iniciadores para os estudos em genótipos do BAG de Banana supracitado. Dessa forma, tais iniciadores não foram submetidos à qPCR para teste de eficiência.

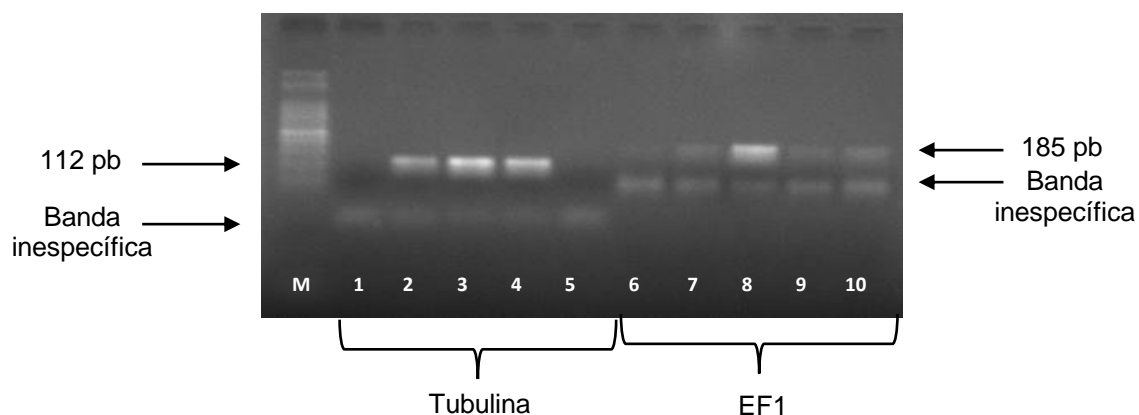


Figura 9. Produtos de PCR utilizando os iniciadores tubulina e EF1, visualizados por separação eletroforética em gel de agarose 2%. As setas evidenciam as bandas inespecíficas. Poço M: Marcador 50 pb. Poços 1 e 6: Calcutta-4/Planta 1. Poços 2 e 7: Grande Naine/Planta 2. Poços 3 e 8: Krasan Saichon/Planta 1. Poços 4 e 9: Akondro Mainty/Planta 2. Poços 5 e 10: Controle negativo (NTC), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Os iniciadores correspondentes ao 25S e actina 1 (ACT 1) foram testados em PCR convencional, nas temperaturas de anelamento de 59 e 60°C, respectivamente, conforme a Figura 10. Foram escolhidas aleatoriamente amostras referentes ao tempo 3 DPI das cultivares Calcutta-4 e Krasan Saichon. Foi possível obter os *amplicons* esperados para cada iniciador, 106 pb para o 25S e 80 pb para o ACT1. Logo, esses iniciadores tiveram sua eficiência testada em qPCR. A Figura 11 mostra a curva padrão para o iniciador 25S e a Figura 12 a curva padrão para o iniciador ACT1.

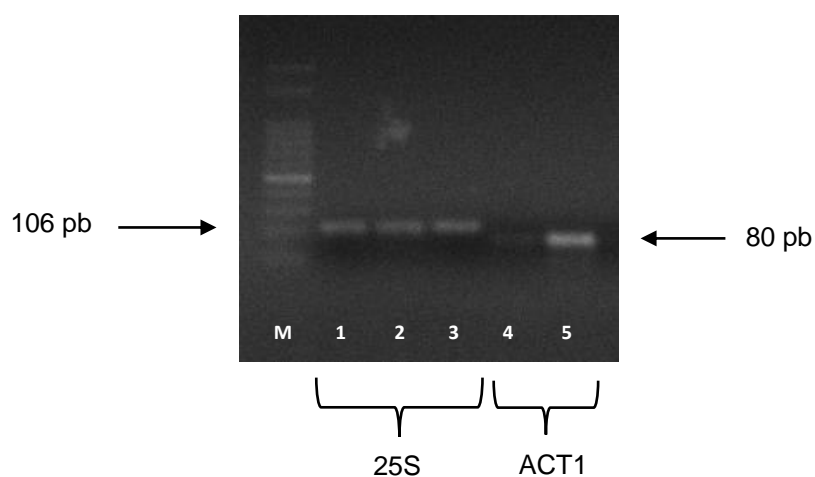


Figura 10. Produtos de PCR utilizando os iniciadores 25S e ACT1, visualizados por separação eletroforética em gel de agarose 2%. Os parênteses evidenciam as bandas correspondentes aos *amplicons* dos iniciadores. Poço M: Marcador 50 pb. Poço 1: Calcutta-4/Planta 3. Poço 2: Krasan Saichon/Planta 1. Poço 3: Controle negativo (NTC). Poços 4 e 5: Krasan Saichon/Planta 1. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

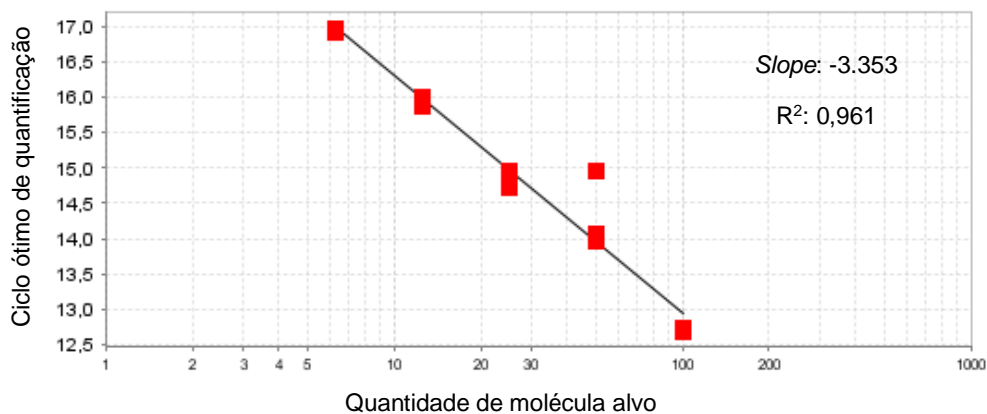


Figura 11. Curva padrão para o iniciador 25S gerada pelo programa 7500 (Applied Biosystems). As amostras padrão foram diluídas em um fator 1:5. Eficiência: 98,707%, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

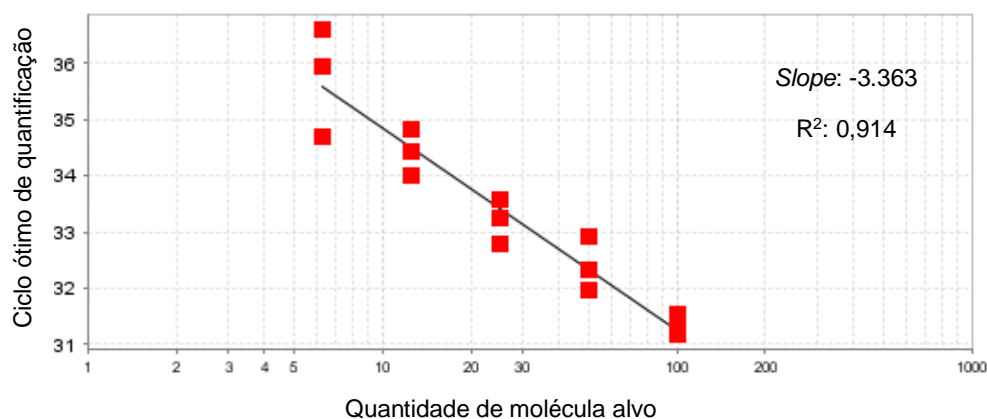


Figura 12. Curva padrão para o iniciador ACT1 gerada pelo programa 7500 (Applied Biosystems). As amostras padrão foram diluídas em um fator 1:5. Eficiência: 89,128%, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

A eficiência de amplificação indica o quanto uma reação é exponencial, isto é, o quanto o molde é duplicado a cada ciclo. Construir uma curva padrão utilizando amostras diluídas em série é um dos métodos para verificação da eficiência de reação, que é aceitável variando entre 80 e 110%. O *slope* ou coeficiente angular da reta em torno de -3,322, garante uma alta eficiência da qPCR. O coeficiente de determinação da regressão linear (R^2) se refere à sobreposição das amostras padrão na reta, ficando em torno de 0,985 em uma reação tida como eficiente (MORGANTE; BLAWID, 2016).

Diante disso, nota-se que há uma eficiência aceitável de reação de qPCR utilizando os iniciadores 25S e ACT1, habilitando-os como referência para os estudos

de expressão gênica em genótipos do Banco de Germoplasma de Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura, o que corrobora os dados apresentados por Podevin et al. (2012) e Portal et al. (2011). Identificar e selecionar os genes de referência é uma etapa fundamental nos estudos com qPCR em plantas não-modelo como a bananeira. Recomenda-se de dois a três genes de referência em tais trabalhos para garantir uma confiabilidade maior da análise de expressão gênica (MORGANTE; BLAWID, 2016).

Os iniciadores desenvolvidos para a amplificação dos genes estão dispostos na Tabela 3. De acordo com a Figura 13, os iniciadores correspondentes aos genes *psI*, *psII*, *irl* e *act1* mostraram-se específicos à região alvo, conforme evidencia a curva de dissociação, que apresenta apenas um pico bem definido, não havendo a formação de dímeros de iniciadores e nem presença de contaminantes.

Em contrapartida, os iniciadores do gene *utp* (Figura 14), mostraram-se ineficientes na amplificação do molde de cDNA em decorrência da formação de um pico isolado que não corresponde ao seu *amplicon* e falhas na amplificação das amostras como um todo. Além disso, observa-se que, para os iniciadores do gene *prk* (Figura 14), houve formação de diversos picos de temperatura indicando amplificação de vários fragmentos de molécula alvo. Segundo Morgante e Blawid (2016), uma curva de dissociação anormal denuncia problemas na qPCR, como qualidade de molécula alvo, erros de pipetagem e formação de dímeros de iniciadores, interferindo diretamente em sua eficiência. Diante disso, os genes *utp* e *prk* não foram utilizados nas análises de expressão gênica.

