

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E ESTUDO  
HISTOLÓGICO NO PATOSSISTEMA BANANEIRA X  
*Mycosphaerella musicola***

**PAULO HENRIQUE DA SILVA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
FEVEREIRO - 2017**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E ESTUDO  
HISTOLÓGICO NO PATOSSISTEMA BANANEIRA X  
*Mycosphaerella musicola***

**PAULO HENRIQUE DA SILVA**

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo  
**Coorientadora:** Profa. Dra. Cláudia Fortes Ferreira  
**Coorientador:** Prof. Dr. Edson Perito Amorim

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
FEVEREIRO - 2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586a

Silva, Paulo Henrique da.

Análise da expressão gênica e estudo histológico no patossistema bananeira x *Mycosphaerella musicola* / Paulo Henrique da Silva. \_ Cruz das Almas, BA, 2017. 74f.; il.

Orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo.  
Coorientadora: Cláudia Fortes Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Banana – Doenças e pragas. 2.Banana – Variabilidade genética – Histopatologia. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Amorim, Edson Perito. III.Título.

CDD: 632.9

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E ESTUDO  
HISTOLÓGICO NO PATOSSISTEMA BANANEIRA X  
*Mycosphaerella musicola***

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE  
Paulo Henrique da Silva**

Realizada em 21 de fevereiro de 2017

Dra. Cláudia Fortes Ferreira  
Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura – EMBRAPA  
(Coorientadora)

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB  
Examinador Interno

Profa. Dra. Edna Lobo Machado  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB  
Examinador Interno

Prof. Dr. Weliton Bastos de Almeida  
Faculdade Maria Milza / FAMAM  
Examinador Externo

Dr. Hermínio Souza Rocha  
Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura – EMBRAPA  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

Dedico,

A Deus por me dar forças para realização deste trabalho,

À minha filha Maria Paula, por todo carinho,

À minha esposa Jaqueline Maria, pelo Amor, Carinho, Dedicção e incentivo durante os momentos mais difíceis,

Aos meus pais, José e Maria, por todos os ensinamentos, e por me apoiarem nessa longa trajetória,

À minha irmã, Andréa, que sempre me incentivou e acreditou no meu sucesso,

À todos eles que são a minha razão de viver, um muito obrigado.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que sempre está ao meu lado guiando os meus passos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de estudo e estrutura para o desenvolvimento do projeto.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela estrutura para o desenvolvimento do projeto.

A CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade de estudo e de realização.

Ao professor Clóvis Peixoto, pelos ensinamentos e incentivo nos momentos mais difíceis.

À professora Maria Angélica, por todo carinho e incentivo.

Aos funcionários do departamento de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB, em especial Deyse, pela amizade e disposição.

A toda minha família, por todo o apoio e incentivo para minha formação.

Aos amigos da Embrapa, Chico, Dona Leu, Tonga, Jair, Valnei, Honorato, pelo companheirismo e ensinamentos.

Ao mestre Raimundo (Raimundão), por todo o incentivo, preocupação e dedicação durante toda a minha formação, muito obrigado.

À Dr. Andresa, pelo carinho, incentivo e amizade durante o período de vivência na Embrapa.

Ao amigo Vandeson (E é comigo), pelo companheirismo, incentivo e por acreditar na minha formação.

Ao Mestre Bizunga, por todos os ensinamentos e dedicação desde os tempos da graduação, muito obrigado.

Ao meu grande amigo Ademir, pelo incentivo incondicional, confiança, dedicação e amizade, muito obrigado.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial Kátia Pestana, Zanon, Cláudia, Iane, Marciane, Carol, Ariana, Juliana, Naira, Cátia e Zalmar por todos os momentos de trabalho e diversão, e por fazerem parte dessa vitória.

A toda a equipe do Laboratório de Anatomia vegetal da UFRB, em especial Mara, Shirley, Carol e Renata, por todos os momentos de descontração e trabalho.

Ao amigo Israel, por todos os ensinamentos e dedicação, muito obrigado.

Ao Dr. Fabiano Martins, por todo o incentivo, carinho, ensinamentos e dedicação, você foi fundamental para realização deste trabalho, muito obrigado.

A toda equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da FIOCRUZ-Salvador, em especial ao amigo Márcio, pelos ensinamentos, dedicação e companheirismo, obrigado meu amigo.