Tabela 3. Desenho de iniciadores, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Gene*	Loco gênico	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>psI</i>	GSMUA_Achr6G25780_001	TGCAGGAGCTCAATGACAAGA	TGTGCCGAACTCCACTGTGT	80
<i>psII</i>	GSMUA_Achr9G30450_001	CTTCTTGCTTGCAGCCCAAT	CTTCCACCCTTACCTCCAACAT	80
<i>irl</i>	GSMUA_Achr2G14320_001	CCTCCACGCCGAAAGATG	GCAGGTCAATCCCTCTCAAC	102
<i>utp</i>	GSMUA_Achr9G23930_001	GATCGCCAAGCTCCAATCC	CAGCTCAGTTCCACGGACAA	93
<i>prk</i>	GSMUA_Achr5G03660_001	CTTACGGCCCGGACACCTA	AAGCAGCTGGCGATGGTAAC	80
<i>act1</i>	GSMUA_Achr6G25350_001	TCTCAATCCCAAGGCAAACC	TTGCTACATACATAGCCGGAACA	80

* *psI*: Subunidade N do centro de reação do Fotossistema I; *psII*: Fotossistema II; *irl*: Isoflavona redutase; *utp*: Glicose-1-fosfato uridililtransferase; *prk*: Fosforribuloquinase; *act1*: Actina 1;

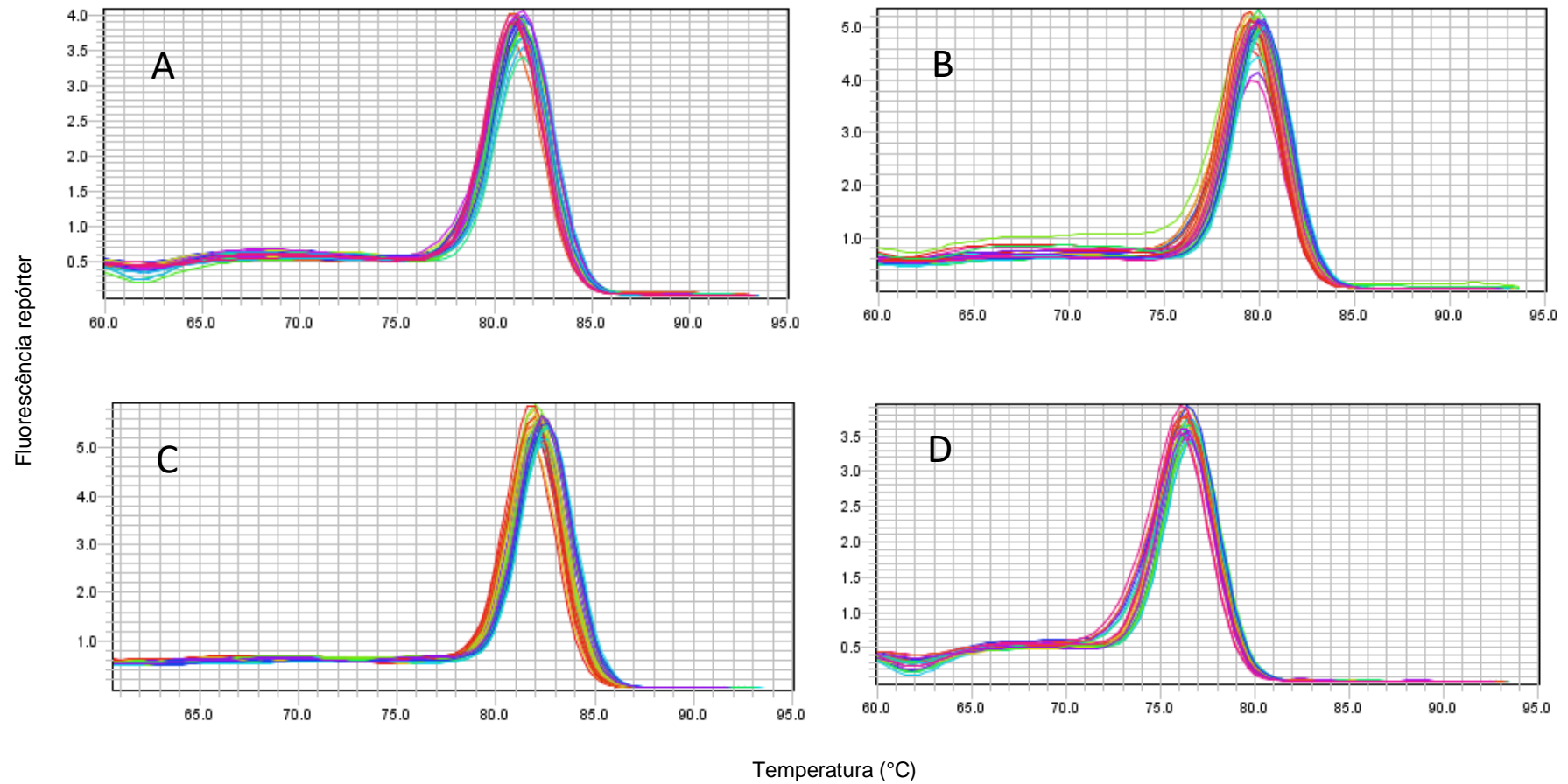


Figura 13. Curvas de dissociação (*melting*) obtidas a partir da amplificação dos genes mostrando um pico bem definido, que confirma amplificação específica da molécula alvo. (A) gene *psI*, (B) gene *psII*, (C) gene *irl*, (D) gene *act1*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

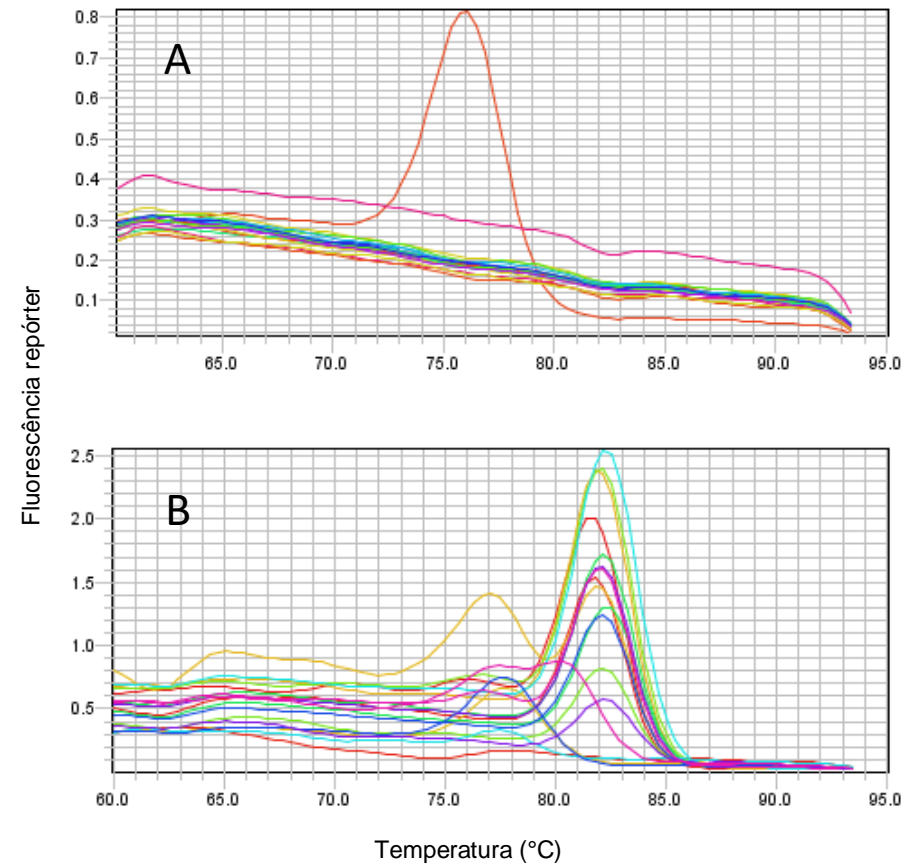


Figura 14. Curvas de dissociação (*melting*) obtidas a partir da amplificação dos genes mostrando picos diversos, que confirmam amplificação inespecífica da molécula alvo. (A) gene *utp*, (B) gene *prk*, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

No presente estudo foi quantificada a expressão de três genes: *psI* (subunidade N do centro de reação do fotossistema I), *psII* (fotossistema II) e *irl* (isoflavona redutase). A Figura 15 mostra o gráfico da razão entre os níveis de mRNA dos referidos genes entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Calcutta-4, utilizada como controle resistente à Sigatoka-negra neste trabalho. O gene *psII* apresentou superexpressão (regulação positiva) aos 3 DPI, com significância estatística e denotou valores de expressão inferiores nos intervalos de coleta subsequentes. Por sua vez, o gene *psI* mostrou baixos níveis de expressão em 3, 9, 15 e 21 DPI, sem significância estatística.

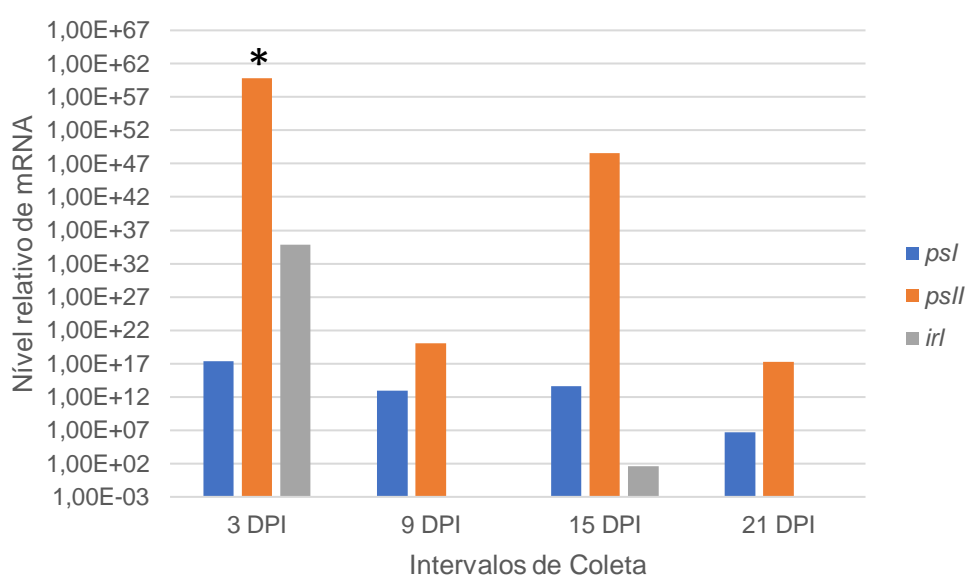


Figura 15. Razão entre os níveis de mRNA dos genes *psI*, *psII* e *irl* entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Calcutta-4 (resistente à Sigatoka-negra) em escala logarítmica para cada intervalo de coleta em dias após a inoculação (DPI). Os dados foram normalizados pelos genes da actina 1 e 25S. (*) Valores de expressão com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de randomização de alocação fixa em pares no programa *REST* 2009 (PFAFFL et al., 2002), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Esse quadro difere do apresentado por Mendoza-Rodríguez et al. (2018). Esses pesquisadores perceberam uma regulação negativa do gene *psII*, enquanto para o gene *psI* detectaram uma regulação positiva em Calcutta-4 durante interação incompatível (resistência) com *M. fijiensis*. Apesar disso, os dois genes exercem um papel fundamental no mesmo processo biológico, a fotossíntese. Dessa forma, ainda que haja discrepância entre os dados aqui discutidos e os da literatura, a estratégia de defesa vegetal, nos dois casos, é similar.

Vale acrescentar que a defesa basal em plantas é iniciada com a percepção dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como a flagelina, pelos receptores de reconhecimento patogênico (PRR), como as quinases ricas em leucina. A essa resposta vegetal dá-se o nome de imunidade acionada por PAMPs (PTI). Diante disso, o patógeno produz efetores, que consistem em proteínas de avirulência (Avr) capazes de evadir ao reconhecimento pelos PRR, provocando a denominada suscetibilidade acionada por efector (ETS) no hospedeiro. Por meio de processo evolutivo, as plantas têm produzido proteínas de resistência (R), que conseguem reconhecer, direta ou indiretamente, as proteínas de avirulência. Assim, uma resposta de defesa mais forte é induzida em resposta à ETS, denominada imunidade acionada por efector (ETI), que está associada à resposta hipersensitiva (HR). Esses eventos compõem o modelo *zig-zag* proposto por Jones e Dangl (2006) para elucidar a resposta de defesa vegetal precoce e o contra-ataque patogênico.

Ademais, a resistência observada em Calcutta-4 se dá por meio da HR, caracterizada por apoptose das células vegetais no sítio de infecção devido à liberação de toxinas. Essas destroem o fungo e impossibilitam sua colonização sistêmica e, por conseguinte, o desenvolvimento da doença, conforme observado por Churchil (2011), Arango Isaza et al. (2016) e Timm et al. (2016).

Além disso, o cloroplasto é uma das organelas que desempenham funções importantes na geração de mecanismos de defesa contra fitopatógenos, como a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) e hormônios (CAPLAN et al., 2015). A energia requerida para que a planta se defenda provém da atividade fotossintética, porém essa capacidade é comprometida, visto que a infecção por *M. fijiensis* causa necrose no tecido foliar (HIDALGO et al., 2006).

Diante disso, uma característica fundamental para uma cultivar resistente à Sigatoka-negra, além de apresentar HR, seria suplantando essa queda na capacidade fotossintética pela superexpressão de genes relacionados à maquinaria da fotossíntese, como é o caso do gene *psII*, que contribui para dissipação da energia luminosa em excesso no estágio de reconhecimento de PAMPs (GÖHRE et al., 2012). A regulação positiva que ocorreu precocemente em Calcutta-4 pode corroborar seu caráter resistente à doença.

Por outro lado, o gene *irl* não evidenciou significância estatística nos dois intervalos em que foi detectada sua expressão, 3 e 15 DPI. Mendoza-Rodríguez et al. (2018) reportaram uma leve indução da expressão desse gene no início da infecção,

seguida de uma repressão após o intervalo de 9 DPI, corroborando os dados do presente trabalho.

A expressão gênica relativa dada pela razão entre os níveis de mRNA entre plantas tratamento e controle da cultivar Krasan Saichon (resistente à Sigatoka-negra) é mostrada na Figura 16. Aos 3 DPI, quase não houve expressão dos genes analisados. O gene *psI* sofreu indução aos 15 DPI, seguida de repressão aos 21 DPI. A expressão do gene *psII* sofreu leve indução aos 9 DPI, mantendo-se estável até aos 21 DPI. Para esses dois genes não houve expressão estatisticamente significativa. Apesar disso, a expressão desses genes pode indicar que Krasan Saichon responde de maneira mais tardia à doença, quando comparada com Calcutta-4, a cultivar controle resistente. Mesmo assim, o número de lesões necróticas não aumentaria a ponto de indicar suscetibilidade da cultivar, uma vez que o fungo leva de 3 a 4 semanas para atingir a fase necrotrófica (CHURCHILL, 2011).

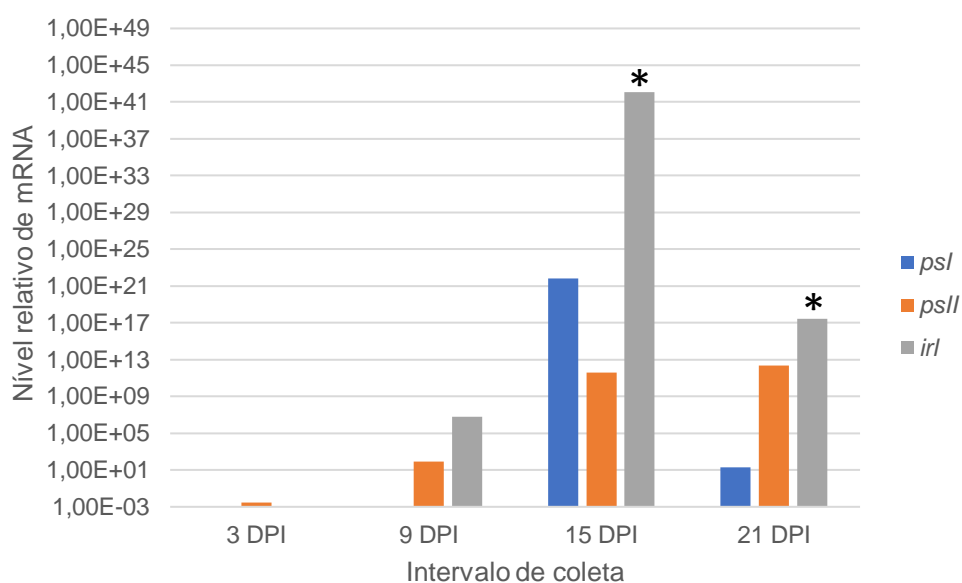


Figura 16. Razão entre os níveis de mRNA dos genes *psI*, *psII* e *irI* entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Krasan Saichon (resistente à Sigatoka-negra) em escala logarítmica para cada intervalo de coleta em dias após a inoculação (DPI). Os dados foram normalizados pelos genes da actina 1 e 25S. (*) Valores de expressão com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de randomização de alocação fixa em pares no programa *REST* 2009 (PFAFFL et al., 2002), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

O gene *irI* apresentou regulação positiva e expressão estatisticamente significativa aos 15 e 21 DPI (Figura 16) Esse gene exerce um papel importante na biossíntese de isoflavonoides (via fenilpropanoide). Essa via é responsável pela produção de

compostos fenólicos que atuam na lignificação, fortificação da parede celular e síntese de fitoalexinas na defesa vegetal contra *M. fijiensis* (HIDALGO et al., 2016).

As fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixo peso molecular sintetizados pelas plantas durante estresse abiótico e biótico, que desempenham papel importante na defesa contra patógenos. A pisatina e a faseolina são exemplos de fitoalexinas. A primeira é produzida em *Pisum sativum* (ervilha) e a última em *Phaseolus vulgaris* (feijão); em ambos os casos elas se acumulam no sítio de infecção em concentrações fungitóxicas, o que suporta ainda mais a ação desses metabólitos secundários na defesa vegetal (CRUICKSHANK; PERRIN, 1968; MERT-TÜRK, 2002; AHUJA et al., 2012).

Mendoza-Rodríguez et al. (2018) detectaram regulação positiva do gene *irl* na interação incompatível Calcutta-4 x *M. fijiensis* e regulação negativa na interação compatível (suscetibilidade) Grande Naine x *M. fijiensis*. Nesse último caso, a regulação negativa coincidiu com o aparecimento dos sintomas iniciais da doença. Krasan Saichon é uma cultivar oriunda do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa e foi caracterizada como resistente à Sigatoka-negra em estudo prévio de fenotipagem no recôncavo baiano (NASCIMENTO, 2019). A literatura ainda não aborda a expressão gênica em resposta à doença nessa cultivar, porém a expressão significativa do gene *irl* contribui com o entendimento da relevância fundamental da via fenilpropanoide na defesa de *Musa* spp., como relatado por Portal et al. (2011), e dá mais suporte ao caráter resistente dessa cultivar observado em campo. Todavia, são necessários mais estudos para elucidar o mecanismo molecular de resposta à Sigatoka-negra exibido por Krasan Saichon.

A Figura 17 demonstra a razão entre os níveis de mRNA entre plantas tratamento e controle da cultivar Grande Naine (suscetível à Sigatoka-negra). Houve regulação negativa, estatisticamente significativa, dos três genes aos 3 DPI. O gene *psII* foi o único que se expressou nos intervalos seguintes. Aos 9 e 15 DPI a expressão dele foi baixa, sem significância estatística, porém, aos 21 DPI, houve regulação positiva do gene, com significância estatística.

Mendoza-Rodríguez et al. (2018) relataram repressão completa dos genes *psI* e *psII* em Grande Naine infectada por *M. fijiensis*. Como a suscetibilidade de Grande Naine à Sigatoka-negra já é bastante discutida e confirmada na literatura, essa cultivar foi utilizada como controle suscetível no presente estudo. A regulação positiva tardia do gene *psII* pode caracterizar o modo como a planta responde à invasão do patógeno

e contribuir para seu caráter suscetível, visto que esse gene auxilia na dissipação da energia luminosa em excesso no estágio de reconhecimento de PAMPs (GÖHRE et al., 2012). Essa regulação tardia contrasta diretamente com a regulação positiva precoce do gene *psII* em Calcutta-4, verificada neste trabalho e que contribui para a resistência à doença. Então, pode-se inferir que a expressão precoce do gene *psII* está relacionada à resistência à Sigatoka-negra.