A equipe do Laboratório de Fitopatologia, em especial ao amigo Francisco Paulo por todos os ensinamentos e dedicação para realização deste trabalho.

Ao amigo Rafael (Big Horse), pelo incentivo e dedicação para realização deste trabalho.

A Luciano Rogério, pelo incentivo e colaboração para realização deste trabalho.

A Dr. Rogério Mercês, pelo apoio incondicional desde o início dos trabalhos na Embrapa Mandioca e Fruticultura, toda sua dedicação, atenção e profissionalismo, muito obrigado.

À Dra. Cláudia Fortes, por todos os ensinamentos desde a época da graduação e pela dedicação para realização deste trabalho, sendo fundamental para eu alcançar essa vitória, muito obrigado.

Ao Dr. Carlos Ledo, orientador dedicado, prestativo e competente, agradeço pelos ensinamentos e apoio nos momentos mais difíceis, obrigado por tudo.

À minha esposa, pelo carinho, Amor, dedicação e incentivo em todos os momentos, você foi fundamental para a realização deste sonho.

À minha filha Maria Paula, por me fazer mais feliz e ser a minha força nos momentos difíceis, obrigado filha, papai Te Ama.

A todos que de alguma maneira me ajudaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

REFERENCIAL TEÓRICO.....1

### ARTIGO 1

ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA INTERAÇÃO *Mycosphaerella musicola* (Sigatoka-amarela) COM A Bananeira (*Musa* sp.).....11

### ARTIGO 2

EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES DE RESISTÊNCIA VIA RT-qPCR NO PATOSSISTEMA Bananeira X *Mycosphaerella musicola*.....33

### ARTIGO 3

AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella musicola* EM CULTIVARES DE BANANEIRA (*Musa* sp.).....53

CONSIDERAÇÕES FINAIS .....64



## **ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E ESTUDO HISTOLÓGICO NO PATOSSISTEMA BANANEIRA X *Mycosphaerella musicola***

Autor: Paulo Henrique da Silva  
Orientador: Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo  
Coorientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira  
Coorientador: Dr. Edson Perito Amorim

**RESUMO:** A Sigatoka-amarela, causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola*, é uma das doenças mais importantes para a cultura da bananeira. O fungo apresenta grande variabilidade genética, culminando no difícil controle da doença. As principais cultivares de bananeira são suscetíveis, surgindo então a necessidade de entender os mecanismos envolvidos na resposta de resistência a defesa. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar anatomicamente o processo de infecção de *M. musicola* em duas cultivares contrastantes para resistência, quantificar a expressão de genes de resistência e avaliar o comportamento de isolados de *M. musicola* oriundos de diferentes locais do Brasil. Para as análises foram utilizadas amostras foliares das cultivares inoculadas e não inoculadas nos tempos 24, 48, 72 e 120 horas após a inoculação (h.a.i.). Para o estudo histopatológico, foram utilizados cortes transversais de amostras de folhas das cultivares inoculadas e não inoculadas. Em microscopia de luz foi observada a produção de substâncias lipofílicas e compostos fenólicos como primeiros sintomas na cultivar Grande Naine. A cultivar Caipira não mostrou sinais de infecção em nenhum dos tempos avaliados. Em microscopia eletrônica de varredura foram visualizadas hifas sobre células estomáticas a partir de 24 h.a.i. com *M. musicola*, somente na cultivar Grande Naine. Foi utilizada a técnica RT-qPCR para análise da expressão gênica, a partir de RNA extraído de amostras foliares das cultivares inoculadas e não inoculadas. Foram avaliados 18 pares de primers específicos obtidos de análise de RNAseq (Illumina High-seq2000) e destes, apenas dois foram selecionados, os genes proteína quinase e proteína quinase 2 associada a parede (WAK2), esse último, relacionado a estímulos ambientais. Foi verificada a indução significativa do gene proteína quinase em todos os tempos avaliados em bananeira Grande Naine. Para o genótipo Caipira, houve repressão em todos os tempos avaliados. O gene WAK2 foi induzido com 24 e 48 h.a.i após desafio com *M. musicola* e reprimido após 72 h.a.i. para o genótipo Grande Naine e o genótipo Caipira apresentou repressão em todos os tempos avaliados. Para avaliação do comportamento dos diferentes isolados de *M. musicola*, foi realizada a análise da área abaixo da curva do progresso da doença e curvas de progresso. Os resultados observados permitiram inferir sobre a variabilidade entre os isolados quanto à agressividade, evidenciando a existência de diversidade genética. Por meio das curvas de progresso da severidade foi possível observar início dos sintomas no período compreendido entre 35 e 42 dias após a inoculação (DAI).

**Palavras chave:** Sigatoka-amarela; severidade; genes de resistência mecanismo de infecção.

## **GENE EXPRESSION ANALYSIS AND HISTOLOGICAL STUDY OF THE BANANEIRA X *Mycosphaerella musicola* PATHOSYSTEM**

Author: Paulo Henrique da Silva

Adviser: Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Coadviser: Dr. Cláudia Fortes Ferreira

Coadviser: Dr. Edson Perito Amorim

**ABSTRACT:** Yellow Sigatoka, caused by the fungus *Mycosphaerella musicola*, is one of the most important diseases of banana crops. The fungus has great genetic variability, making the disease difficult to control, and because the main banana cultivars are susceptible, there is a need to understand the mechanisms involved in the resistance response of the plants. Thus, the objectives of this study were to characterize the infection process of *M. musicola* in two contrasting cultivars (Grande Naine and Caipira), to quantify the expression of resistant genes, and to evaluate the behavior of *M. musicola* isolates from different Brazilian locations. For the analyses, leaf samples of the inoculated and non-inoculated cultivars were evaluated 24, 48, 72 and 120 hours after inoculation (h.a.i.). For the histopathological study, transverse sections were made of leaf samples of the inoculated and non-inoculated cultivars. Using light microscopy, lipophilic substances and phenolic compounds were observed as symptoms in the Grande Naine cultivar. The Caipira cultivar showed no signs of infection at any of the evaluated times. For the Grande Naine cultivar, scanning electron microscopy showed hyphae on stomatal cells starting at 24 h.a.i. An RT-qPCR technique was used to analyze the gene expression of RNA extracted from leaf samples of the inoculated and non-inoculated cultivars. Eighteen pairs of specific primers obtained from an RNAseq (Illumina High-seq2000) analysis were evaluated. Of these, only two were selected, protein kinase and wall-associated protein kinase 2 (WAK2), the latter being related to environmental stimuli. For the Grande Naine cultivar, significant induction of the protein kinase gene was observed for all times evaluated. For the Caipira genotype, there was repression for all times evaluated. WAK2 was induced at 24 and 48 h.a.i. after exposure to *M. musicola* and was repressed after 72 h.a.i. by the Grande Naine genotype, while the Caipira genotype showed repression at all evaluated times. To evaluate the behavior of the different isolates of *M. musicola*, an analysis of the area under the disease progress curve and progress curves was conducted. The results show variability among the isolates regarding aggressiveness, which is evidence of genetic diversity. Based on the progress curves of the severity, the initial symptoms started between 35 and 42 days after inoculation (DAI).

**Key words:** Yellow Sigatoka; Severity; Resistance genes; Mechanism of infection.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### A cultura da Bananeira

Originada do Sudeste Asiático (SIMMONDS, 1962), a banana (*Musa* spp.; Musaceae) é considerada uma das fontes alimentares mais importantes do mundo (PERRIER et al., 2011), e em muitos países é a principal fonte de arrecadação e geradora de emprego e renda para uma parte expressiva da população. No Brasil, a produção estende-se de Norte a Sul do país, envolvendo desde a faixa litorânea até os planaltos interioranos, e quase a totalidade nacional produzida é destinada ao mercado interno (BORGES; SOUZA, 2004). Grande parte das espécies cultivadas, produtoras de frutos comestíveis são originadas de hibridações intra ou interespecífica de subespécie de duas espécies selvagens diplóides, *Musa acuminata* Colla (genoma A) e *Musa balbisiana* Colla (genoma B) (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

A área plantada no Brasil foi de aproximadamente 500 mil hectares, com uma produção de cerca de sete milhões de toneladas, sendo o Brasil o quinto maior produtor da cultura (FAO, 2016). Na produção Brasileira, os cultivares que mais predominam são triploides do grupo AAB, como a Prata, Prata Anã, Pacovan, Macã, Mysore, D'Angola e Terra (Plátanos), utilizados para o mercado interno, e a Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, usados para exportação. Os cultivares Prata, Prata Anã e Pacovan, são responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada com bananeira no Brasil, e o cultivar Grande Naine juntamente com o Nanica e o Nanicão são responsáveis por 19,5% (SILVA et al., 2015). As variedades mais cultivadas no Brasil são suscetíveis às principais doenças, o que contribui para inúmeras perdas na produção nacional (SILVA et al., 2015).