Ainda vale acrescentar que estudos têm identificado a presença de fitoanticipinas em Grande Naine desafiada por *M. fijiensis*. Esses compostos antimicrobianos de baixo peso molecular estão presentes no tecido vegetal de forma basal, além de serem produzidos em maiores quantidades a partir de moléculas pré-existentes mediante infecção por patógenos. Apesar da presença desses metabólitos secundários, no processo de coevolução do patossistema *M. fijiensis* x Grande Naine, o patógeno tem exibido maior sucesso provavelmente devido à sua capacidade em evadir às defesas do hospedeiro por meio das proteínas de avirulência. Compreender a ação das fitoanticipinas na defesa vegetal pode contribuir na indução de mecanismos de resistência em cultivares suscetíveis de bananeira (CRUZ-CRUZ et al., 2010; CHURCHIL, 2011).

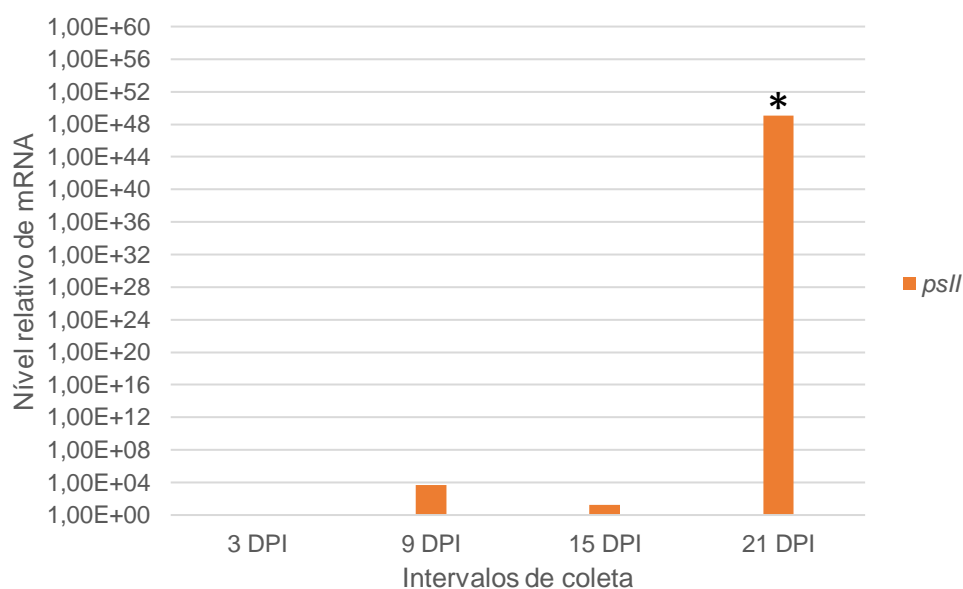


Figura 17. Razão entre os níveis de mRNA do gene *psII* entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Grande Naine (suscetível à Sigatoka-negra) em escala logarítmica para cada intervalo de coleta em dias após a inoculação (DPI). Os dados foram normalizados pelos genes da actina 1 e 25S. (*) Valores de expressão com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de randomização de alocação fixa em pares no programa *REST* 2009 (PFAFFL et al., 2002), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

A razão entre os níveis de mRNA entre plantas tratamento e controle da cultivar Akondro Mainty (suscetível à Sigatoka-negra) é mostrada na Figura 18. O gene *psI* expressou-se aos 3 e 15 DPI, onde alcançou seu pico. O gene *psII* foi expresso tardiamente e em baixos níveis aos 15 e 21 DPI. Por sua vez, o gene *irl* expressou-se em todos os intervalos de coleta, mantendo-se estável aos 15 e 21 DPI. Nenhum dos genes denotou expressão estatisticamente significativa. Apesar disso, a expressão tardia dos genes *irl* e *psII*, e irregular do gene *psI* podem indicar o caráter suscetível da cultivar observado em estudo prévio de fenotipagem em campo (NASCIMENTO, 2019). Assim como Krasan Saichon, Akondro Mainty provém do Banco de Germoplasma da Embrapa e ainda não há estudos com foco na expressão gênica em resposta à Sigatoka-negra para esses diploides.

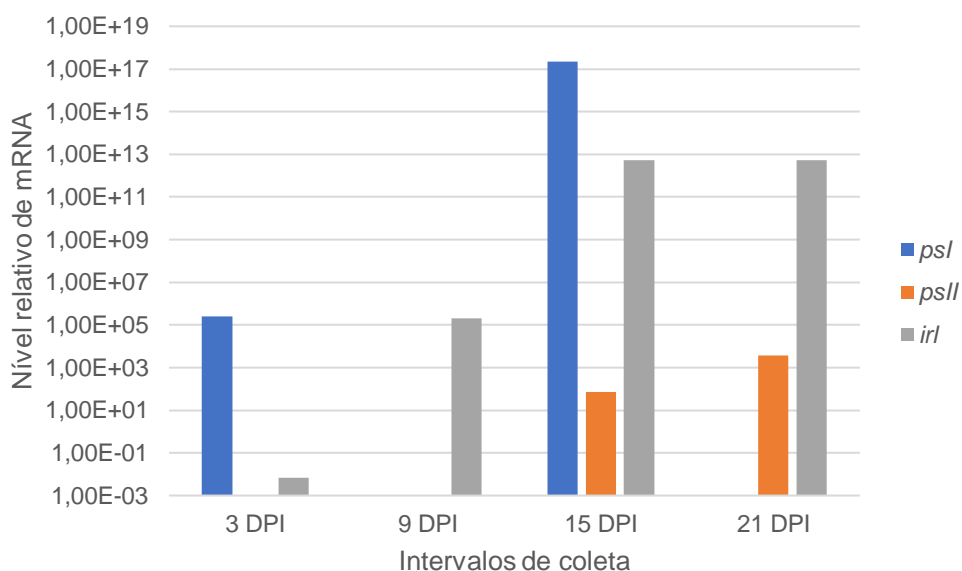


Figura 18. Razão entre os níveis de mRNA dos genes *psI*, *psII* e *irl* entre plantas tratamento (3, 9, 15 e 21 DPI) e controle (0 DPI) da cultivar Akondro Mainty (suscetível à Sigatoka-negra) em escala logarítmica para cada intervalo de coleta em dias após a inoculação (DPI). Os dados foram normalizados pelos genes da actina 1 e 25S. (*) Valores de expressão com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de randomização de alocação fixa em pares no programa REST 2009 (PFAFFL et al., 2002), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

3.2 Análise de Bioinformática

A fim de analisar, em detalhes, os genes candidatos envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra, foi realizada análise de biologia computacional. Utilizando ferramentas de bioinformática, as sequências intrônicas e exônicas e as regiões aberta de leitura e promotora dos genes foram aqui analisadas, bem como as modificações pós-traducionais e os *motifs* das proteínas por eles codificadas.

A análise dos cinco genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra evidenciou o número de sequências intrônicas e exônicas de cada um deles, conforme a Tabela 4. Como os genes *psl*, *psll*, *irl* e *prk* apresentam sequências menores, é natural que eles apresentem um número inferior de íntrons e éxons quando comparados ao gene *utp*. Quanto mais íntrons um gene possui, mais demorado será o processamento de mRNA, especificamente o *splicing*. Os íntrons representam grande parte do genoma; são maiores, em pares de bases, quando comparados aos éxons; conservam nucleotídeos importantes e foram mantidos pela seleção natural (SHARP, 1994). As sequências intrônicas também exercem um papel importante durante o *splicing* alternativo, que consiste na geração de transcritos diferentes a partir de um único gene, e na expressão gênica, atuando como reguladores, os denominados microRNAs (miRNAs) (LIN et al., 2006).

Tabela 4. Quantidade de íntrons e éxons nos genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Gene	Número de íntrons	Número de éxons
<i>psl</i>	2	3
<i>psll</i>	4	5
<i>irl</i>	4	5
<i>utp</i>	20	21
<i>prk</i>	5	6

Ademais, a região aberta de leitura (*Open Reading Frame - ORF*) ou quadro de leitura de um gene, corresponde à sequência que começa em um códon de início (ATG) e termina em um dos três códons de parada (TAG, TGA e TAA). Detectar uma

ORF é uma etapa fundamental na busca por genes codificantes de proteínas (SIEBER et al., 2018), pois é o ponto de partida para a leitura do gene. O tamanho da região aberta de leitura dos genes estudados encontra-se na Tabela 5, bem como o número de aminoácidos das proteínas que cada um deles codifica.

Tabela 5. Região aberta de leitura de genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Gene	Posição da ORF1 (pb)	Número de Nucleotídeos	Número de Aminoácidos
<i>psI</i>	169:430	312	103
<i>psII</i>	379:525	147	48
<i>irl</i>	61:435	375	124
<i>utp</i>	7126:7449	324	107
<i>prk</i>	1:885	885	294

Os elementos *cis* são unidades reguladoras da transcrição presentes na região promotora (região 5' UTR não traduzida) de um gene. A combinação única desses elementos em cada gene determina sua expressão espacial e temporal. Muitos processos biológicos e respostas ao estresse biótico e abiótico são controlados pelos elementos *cis* (IBRAHEEM et al., 2010).

Nesse sentido, a análise da região promotora dos genes revelou diversos elementos reguladores de ação *cis* relacionados à regulação hormonal, resposta a estresses e processos metabólicos primários (LESCOT et al., 2002), além dos sinais típicos envolvidos com o início da transcrição, como o TATA-box e CAAT-box, conforme evidencia a Tabela 6. Isso sugere uma regulação complexa da expressão dos genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra.

Ainda vale acrescentar que, a presença de elementos *cis* envolvidos na resposta de defesa a elicitores fúngicos (compostos que estimulam a defesa vegetal), tais como, box S, CCGTCC-box e w box, identificados aqui somente no gene *psII* de metabolismo primário (fotossistema II), sugerem o papel importante desse gene na resposta precoce à infecção por *M. fijiensis*, uma vez que a Sigatoka-negra é caracterizada por uma redução da capacidade fotossintética da planta (RUSHTON; SOMSSICH, 1998).

Finalmente, a Tabela 7 evidencia os elementos *cis* relacionados ao estresse biótico mais frequentes na região promotora dos genes estudados. Os elementos *as-1* (*activation sequence-1*) e *w box* são induzidos pela presença de um patógeno; enquanto o elemento *STRE* (*stress-response element*) responde ao estresse de modo geral. Redman et al. (2002) perceberam que o estresse biótico estimulou diferencialmente a atividade do elemento *as-1* em *Arabidopsis thaliana*. Enquanto Choudhury et al. (2008) detectaram ativação diferencial de elementos *cis* de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos em decorrência de estresse abiótico em bananeira.