A bananeira é afetada por diversas pragas e doenças. Os fungos se destacam como o principal grupo de fitopatógenos devido tanto à sua grande variabilidade quanto pelos danos causados à cultura, podendo ser um fator limitante para o cultivo de determinadas variedades suscetíveis a estes fitopatógenos (CORDEIRO et al., 2005).

## Sigatoka Amarela

Uma das principais e mais importante doença da cultura é a Sigatoka amarela, também conhecida como mal-da-Sigatoka, causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Leach (forma perfeita ou sexuada) e *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton (forma imperfeita ou assexuada) (CORDEIRO, 2002), que pode causar perdas de até 100% da produção a depender da variedade e condições ambientais (CORDEIRO et al., 2004; CORDEIRO et al., 2005). A Sigatoka amarela foi constatada em território brasileiro em 1944 no estado do Amazonas (CORDEIRO et al., 2005), seguidamente, disseminada para todo o território nacional (FOURÈ, 1994).

Inúmeras espécies de *Mycosphaerella* tem sido identificadas a partir do gênero *Musa* (ARZANLOU et al., 2008), com destaque para *M. musicola* e *M. fijiensis* responsáveis por ocasionar danos consideráveis para a cultura da bananeira (BLOMME et al., 2013).

A ocorrência da Sigatoka amarela é fortemente influenciada pelas condições climáticas, principalmente quando se tem a ocorrência de chuva, orvalho e temperatura adequada, que são fundamentais para que haja infecção, produção e conseqüentemente a disseminação do inóculo (CORDEIRO, 2002; CORDEIRO et al., 2004). A doença se caracteriza pelo acúmulo de lesões necróticas foliares e diminuição da capacidade fotossintética da planta, causando redução no número e tamanho dos frutos por cacho, com amadurecimento prematuro dos frutos, que pode ser observado tanto em nível de campo, quanto de pós-colheita (CORDEIRO et al., 2004; CORDEIRO et al., 2005).

A infecção ocorre nas folhas zero (vela), um, dois e três, caracterizada por uma leve descoloração com forma de ponto entre as nervuras secundárias da segunda até a quarta folha. Ocorre a formação de estrias de coloração amarela, que crescem formando manchas necróticas e alongadas dispostas paralelamente às nervuras secundárias da folha, adquirindo a forma elíptica-alongada formando assim uma lesão de coloração cinza circundada por um halo amarelo (CORDEIRO et al., 2005).

## Melhoramento genético da bananeira

Iniciado em 1976, o programa de melhoramento de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura conta com inúmeros acessos, de origem nacional e internacional, distribuídos no banco de germoplasma (AMORIM et al., 2015). Este programa tem desenvolvido cultivares importantes para a sustentação do cultivo da bananeira no país. O sucesso do programa deve-se às estratégias utilizadas para o desenvolvimento destas cultivares, que consiste no cruzamento de triploides e tetraploides com diploides selvagens ou melhorados, duplicação cromossômica de diploides superiores e indução de mutação (AMORIM et al., 2015).

Grande parte dos cultivares foram obtidos de cruzamento natural entre as espécies selvagens. A maioria das espécies cultivadas pertence à seção Eumusa, que consiste de diploides ou triploides originados a partir de híbridos intraespecíficos de *M. acuminata* Colla com genoma A (AA, AAA), ou de hibridação interespecífica entre *M. balbisiana* Colla com genoma B e *M. acuminata* Colla (AB, AAB e ABB) (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

A natureza poliploide e a baixa fertilidade (BAKRY et al., 2009) limitam o melhoramento convencional da bananeira. Estratégias complementares são necessárias para tentar solucionar tais limitações, com destaque para a cultura de tecidos e enfoques moleculares, como variação somaclonal, mutagênese *in vitro* e transformação genética (SILVA et al., 1998; OSELEBE et al., 2006; BAKRY, 2009). Empregada como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de cultivares, a biotecnologia vem oferecendo alternativas interessantes para os programas de melhoramento em suas diferentes fases.