Esses estudos reforçam a importância da identificação de elementos *cis* e das funções por eles desempenhadas em diferentes condições ambientais e fisiológicas da planta. No presente trabalho, a varredura de elementos *cis* funcionais pode contribuir para a melhor compreensão da expressão espacial e temporal de genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra (RUSHTON; SOMSSICH, 1998; MARTINEZ-PASTOR et al., 1996).

Tabela 6. Elementos reguladores de ação *cis* dos promotores de genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Elemento <i>cis</i>	Descrição
A-box	Elemento regulador de ação <i>cis</i>
3-AF1 binding site	Elemento responsivo à luz
AAGAA-motif	Elemento regulador de ação <i>cis</i> essencial para indução anaeróbica
ABRE	
ABRE3a	Elementos reguladores de ação <i>cis</i> envolvidos na capacidade de resposta ao ácido abscísico
ABRE4	
ACE	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na capacidade de resposta à luz
AE-box	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na regulação de luz de genes nucleares
ARE	Elemento regulador de ação <i>cis</i> essencial para indução anaeróbica
as-1	Elemento regulador de ação <i>cis</i> induzido por patógeno
AT-TATA-box	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na capacidade de resposta à luz
AT-ABRE	Elemento regulador de ação <i>cis</i> essencial para indução anaeróbica
ATCT-motif	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na capacidade de resposta à luz
AT-rich element	sítio de ligação da proteína ATBP-1
Box 4	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na capacidade de resposta à luz
Box II	Parte de um elemento responsivo à luz
box S	Elemento responsivo a elicitor fúngico
CAAT-box	Elemento regulador de ação <i>cis</i> comum em promotores e acentuadores
CAT-box	Elemento regulador de ação <i>cis</i> relacionado à expressão do meristema (mesófilo)
CCAAT-box	sítio de ligação MYBHv1
CCGTCC motif	Elemento regulador de ação <i>cis</i> essencial para expressão meristema-específica
CCGTCC-box	Elemento responsivo à luz ou elicitor fúngico
CGTCA-motif	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na capacidade de resposta ao metil jasmonato
chs-CMA1a	Parte de um elemento responsivo à luz
circadian	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido no controle circadiano
DRE core	Elemento responsivo à seca e sal
ERE	Elemento responsivo ao etileno
GA-motif	
Gap-box	Partes de um elemento responsivo à luz
GAP-box	

Elemento <i>cis</i>	Descrição
GATA-motif	Elemento regulador de ação <i>cis</i> requerido para expressão tecido-específica e regulada pelo alto nível de luz
G-box	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na capacidade de resposta à luz
GC-motif	Elemento acentuador envolvido na indução anóxica
GCN4 motif	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na expressão de endosperma
GGA-motif	Parte de um elemento responsivo à luz
GT1-motif	Elemento responsivo à luz
HD-Zip 1	Elemento envolvido na diferenciação das células do parênquima paliçádico
I-box	Elemento regulador de ação <i>cis</i> conservado na sequência upstream de genes regulados pela luz
LTR	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na capacidade de resposta à baixa temperatura
MBS	Sítio de ligação do MYB envolvido na indução de seca
MYB	
Myb	
MYB recognition site	Elementos reguladores de ação <i>cis</i> envolvidos na regulação de expressão gênica induzida pela seca
Myb-binding site	
MYB-like sequence	
MYC	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na resposta precoce à indução de ácido abscísico e seca
O2-site	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na regulação do metabolismo de zein
P-box	Elemento responsivo à giberelina
Sp1	Elemento responsivo à luz
STRE	Elemento responsivo a estresse
TATA-box	Centro de elemento promotor
TATC-box	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na capacidade de resposta à giberelina
TCA	
TCA-element	Elementos reguladores de ação <i>cis</i> envolvidos na capacidade de resposta ao ácido salicílico
TC-rich repeats	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na defesa e capacidade de resposta ao estresse
TCT-motif	Parte de um elemento responsivo à luz
TGACG-motif	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na capacidade de resposta ao metil jasmonato
TGA-element	Elemento responsivo a auxina
W box	Elemento responsivo a elicitor fúngico
WRE3	Elemento putativo de resposta a feridas
WUN-motif	Elemento responsivo a feridas

Tabela 7. Quantidade de elementos *cis* responsivos a estresse biótico e suas posições, identificados na região promotora de genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Gene	Elemento <i>cis</i> (posição em relação ao códon de início)		
	as-1	w box	STRE
<i>psl</i>	1 (195+)	1 (1015+)	3 (271-, 1436+, 841-)
<i>psll</i>	2 (544+, 613-)	1 (1243+)	5 (236-, 583-, 499-, 354-, 528+)
<i>irl</i>	5 (349-, 473+, 423+, 463+, 391+)	1 (508-)	-
<i>utp</i>	4 (41+, 1005+, 701+, 1405-)	1 (714-)	-
<i>prk</i>	1 (1033+)	1 (1141-)	3 (1198+, 1432-, 1346-)

A Tabela 8 denota o compilado de modificações pós-traducionais verificadas nas proteínas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra aqui estudadas. A partir da identificação do domínio funcional, foi possível detectar as famílias proteicas às quais pertencem as sequências de aminoácidos.

A primeira dessas famílias foi PSAN ou PSI-N (domínio pfam05479), que abriga diversas proteínas do centro de reação do Fotossistema I, tais como a proteína GSMUA_Achr6T25780_001, que está localizada no lúmen do tilacóide e provavelmente media a interação entre a plastocianina e o centro de reação do Fotossistema I. Estudos mostraram que essa interação é comprometida em mutantes de *Arabidopsis thaliana* em que a proteína codificada pelo gene *psl* está ausente (HALDRUP et al., 1999).

Enquanto a proteína GSMUA_Achr9T30450_001, codificada pelo gene *psII*, pertence à família PsbR (domínio pfam04725). A literatura destaca que esse polipeptídeo está associado ao complexo de evolução do oxigênio do Fotossistema II, além de abordar sua região C-terminal hidrofóbica de 10 kDa como estrutura que possibilita o transporte da proteína através da membrana do tilacóide (WEBBER et al., 1989).

Ademais, a família NmrA (domínio pfam05368) é composta por desidrogenases e redutases de cadeia pequena, que contribuem na modificação pós-traducional do fator de transcrição AreA, envolvido no metabolismo de nitrogênio. A proteína GSMUA_Achr2T14320_001 (isoflavona redutase), produto do gene *irl* faz parte dessa família (STAMMERS et al., 2001).

A proteína GSMUA_Achr9T23930_001, codificada pelo gene *utp*, faz parte da família UDPGP (domínio pfam01704), que abriga as glicose-1-fosfato uridililtransferases. Essa proteína exerce papel importante no metabolismo de carboidratos (via de glicólise/gliconeogênese), pois catalisa a interconversão que gera UDP-glicose (MIO et al., 1998).

Clendennen e May (1997) relataram expressão diferencial de genes codificantes de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos associada à resposta a estresses biótico e abiótico e ao amadurecimento do fruto da bananeira. Keller e Ludlow (1993) detectaram aumento da atividade das enzimas amilase e sacarose fosfato sintetase durante estresse hídrico em folhas de *Cajanus cajan* (guandu), indicando que o metabolismo de carboidratos pode estar envolvido na maior tolerância

a estresse. Também foi detectada atuação de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos durante déficit hídrico em bananeira por Muthusamy et al. (2016).

O metabolismo de carboidratos também é afetado em outras interações planta x patógeno, como em *Triticum* spp. x *Puccinia triticina*, que ocasiona a Ferrugem da folha do trigo (KUMAR et al., 2014). A via de glicólise/gliconeogênese contém enzimas necessárias a outras vias, como a via de metabolismo de xenobióticos por citocromo P450, responsável pelo processamento de compostos fúngicos após a infecção e envolvido na síntese de compostos da via fenilpropanoide (LEHOURS et al., 2011). Esses aspectos são relevantes para o presente trabalho, pois a ativação dessas vias pela presença da proteína GSMUA_Achr9T23930_001 pode gerar uma resposta de defesa mais eficaz à Sigatoka-negra logo após à penetração de *M. fijiensis* através dos estômatos, corroborando os resultados obtidos por Timm et al. (2016).

Tabela 8. Modificações pós-traducionais de proteínas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Gene	Família	Proteína	Sítios de Fosforilação	Glicosilação tipo N
<i>psl</i>	PSAN	GSMUA_Achr6T25780_001	S ₁₆ , S ₁₉ , S ₂₂ , S ₂₃ , S ₃₀ , S ₃₁ , S ₃₆ , S ₃₈ , S ₃₉ , T ₅₉ , S ₁₁₁ , T ₁₂₅ , S ₁₄₈ , S ₁₆₅ , S ₁₇₂	N ₅ , N ₁₃₁
<i>psII</i>	PsbR	GSMUA_Achr9T30450_001	S ₃ , S ₂₂ , S ₂₇ , S ₂₈ , S ₂₉ , S ₃₅ , T ₄₁ , Y ₄₅ , S ₆₀ , Y ₇₀ , Y ₇₆ , Y ₈₃ , S ₉₃ , Y ₉₉ , S ₁₃₁	-
<i>lrl</i>	NmrA	GSMUA_Achr2T14320_001	S ₃ , S ₆ , T ₁₄ , T ₃₉ , S ₅₃ , S ₈₅ , S ₉₃ , T ₁₃₃ , Y ₁₅₁ , S ₁₅₆ , T ₁₇₇ , T ₂₀₂ , Y ₂₁₇ , S ₂₂₁ , S ₂₂₆ , S ₂₃₂ , Y ₂₄₆ , S ₂₇₂ , T ₂₈₀ , Y ₃₀₁ , T ₃₀₂ , T ₃₀₃	N ₃₀
<i>utp</i>	UDPGP	GSMUA_Achr9T23930_001	S ₂₀ , S ₂₉ , S ₃₂ , S ₃₆ , S ₄₅ , T ₄₉ , T ₆₀ , S ₆₂ , T ₇₁ , T ₈₉ , T ₉₄ , S ₉₈ , S ₁₁₈ , T ₁₃₇ , T ₁₄₁ , Y ₁₄₈ , S ₁₅₁ , T ₁₅₇ , S ₁₆₁ , S ₁₇₆ , S ₂₀₀ , S ₂₀₈ , Y ₂₁₃ , T ₂₄₆ , T ₂₄₉ , T ₂₅₇ , S ₂₈₃ , S ₃₅₂ , S ₃₆₁ , Y ₃₇₁ , T ₃₇₂ , T ₃₈₅ , S ₃₉₁ , S ₄₁₀ , S ₄₁₃ , S ₄₁₉ , S ₄₂₃ , S ₄₃₉ , S ₄₄	N ₁₅₉ , N ₃₈₆ , N ₃₈₉ , N ₄₃₇
<i>prk</i>	PRK	GSMUA_Achr5T03660_001	T ₁₃ , S ₂₀ , T ₃₃ , S ₄₈ , S ₄₉ , Y ₅₀ , T ₇₁ , T ₇₂ , S ₇₄ , S ₈₁ , S ₈₂ , S ₁₀₄ , T ₁₀₆ , T ₁₁₁ , T ₁₁₃ , S ₁₂₀ , S ₁₂₅ , T ₁₄₅ , S ₁₅₀ , S ₁₅₂ , T ₁₆₄ , Y ₁₇₇ , Y ₁₉₄ , Y ₂₃₅ , S ₂₃₉ , S ₂₅₈ , S ₂₆₁ , S ₂₆₅ , Y ₂₇₆ , S ₃₁₉ , S ₃₂₈ , T ₃₄₀ , S ₃₄₂ , T ₃₅₄ , Y ₃₅₅ , Y ₃₅₆ , S ₃₅₇ , S ₃₆₁ , Y ₃₇₇ , S ₃₈₆ , T ₃₉₄ , Y ₄₂₅	N ₂₃ , N ₄₀₈

A família PRK (domínio pfam00485) é composta por três tipos de quinases: uridina quinases, pantoteato quinases bacterianas e fosforribuloquinases, como a proteína GSMUA_Achr5T03660_001, codificada pelo gene *prk*. Essa enzima é responsável pela conversão de ribulose 5-fosfato em ribulose 1,5-bifosfato, que é o substrato da enzima fixadora de carbono Rubisco (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase), essencial à fase bioquímica da fotossíntese (HARRISON et al., 1998).

Al-Obaidi et al. (2017) identificaram altos níveis da proteína codificada pelo gene *prk* durante estresse biótico e abiótico, bem como Zang et al. (2010). Em *Nicotiana benthamiana* (tabaco), infectada pelo vírus do mosqueado suave do pimentão (*Pepper mild mottle tobamovirus*), também foi detectada atividade dessa proteína (PINEDA et al., 2010), bem como em *Brassica napus* (canola) desafiada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (LIANG et al., 2008). A identificação da proteína GSMUA_Achr5T03660_001 em resposta à Sigatoka-negra corrobora esses resultados, bem como os de Timm et al. (2016), e pode indicar complementação da capacidade fotossintética comprometida diante do ataque fúngico, garantindo a produtividade da bananeira.

Diversos processos de sinalização celular são influenciados pela fosforilação nos resíduos de tirosina, treonina e serina das proteínas. Todas as proteínas caracterizadas apresentaram sítios de fosforilação. As proteínas GSMUA_Achr6T25780_001 e GSMUA_Achr9T30450_001 possuem 15 sítios (13Ser/2Thre e 9Ser/1Thre/5Tyr, respectivamente). A proteína GSMUA_Achr2T14320_001 tem 22 sítios (10Ser/8Thre/4Tyr). A proteína GSMUA_Achr9T23930_001 tem 39 sítios (23Ser/13Thre/3Tyr). A proteína GSMUA_Achr5T03660_001 apresenta o maior número de sítios, 42 (21Ser/12Thre/9Tyr), o que já era esperado por se tratar de uma fosforribuloquinase.

A fosforilação proteica está envolvida em diversos aspectos do metabolismo vegetal, dentre eles a resposta aos estresses abióticos e bióticos. Um exemplo disso é que, durante a resposta hipersensitiva (HR), ocorre fosforilação proteica, geração de espécies reativas de oxigênio, produção de fitoalexinas, além de outros processos químicos essenciais para conferir uma resposta precoce de defesa a determinada doença (DREHER; CALLIS, 2007; MEHTA et al., 2008).

Das proteínas caracterizadas, apenas GSMUA_Achr9T30450_001 não denotou sítios de glicosilação tipo N, enquanto a glicoproteína GSMUA_Achr9T23930_001 apresentou a maior quantidade de sítios de glicosilação tipo N. A presença e localização de glicanos em glicoproteínas são importantes para o controle da qualidade de dobragem molecular (por meio das chaperonas), que influencia diretamente na função desempenhada por esses polipeptídeos (PETRESCU et al., 2000).

Além disso, a ligação de carboidratos contribui para o reconhecimento das cadeias polipeptídicas pelos receptores celulares, pois se configuram como epítomos adicionais. Os processos de tráfego de proteínas e de defesa de hospedeiro estão entre esses eventos de reconhecimento, denotando o quão importante é a detecção desses sítios de glicosilação em proteínas envolvidas na resposta de defesa a doenças, inclusive a Sigatoka-negra (PETRESCU et al., 2004).

A Tabela 9 apresenta características gerais das moléculas proteicas em estudo. O número de resíduos de aminoácidos (aa) das proteínas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra variou de 132 (GSMUA_Achr9T30450_001) a 467 (GSMUA_Achr9T23930_001). A localização subcelular identificada para as proteínas GSMUA_Achr6T25780_001 e GSMUA_Achr9T30450_001 foi o cloroplasto, como já era esperado por se tratar de moléculas fundamentais na fase fotoquímica da fotossíntese. Enquanto as proteínas GSMUA_Achr2T14320_001 e GSMUA_Achr9T23930_001 foram detectadas no citoplasma, devido ao seu papel nas vias de biossíntese de isoflavonoides e glicólise/gliconeogênese, respectivamente. A localização da proteína GSMUA_Achr5T03660_001 foi identificada em plastídeos de modo geral, dentre os quais pode-se incluir o próprio cloroplasto. A média de hidropaticidade (GRAVY), que se refere à afinidade das proteínas à água, variou de -0,336 a 0,014.

Diferente das proteínas do retículo endoplasmático, membrana plasmática e complexo golgiense, as proteínas presentes nos plastídeos (cloroplastos, amiloplastos) e citoplasma, são sintetizadas nos ribossomos livres no citosol e são as únicas desprovidas de peptídeo sinal. Dessa forma, todas as proteínas caracterizadas neste estudo não apresentaram peptídeo sinal, sequência capaz de direcionar a proteína para sua localização subcelular (NELSON; COX, 2018).

Finalmente, a Figura 19 denota os *motifs* (motivos) obtidos a partir dos resíduos de aminoácidos conservados nas proteínas estudadas. A identificação de resíduos

conservados permite a compreensão das relações evolutivas e das diversas funções compartilhadas entre os polipeptídeos. Além disso, também é possível detectar os *motifs* envolvidos em vários fenômenos biológicos, entre eles a resistência a doenças, na qual os *motifs* LEER, MG e GxGGxG são relatados com frequência na literatura (DEHURY et al., 2013). No tocante à bananeira, *motifs* como DRE e CRT têm sido descritos no processo de amadurecimento de frutos. Enquanto o *motif* VQ induz a ativação de genes da via biossintética de ácido jasmônico, hormônio detectado em estágios tardios de infecção por *M. fijiensis*, que atua no estabelecimento da resistência sistêmica induzida. De modo geral, os *motifs* aqui obtidos podem fornecer informações relevantes à maneira como as proteínas de defesa da bananeira atuam em resposta à Sigatoka-negra (PORTAL et al., 2011; FAN et al., 2016; SUTTO et al., 2015).

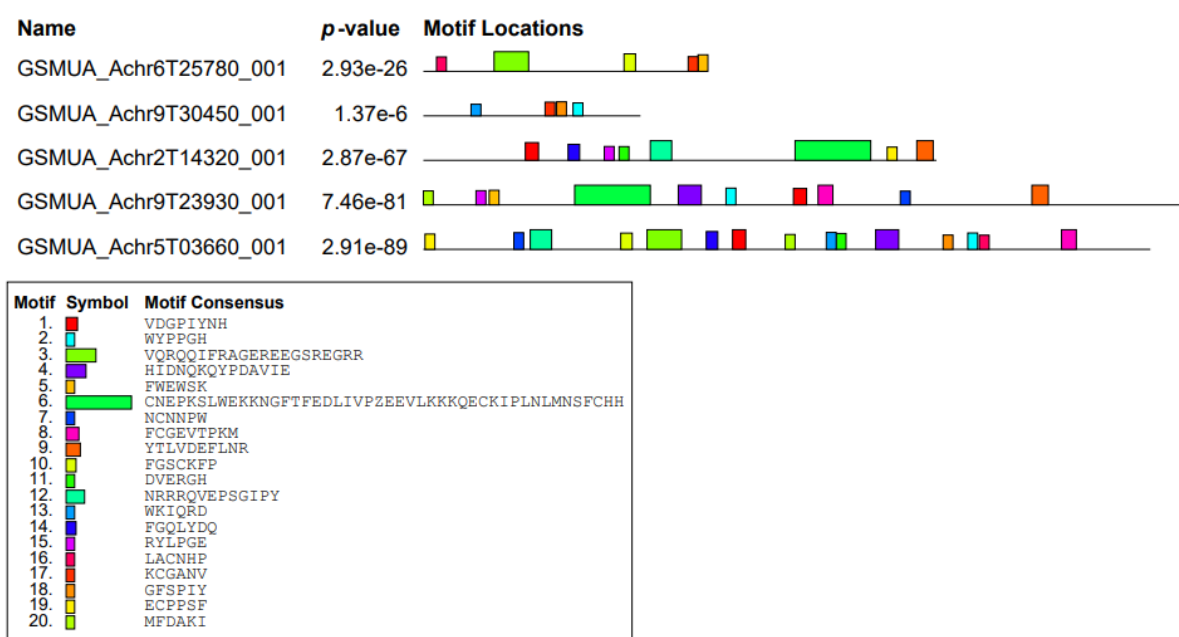


Figura 19. *Motifs* conservados em proteínas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra obtidos pelo programa MEME. *Name*: Proteína. *P-value*: significância estatística. *Motif locations*: localização dos *motifs*. *Symbol*: símbolo. *Motif consensus*: sequência consenso do *motif*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das almas, BA, 2020.

Tabela 9. Características de proteínas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra em bananeira, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 2020.