## Histopatologia da interação bananeira x *M. musicola*

A interação hospedeiro-patógeno deve ser considerada como um sistema único, que depende da planta, patógeno e do ambiente. A luta entre os dois organismos pela própria sobrevivência é caracterizada pela reação das células vegetais à penetração do fungo através de vários mecanismos

estruturais e/ou bioquímicos, procurando evitar os possíveis danos causados pelo patógeno (PASCHOLATTI; LEITE, 1995).

Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro. Os mecanismos estruturais são defesas físicas que evitam ou restringem o desenvolvimento do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (PASCHOLATTI; LEITE, 1995; SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008).

Os mecanismos de resistência podem ser subdivididos em duas categorias, pré-formados (passivos ou constitutivos) e pós-formados (ativos ou induzíveis) (STANGARLIN *et al.*, 2011). Os mecanismos pré-formados são estruturas existentes nas plantas antes da chegada dos fitopatógenos, e que podem contribuir para a resistência, como tais estruturas podemos citar a presença de cutícula, os tricomas, os estômatos (tamanho e formato), pilosidade, vasos condutores de seiva e camada de sílica (STANGARLIN *et al.*, 2011).

No grupo de mecanismos pós-formados, em que expressão é desencadeada após o início das atividades do patógeno na superfície do hospedeiro, podem ser agrupados em estruturas de defesa celular, que envolvem células individuais sob ataque do patógeno, e estruturas de defesa histológica. A formação de halos, papilas, ou lignificação, fazem parte do grupo de defesa celular, que são barreiras celulares, e as camadas de cortiça, camadas de abscisão, tilose e deposição de gel, são consideradas barreiras histológicas (STANGARLIN *et al.*, 2011).

Na interação bananeira x *M. musicola*, estudos relatam a menor densidade estomática como um mecanismo de defesa (VALERIO *et al.*, 2002; GARCÍA *et al.*, 2004; HERNANDEZ *et al.*, 2006). Rodriguez *et al.* (2009) relataram que na avaliação de algumas características anatômicas de folhas de cultivares de bananeira, a espessura da cutícula da face abaxial e a densidade estomática são as variáveis associadas à resistência ou a susceptibilidade a Sigatoka.

Na avaliação da resistência de planta a patógenos, o conhecimento dos mecanismos de defesas envolvidos na interação é de fundamental importância para direcionamento das estratégias para os programas de melhoramento visando resistência de plantas a doença. Neste contexto, estudos anatômicos tornam-se de grande importância, pois permitem além da caracterização histológica das cultivares em estudo, verificar o processo de infecção e interação do patógeno com o vegetal, permitindo a identificação de compostos envolvidos na resposta de defesa, como fusão de parede celular, morte celular, liberação de compostos fenólicos, entre outros processos (BECKMAN, 2000).

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

No melhoramento genético de plantas, tem-se buscado, cada vez mais, a utilização de técnicas moleculares mais eficientes para mensuração da expressão gênica. Neste contexto, a técnica RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real) tem sido bastante utilizada para estudos da expressão gênica devido à sua sensibilidade e especificidade, não necessitando de processos pós-amplificação e por apresentar alta reprodutibilidade (WONG; MEDRANO, 2005).

A RT- qPCR requer um fluoróforo que se liga ao produto de amplificação e detecta a sua presença pela emissão de fluorescência. De acordo com o tipo de estudo, vários fluoróforos estão disponíveis para análises de RT- qPCR, a exemplo das sondas *Taq man*, *beacon* e do corante *Sybr Green* (MORRISON et al., 1998).

Essa técnica é usada na análise de expressão gênica em plantas (GACHON et al., 2004) devido a sua grande capacidade em discriminar genes relacionados a baixa expressão (CZECHOWSKI et al., 2004), sendo também usada em análises de interações planta-patógeno em diversos patossistemas (SANTOS, 2010; PORTAL et al., 2011; LI et al., 2011; FEDERICI et al., 2012; PASSOS et al., 2013; COSTA, 2013; YU et al., 2014). As principais características do PCR em tempo real são rapidez, especificidade,

sensibilidade e quantificação (BUSTIN e NOLAN, 2004), quando comparada com a PCR convencional.

### **Quantificação da severidade de doença**

Definida como a porcentagem da área ou do volume de tecido coberto por sintomas, a severidade é o parâmetro mais apropriado para quantificar doenças foliares (AMORIM, 1995). Contudo, a sua quantificação torna-se extremamente laboriosa, dependente de treinamento prévio do avaliador. Este por sua vez deve ser capaz de reconhecer as características da doença, tais como sua distribuição na planta e na parcela avaliada, a existência de variações entre folhas novas e velhas, e ter habilidade de estimar com precisão e acurácia a porcentagem da área coberta com os sintomas (ALVES; NUNES, 2012).

Estratégias para obter-se a severidade já foram propostas, sendo as principais as chaves descritivas, as escalas diagramáticas e a análise de imagem por computador (AMORIM, 1995). Na avaliação do progresso da Sigatoka-amarela na bananeira, tem-se utilizado a escala diagramática de Stover modificada por Gauhl (1994).

Os avanços da informática têm permitido o aumento da eficiência de uma série de operações até então realizadas manualmente. A análise de imagens não está sujeita aos problemas inerentes à acuidade visual humana, já que a resposta ao estímulo ótico segue, neste caso, um modelo linear. Este tipo de avaliação gera uma precisão muito elevada (AMORIM, 1995).

Assim, a severidade apresenta melhor ajuste em estudos de eficiência de controle, condições favoráveis a epidemias e em estudos de danos (VALE et al., 2004; NUTTER et al., 2006).

Contudo, o objetivo deste estudo foi caracterizar o processo de infecção de *M. musicola* em dois cultivares contrastantes para resistência, analisar a expressão de genes de resistência e avaliar o comportamento de isolados de *M. musicola* oriundos de diferentes locais do Brasil.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.A.M.; NUNES, C.C. **Metodologia para elaboração de escalas diagramáticas para avaliação de doenças em plantas**. Comunicado Técnico. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA, 2012.

AMORIM, E. P. et al. Melhoramento Genético. In: **O Agronegócio da Bananeira**. Volume 1. 1st edition. Edited by Claudia Fortes Ferreira, C.F.; Silva, S. de O.; Amorim, E.P.; Santos-Serejo, J.A dos. Embrapa Mandioca e Fruticultura. 832 p., 2015.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: **MANUAL de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 647–671, 1995.

ARZANLOU, P. M. et al. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. **Persoonia**. v20, 19–37, 2008.

BAKRY, F. et al. Genetic Improvement of Banana. In **Breeding Plantain Tree Crops: Tropical Species**. Edited by Jain SM, Priyadarshan PM. New York: Springer Verlag Publisher: 3–46. 2009.

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

BLOMME, G. et al. A historical overview of the appearance and spread of *Musa* pests and pathogens on the African continent: highlighting the importance of clean *Musa* planting materials and quarantine Measures. **Ann. Appl. Biol.**, 162, 4–26. 2013.

BORGES, A.L.; SOUZA, L.S. **O Cultivo da Bananeira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 279p. 2004.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, Bethesda MD, USA, Volume 15, ISSUE 3, September, 2004.

CORDEIRO, Z.J.M. Folha sob ataque. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**. Pelotas – RS, pag. 15-18, abril/maio 2002.

CORDEIRO, Z.J.M. et al. Doenças e métodos de controle. In **O Cultivo da Bananeira**, Volume 1. 1st edition. Edited by Borges AL, Souza LS. Cruz das Almas: Nova Civilização: Cruz das Almas: Nova Civilização; 146–182, 2004.

CORDEIRO, Z.J.M. et al. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, p. 99-117. 2005.

COSTA, J. L. **Estudos histológicos e moleculares da interação *Musa* spp. x *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***. 197p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo – Piracicaba. 2013.

CZECHOWSKI, T. et al. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. **Plant J.** 38 366–379, 2004.

FAO. **Agricultural Database**. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 15 jul. 2016.

FEDERICI, M. T. et al. *Xylella fastidiosa*: An *in vivo* system to study possible survival strategies within citrus xylem vessels based on global gene expression analysis. **Electron. J. Biotechnol.** Valparaíso, Chile. vol.15 no.3, 2012.

FOURÈ, E. Leaf Spot Diseases of banana and plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis*. In: DR Jones (ed) **The Improvement and Testing of Musa: A Global Partnership**. Proceedings of the First Global Conference of the International Musa Testing Program Held at FHIA, Honduras, April 27–30, 1994.

GACHON, C. et al. Real-time PCR: what relevance to plant studies. **J Exp Bot.** Oxford, USA. v.55, p.1445-1454, 2004.