Gene	Família	Proteína	Tamanho da proteína (aa)	pI	Mw	Probabilidade de exportação (%)	GRAVY*
<i>psI</i>	PSAN	GSMUA_Achr6T25780_001	173	9,13	18.415,84	Cloroplasto 0,9148	-0,336
<i>psII</i>	PsbR	GSMUA_Achr9T30450_001	132	9,46	13.711,65	Cloroplasto 0,9059	-0,142
<i>irl</i>	NmrA	GSMUA_Achr2T14320_001	312	6,11	34.034,04	Citoplasma 0,6053	0,014
<i>utp</i>	UDPGP	GSMUA_Achr9T23930_001	467	5,57	51.346,02	Citoplasma 0,8111	-0,111
<i>prk</i>	PRK	GSMUA_Achr5T03660_001	442	8,27	49.598,94	Plastídeo 0.3952	-0,32

*GRAVY: média de hidropaticidade; Mw: peso molecular; pI: ponto isoelétrico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que os genes candidatos envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra, *psII* e *irl*, sofreram regulação positiva durante interação incompatível nas cultivares resistentes, Calcutta-4 e Krasan Saichon, respectivamente.

Além disso, os genes candidatos *psI*, *psII* e *irl* sofreram regulação negativa precoce durante interação compatível na cultivar suscetível Grande Naine. Apesar disso, o gene *psII* demonstrou regulação positiva tardia nessa cultivar.

Não houve expressão significativa de nenhum dos genes envolvidos na resposta de defesa à Sigatoka-negra na cultivar Akondro Mainty.

Houve diferença na modulação da expressão gênica entre as cultivares de bananeira, demonstrando variação no mecanismo molecular de resistência à Sigatoka-negra, contribuindo para a compreensão desse fenômeno biológico.

Ademais, foram analisadas as sequências gênicas e proteicas envolvidas na resposta de defesa à Sigatoka-negra, contribuindo para a compreensão das suas funções e mecanismos de ação dentro do patossistema *Musa* spp. x *M. fijiensis*.

Em aspectos gerais, os dados obtidos neste trabalho corroboram os resultados precedentes de fenotipagem em campo da bananeira infectada por *M. fijiensis*.

Os dados aqui discutidos podem subsidiar o PMGB, no tocante ao desenvolvimento de estratégias de cruzamento, além de fornecer genes validados (genes *psII* e *irl*) quanto à resposta de defesa vegetal, que podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores, cisgenia e/ou CRISPR visando a obtenção de cultivares de bananeira mais tolerantes e resistentes à Sigatoka-negra.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. **Elsevier Academic**, Amsterdam, 2005.

AGRITEMPO. **Agritempo**: sistema de monitoramento agrometeorológico. Disponível em: < <http://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp>>. Acesso em: 28 Maio 2020.

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in plant science**, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; TSIRIGOS, K. D.; SØNDERBY, C. K.; PETERSEN, T. N.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; NIELSEN, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019.

ALMAGRO ARMENTEROS; J. J. SØNDERBY, C. K.; SØNDERBY, S. K.; NIELSEN, H.; WINTHER, O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics**, v. 33, n. 21, p. 3387-3395, 2017.

AL-OBAIDI, J. R.; RAHMAD, N.; HANAFI, N. M.; HALABI, M. F.; AL-SOQEER, A. A. Comparative proteomic analysis of male and female plants in jojoba (*Simmondsia chinensis*) leaves revealed changes in proteins involved in photosynthesis, metabolism, energy, and biotic and abiotic stresses. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 8, p. 179, 2017.

AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BORGES, A. L.; AMARIM, V. B. de O., SILVA, S. O. Melhoramento genético. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. O agronegócio da banana. **Embrapa: Brasília**, p.171-201, 2016

ARTIMO, P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K.; BARATIN, D.; CSARDI, G.; DE CASTRO, E.; DUVAUD, S.; FLEGEL, V.; FORTIER, A.; GASTEIGER, E.; GROSDIDIER, A.; HERNANDEZ, C.; IOANNIDIS, V.; KUZNETSOV, D.; LIECHTI, R.; MORETTI, S.; MOSTAGUIR, K.; REDASCHI, N.; ROSSIER, G.; XENARIOS, I.; STOCKINGER, H. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal, **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W597-W603, 2012.

BAILEY, T. L.; BODEN, M.; BUSKE, F. A.; FRITH, M.; GRANT, C. E.; CLEMENTI, L.; NOBLE, W. S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_2, p. W202-W208, 2009.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of molecular biology**, v. 294, n. 5, p. 1351-1362, 1999.

BLOM, N.; GUPTA, R.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1633-1649, 2004.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S.; OLIVEIRA, A. M. G. Banana. In: CRISOSTOMO, L. A.; NAUMOV, A. Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, p. 31-32, 2009.

CAPLAN, J. L.; KUMAR, A. S.; PARK, E.; PADMANABHAN, M. S.; HOBAN, K.; MODLA, S.; DINESH-KUMAR, S. P. Chloroplast stromules function during innate immunity. **Developmental cell**, v. 34, n. 1, p. 45-57, 2015.

CHOUDHURY, S. R.; ROY, S.; DAS, R.; SENGUPTA, D. N. Differential transcriptional regulation of banana sucrose phosphate synthase gene in response to ethylene, auxin, wounding, low temperature and different photoperiods during fruit ripening and functional analysis of banana SPS gene promoter. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 207, 2008.

CHURCHILL, A. C. L. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 4, p. 307-328, 2011.

CLAY, K.; KOVER, P. Evolution and stasis in plant pathogen associations. **Ecology**, v: 77, p: 997-1003, 1996.

CLENDENNEN, S. K.; MAY, G. D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiology**, v. 115, n. 2, p. 463-469, 1997.

CORDEIRO, Z. J. M. Aspectos gerais sobre a bananicultura e o mal-de-Sigatoka. In: CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. de; SILVA, S. de O. e. (Ed.). *Recomendações*

técnicas sobre a Sigatoka-negra da bananeira. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, p. 11-12, 2011

CRUICKSHANK, I. A. M.; PERRIN, D. R. The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fruticola*. **Life Sciences**, v. 7, n. 10, p. 449-458, 1968.

CRUZ-CRUZ, C. A.; RAMÍREZ-TEC, G.; GARCÍA-SOSA, K.; ESCALANTE-EROSA, F.; HILL, L.; OSBOURN, A. E.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Phytoanticipins from banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine) plants, with antifungal activity against *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka. **European journal of plant pathology**, v. 126, n. 4, p. 459-463, 2010.

DANIELLS, J. W.; JENNY, C.; KARAMURA, D. A.; TOMKPE, K.; ARNAUD, E.; SHARROCK, S. (eds) **Musalogue: A catalogue of Musa germplasm**. Diversity in the genus *Musa*. Montpellier, France: INIBAP, 2001.

DE LANGHE, E. Bananas (*Musa* spp.). In FERWARDA, F. P. (ed.). Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Agricultural University, Wageningen, **The Netherlands**, p.53-73, 1969.

DE LANGHE, E.; VRYDAGHS, L.; DE MARET, P.; PERRIER, X.; DENHAM, T. Why bananas matter: an introduction to the history of banana domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 7, p. 165-177, 2009.

DEHURY, BUDHESWAR; SAHU, M.; PATRA, M. C.; SARMA, K.; SAHU, J.; SEN, P.; BAROOAH, M. Insights into the structure–function relationship of disease resistance protein HCTR in maize (*Zea mays* L.): A computational structural biology approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 45, p. 50-64, 2013.

DIXON, R. A.; ACHNINE, L.; KOTA, P.; LIU, C. J.; REDDY, M. S.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defense — a genomics perspective. **Molecular plant pathology**, v. 3, n. 5, p. 371-390, 2002.

DREHER, K.; CALLIS, J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. **Annals of Botany**, v. 99, n. 5, p. 787-822, 2007.

DROC, G.; LARIVIERE, D.; GUIGNON, V.; YAHIAOUI, N.; THIS, D.; GARSMEUR O.; DEREPPER, A.; HAMELIN, C.; ARGOUT, X.; DUFAYARD, J. F.; LENGELLE, J.;

BAURENS, F. C.; CENCI, A.; PITOLLAT, B.; D'HONT, A.; RUIZ, M.; ROUARD, M.; BOCS, S. **The Banana Genome Hub**. Database, 2013.

EL-GEBALI, S.; MISTRY, J.; BATEMAN, A.; EDDY, S. R.; LUCIANI, A.; POTTER, S. C.; SONNHAMMER, E. L. L. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D427-D432, 2019.

FAN, Z.; KUANG, J. F.; FU, C. C.; SHAN, W.; HAN, Y. C.; XIAO, Y. Y.; CHEN, J. Y. The banana transcriptional repressor MaDEAR1 negatively regulates cell wall-modifying genes involved in fruit ripening. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1021, 2016.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Database**. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acesso em 05 de fevereiro de 2020.

FOURÉ, E. Black leaf streak disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. **Irfa**, Paris, 1985.

GÖHRE, V.; JONES, A. M.; SKLENÁŘ, J.; ROBATZEK, S.; WEBER, A. P. Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 8, p. 1083-1092, 2012.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, **Nucleic Acids Research**, v. 40, 2012.

GUTMANIS, G. **Clonagem do cDNA que codifica a enzima UDP-glicose pirofosforilase de batata (*Solanum tuberosum* L.)**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

HALDRUP, A.; NAVER, H.; SCHELLER, H. V. The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic Arabidopsis plants lacking the PSI-N subunit of photosystem. **The Plant Journal**, v. 17, n. 6, p. 689-698, 1999.

HARRISON, D. H. T.; RUNQUIST, J. A.; HOLUB, A.; MIZIORKO, H. M. The Crystal Structure of Phosphoribulokinase from *Rhodobacter sphaeroides* Reveals a Fold Similar to That of Adenylate Kinase. **Biochemistry**, v. 37, n. 15, p. 5074-5085, 1998.

HIDALGO, M.; TAPIA, A.; RODRÍGUEZ, W.; SERRANO, E. Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa sp.* AAA, cv. Valery). **Agronomía Costarricense**, v. 30, n. 1, p. 35-41, 2006.

HIDALGO, W.; CHANDRAN, J. N.; MENEZES, R. C.; OTÁLVARO, F.; SCHNEIDER, B. Phenylphenalenones protect banana plants from infection by *Mycosphaerella fijiensis* and are deactivated by metabolic conversion. **Plant, cell & environment**, v. 39, n. 3, p. 492-513, 2016.