GARCÍA, E. et al. Aspectos morfoanatômicos y moleculares de la infección *in vitro* de plantas de plátano cv. Hartón (AAB) por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. In: Orozco M, Orozco J, Robles M, Velázquez J, Medina V, Hernández J. (Eds.). **XVI reunión internacional de la asociación para la cooperación en investigaciones de bananos en el caribe y la américa tropical**. Oaxaca, México. p. 217, 2004.

GAUHL, F. **Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain nad banana (*Musa* spp) in Costa Rica, Central América**. Montpellier: INIBAP, 120 p. 1994.

HERNÁNDEZ, Y. et al. Densidad estomática en materiales de plátano (*Musa* AAB, AAAB y ABB) susceptibles y resistentes a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet). **Revista de la Facultad de Agronomía LUZ.** 23(3):294-300, 2006.

LI, C. et al. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. **BioMed Central Genomics**, v.13, p.374, 2012.

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

NUTTER, F. W. et al.,. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. **Plant disease epidemiology: facing challenges of the 21st Century**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 95–103, 2006.

OSELEBE, H.O.; TENKOUANO, A.; PILLAY, M. Ploidy variation of Musa hybrids from crosses. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.5, n.3, p.1048-1053. 2006.

PASCHOLATTI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 417-453, 1995.

PASSOS, M. A. N. et al. Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. **BMC Genomics**. New York. p. 1-17. 2013.

PERRIER, X. et al. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. 28, p. 1311-1318, 2011.

PORTAL, O. et al. Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*- banana interaction. **Plant Cell Report**, v.30, n.5, p.913-928, 2011.

RODRÍGUEZ, G. et al. Evaluación de algunas variables de la epidermis foliar en três clones de Musa y su relación con resistencia a sigatoka (*Mycosphaerella* sp.). **Revista de la Facultad de Agronomía LUZ**. 35(3): 100 - 105, 2009.

SANTOS, A. F. de Jesus. **Análise da expressão gênica em bananeira cultivada com silício e inoculada com *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense**. 92p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA. 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. et al. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v.30, p.129-137, 2000.

SILVA, S. de O. et al. Cultivares. In: **O Agronegócio da Bananeira**. Volume 1. 1st edition. Edited by Ferreira, C.F.; Silva, S. de O.; Amorim, E.P.; Santos-Serejo, J.A dos. Embrapa Mandioca e Fruticultura. 832 p., 2015.

SILVA, S.O. et al. Melhoramento genético da bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p.693-703, 1998.

SIMMONDS, N. W. The Evolution of the Bananas. London: Longmans, 170p. 1962.

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

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. Volume 10, número 1, p 18-46, 2011.

VALE F. X. R. do, et al. Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro. In: **EPIDEMIOLOGIA aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, p. 91–121, 2004.

VALERIO, R. et al. Anatomia foliar comparada de ocho cultivares de banano com relación a La resistência o susceptibilidad a la Sigatoka (amarilla y negra). **Agronomia Tropical**. 52(4):507-521, 2002.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time for mRNA quantitation. **BioTechniques**. Davis, CA, USA. v.39, n.1, 2005.

YU, T. et al. Analysis of gene expression profiles in response to *Sporisorium reilianum* f. sp. zea in maize (*Zea mays* L.). **Electron. J. Biotechnol.** Valparaíso, Chile vol.17 no.5, 2014.

## ARTIGO 1

### **ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA INTERAÇÃO *Mycosphaerella musicola* (Sigatoka-amarela) COM A BANANEIRA (*Musa* sp.)<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Tropical Plant Pathology, em versão na língua inglesa.