IBRAHEEM, O.; BOTHA, C. E. J.; BRADLEY, G. In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa Japonica*) and *Arabidopsis thaliana*. **Computational biology and chemistry**, v. 34, n. 5-6, p. 268-283, 2010.

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

KELLER, F.; LUDLOW, M. M. Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 8, p. 1351-1359, 1993.

KUMAR, S.; WANG, Z.; BANKS, T. W.; JORDAN, M. C.; MCCALLUM, B. D.; CLOUTIER, S. Lr1-mediated leaf rust resistance pathways of transgenic wheat lines revealed by a gene expression study using the Affymetrix GeneChip® Wheat Genome Array. **Molecular breeding**, v. 34, n. 1, p. 127-141, 2014.

LEIVA-MORA, M.; ALVARADO-CAPÓ, Y.; ACOSTA-SUÁREZ, M.; CRUZ-MARTÍN, M.; SÁNCHEZ-GARCÍA, C.; ROQUE, B. Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa spp.* con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. **Bioteología vegetal**, v. 10, n. 2, 2010.

LEHOURS, P.; SIFFRÉ, E.; MÉGRAUD, F. DPO multiplex PCR as an alternative to culture and susceptibility testing to detect *Helicobacter pylori* and its resistance to clarithromycin. **BMC gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 112, 2011.

LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER, Y.; ROMBAUTS, S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 1, p. 325-327, 2002.

LIANG, Y.; SRIVASTAVA, S.; RAHMAN, M. H.; STRELKOV, S. E.; KAV, N. N. Proteome changes in leaves of *Brassica napus* L. as a result of *Sclerotinia sclerotiorum* challenge. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1963-1976, 2008.

LIN, S.; MILLER, J. D.; YING, S. Intronic microRNA (mirna). **BioMed Research International**, v. 2006, 2006.

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

MARIN, D. H.; ROMERO, R. A.; GUZMÁN, M.; SUTTON, T. B. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. **Plant disease**, v. 87, n. 3, p. 208-222, 2003.

MARRI, L.; SPARLA, F.; PUPILLO, P.; TROST, P. Co-ordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoribulokinase, and CP12 in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 409, p. 73-80, 2005.

MARTINEZ-PASTOR, M. T.; MARCHLER, G.; SCHÜLLER, C.; MARCHLER-BAUER, A.; RUIS, H.; ESTRUCH, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **The EMBO journal**, v. 15, n. 9, p. 2227-2235, 1996.

MCNEW, G. L. The nature, origin, and evolution of parasitism. In HORSFALL, J.G.; DIMOND, A. E. (Eds.). *Plant pathology: An advanced treatise*. **Academic Press**, New York, 1960.

MEHTA, A.; BRASILEIRO, A. C.; SOUZA, D. S.; ROMANO, E.; CAMPOS, M. A.; GROSSI-DE-SA, M. F.; SILVA, M. S.; FRANCO, O. L.; FRAGOSO, R. R.; BEVITORI, R.; ROCHA, T. L. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? **The FEBS Journal**, v. 275, n. 15, p. 3731-3746, 2008.

MERT-TÜRK, F. Phytoalexins: defence or just a response to stress. **Journal of cell and molecular biology**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2002.

MICHALOWSKI, C. B.; DEROCHE, E. J.; BOHNERT, H. J.; SALVUCCI, M. E. Phosphoribulokinase from ice plant: transcription, transcripts and protein expression during environmental stress. **Photosynthesis research**, v. 31, n. 2, p. 127-138, 1992.

MIO, T.; YABE, T.; ARISAWA, M.; YAMADA-OKABE, H. The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 23, p. 14392-14397, 1998.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos. **Embrapa Semiárido-Documentos** (INFOTECA-E), 2016.

MUTHUSAMY, M.; UMA, S.; BACKIYARANI, S.; SARASWATHI, M. S.; CHANDRASEKAR, A. Transcriptomic changes of drought-tolerant and sensitive banana cultivars exposed to drought stress. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 1609, 2016.

NASCIMENTO, F. S. **Diploides selvagens de bananeira com resistência à sigatoka-negra**. 2019. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger-7. **Artmed Editora**, 2018.

ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D. Inheritance of black sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa* spp.) hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, n. 2-3, p. 146-152, 1994.

PAIVA, N. L.; EDWARDS, R.; SUN, Y.; HRAZDINA, G.; DIXON, R. A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 11. Molecular cloning and expression of alfalfa isoflavone reductase, a key enzyme of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. **Plant Molecular Biology**, v.17, p.653-667, 1991.

PAKRASI, H. B. Genetic analysis of the form and function of photosystem I and photosystem II. **Annual review of genetics**, v. 29, n. 1, p. 755-776, 1995.

PETRESCU, A.; MILAC, A. L.; PETRESCU, S. M.; DWEK, R. A.; WORMALD, M. R. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. **Glycobiology**, v. 14, n. 2, p. 103-114, 2004.

PETRESCU, S. M.; BRANZA-NICHITA, N.; NEGROIU, G.; PETRESCU, A. J.; DWEK, R. A. Tyrosinase and glycoprotein folding: roles of chaperones that recognize glycans. **Biochemistry**, v. 39, n. 18, p. 5229-5237, 2000.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Vol. 30, p. 2-10, 2002.

PINEDA, M.; SAJNANI, C.; BARÓN, M. Changes induced by the Pepper mild mottle tobamovirus on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*. **Photosynthesis research**, v. 103, n. 1, p. 31, 2010.

PODEVIN, N.; KRAUSS, A.; HENRY, I.; SWENNEN, R.; REMY, S. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop *Musa*. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 3, p. 1237-1252, 2012.

PORTAL, O.; IZQUIERDO, Y.; DE VLEESSCHAUWER, D.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; MENDOZA-RODRÍGUEZ, M.; ACOSTA-SUÁREZ, M.; HÖFTE, M. Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*–banana interaction. **Plant cell reports**, v. 30, n. 5, p. 913-928, 2011.

PUA, E.; LIM, S. S. W.; LIU, P.; LIU, J. Z. Expression of a UDPglucose pyrophosphorylase cDNA during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*). **Functional Plant Biology**, v. 27, n. 12, p. 1151-1159, 2000.

RAINES, C. A.; LONGSTAFF, M.; LLOYD, J. C.; DYER, T. A. Complete coding sequence of wheat phosphoribulokinase: developmental and light-dependent expression of the mRNA. **Molecular & general genetics: MGG**, v. 220, n. 1, p. 43-48, 1989.

RAMOS, J. B.; BRAGANÇA, C. A. D.; ROCHA, L. S.; OLIVEIRA, A. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; HADDAD, F. First Report of Black Sigatoka of Banana Caused by *Mycosphaerella fijiensis* in Bahia, Brazil. **Plant disease**, v. 102, n. 10, p. 2035-2035, 2018.

REDMAN, J.; WHITCRAFT, J.; JOHNSON, C.; ARIAS, J. Abiotic and biotic stress differentially stimulate as-1 element activity in Arabidopsis. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 2, p. 180-185, 2002.

RODRIGUEZ, H. A.; RODRIGUEZ-ARANGO, E.; MORALES, J. G.; KEMA, G.; ARANGO, R. E. Defense gene expression associated with biotrophic phase of *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet infection in banana. **Plant disease**, v. 100, n. 6, p. 1170-1175, 2016.

RUSHTON, P. J.; SOMSSICH, I. E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current opinion in plant biology**, v. 1, n. 4, p. 311-315, 1998.

SANTOS, S. C.; CARNEIRO, L. C.; SILVEIRA NETO, A. N. D.; PANIAGO JÚNIOR, E.; FREITAS, H. G. D.; PEIXOTO, C. N. Caracterização morfológica e avaliação de cultivares de bananeira resistentes à Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) no sudoeste goiano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 449-453, 2006.

SERRANO, I.; AUDRAN, C.; RIVAS, S. Chloroplasts at work during plant innate immunity. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 13, p. 3845-3854, 2016.

SHARP, P. A. Split genes and RNA splicing. **Cell**, v. 77, n. 6, p. 805-815, 1994.

SIEBER, P.; PLATZER, M.; SCHUSTER, S. The definition of open reading frame revisited. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 3, p. 167-170, 2018.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO; J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUES, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO; J. A.; AMORIM, E. P. Pré-melhoramento da banana. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P., FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. (Org.). Pré-melhoramento de plantas: Estado da arte e experiências de sucesso. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, p.317-350, 2011.

SILVA, S. O.; SHEPHERD, K.; ALVES, E. J.; DANTAS, J. L. L. Cultivares de banana. In: ALVES, E. J. A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p.85-105, 1999.

STAMMERS, D. K.; REN, J.; LESLIE, K.; NICHOLS, C. E.; LAMB, H. K.; COCKLIN, S.; HAWKINS, A. R. The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. **The EMBO journal**, v. 20, n. 23, p. 6619-6626, 2001.

SUTTO, L.; MARSILI, S.; VALENCIA, A.; GERVASIO, F. L. From residue coevolution to protein conformational ensembles and functional dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 44, p. 13567-13572, 2015.

TIMM, E. S.; PARDO, L. H.; COELLO, R. P.; NAVARRETE, T. C.; VILLEGAS, O. N.; ORDONEZ, E. S. Identification of differentially-expressed genes in response to *Mycosphaerella fijiensis* in the resistant *Musa* accession 'Calcutta-4' using suppression subtractive hybridization. **PloS one**, v. 11, n. 8, 2016.

TOMLINSON P. **Anatomy of the monocotyledons**. III. Commelinales– Zingiberales. Oxford: Clarendon Press, 1969.

WEBBER, A. N.; PACKMAN, L. C.; GRAY, J. C. A 10 kDa polypeptide associated with the oxygen-evolving complex of photosystem II has a putative C-terminal non-cleavable thylakoid transfer domain. **FEBS letters**, v. 242, n. 2, p. 435-438, 1989.

WHEELER, D. L.; WHEELER, D. L.; CHURCH, D. M.; FEDERHEN, S.; LASH, A. E.; MADDEN, T. L.; PONTIUS, J. U.; SCHULER, G. D.; SCHRIML, L. M.; SEQUEIRA, E.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L. Database resources of the National Center for Biotechnology. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 1, p. 28-33, 2003.

ZHAO, L.; DING, Q.; ZENG, J.; WANG, F. R.; ZHANG, J.; FAN, S. J.; HE, X. Q. An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 6, p. 647-650, 2012.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of computational biology**, v. 12, n. 8, p. 1047-1064, 2005.