## **Aspectos histológicos da interação *Mycosphaerella musicola* (sigatoka-amarela) com a bananeira (*Musa* sp.)**

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivo estudar as alterações histológicas decorrente do processo infeccioso pelo fungo *Mycosphaerella musicola*, agente causal da Sigatoka amarela, em folhas de bananeira. Foram utilizadas variedades triploides (genoma AAA) contrastantes para resistência à doença, Caipira e Grande Naine, resistente e suscetível, respectivamente. O estudo foi desenvolvido em casa de vegetação onde foram realizadas as inoculações nas folhas número 1 e 2, de 45 plantas de cada cultivar. Amostras das folhas foram coletadas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 120 horas após inoculação (h.a.i.) para processamento histológico, e observações em microscopia de luz e varredura. Sinais do processo de infecção foram observados somente na cultivar Grande Naine a partir de 72 h.a.i e significativamente expressos a partir de 120 h.a.i. A produção de substâncias lipofílicas e compostos fenólicos foram os primeiros sintomas observados no cultivar Grande Naine. O início do rompimento das paredes de algumas das células epidérmicas e subepidérmicas além de uma crescente suberização, indicando a sua susceptibilidade, foram observados. A cultivar Caipira não mostrou sinais de infecção em nenhum dos tempos avaliados. Houve diferença significativa entre as cultivares para análise de densidade estomática, na qual a cultivar Caipira apresentou menor densidade estomática para todos os tempos avaliados. Os resultados obtidos neste estudo nos permite inferir que a densidade estomática pode ser considerada como um mecanismo de resistência no patossistema bananeira x *M. musicola*, e a produção de compostos químicos (Suberina e Compostos Fenólicos), como resposta à infecção do fungo.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos; índice estomático; microscopia eletrônica de varredura; patogênese; suberina.

## **Histological aspects of interaction *Mycosphaerella musicola* (sigatoka-yellow) with the banana (*Musa sp.*)**

**Abstract:** This work had the objective to study the histological changes due to the infectious process by the fungus *Mycosphaerella musicola*, causal agent of Yellow Sigatoka, in banana leaves. Opposite triploid varieties (AAA genome) for resistance to disease, Caipira and Grande Naine, resistant and susceptible, were used, respectively. The study was carried out in a greenhouse where inoculations were performed on leaves number 1 and 2, of 45 plants of each cultivar. Leaf samples were collected at 0, 24, 48, 72 and 120 hours after inoculation (h.a.) for histological processing, and light and scanning microscopy. Signs of the infection process were observed only in the Grande Naine cultivar from 72 h.s.i and significantly expressed from 120 h.ai.i. The production of lipophilic substances and phenolic compounds were the first symptoms observed in the cultivar Grande Naine. The onset of rupture of the walls of some of the epidermal and subepidermal cells in addition to increasing suberisation, indicating their susceptibility, were observed. Caipira showed no signs of infection at any of the evaluated times. There was a significant difference between the cultivars for analysis of stomatal density, in which Caipira showed lower stomatal density for all evaluated times. The results obtained in this study allow us to infer that stomatal density can be considered as a mechanism of resistance in the banana patosystem x *M. musicola*, and the production of chemical compounds (Suberine and Phenolic Compounds), in response to fungus infection.

**Key words:** phenolic compounds; stomatal index; scanning electron microscopy; pathogenesis; suberin.

## INTRODUÇÃO

Uma das principais doenças da cultura da bananeira é a Sigatoka amarela, também conhecida como cercosporiose da bananeira ou mal-da-Sigatoka, causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Leach (forma perfeita) ou *Pseudocercospora musae* (Zimm) Deighton (forma assexuada) (CORDEIRO, 2002). Esta doença é um dos principais problemas para o cultivo da bananeira no Brasil, encontrada em todo território nacional, com redução de produtividade em até 100% (CORDEIRO et al., 2005). A ocorrência da Sigatoka-amarela é fortemente influenciada pelas condições climáticas, principalmente quando se tem a ocorrência de chuva, orvalho e temperatura elevada, que são fundamentais para que haja infecção, produção e consequentemente a disseminação do inóculo (CORDEIRO, et al., 2004).

O fungo *M. musicola* apresenta grande variabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2013), que pode ser aumentada devida a reprodução sexuada do fungo e a utilização de cultivares de bananeira suscetíveis. A alta variabilidade genética do fungo tem sido relatada, culminando na necessidade de maiores estudos da interação deste com a bananeira (CORDEIRO, 1997; CORDEIRO et al., 2001; MOREIRA, et al., 2003; ZANDJANAKOU-TACHIN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). Cultivares de grande importância econômica como a Grande Naine, que pertencente ao grupo Cavendish, apresenta alta suscetibilidade à doença (CORDEIRO et al., 2004). Assim, o entendimento das interações neste patossistema é torna-se de fundamental importância para o desenvolvimento da cultura.

Neste contexto, pode-se destacar os estudo anatômico para o conhecimento das interações deste patossistema, pois permite, além da caracterização histológica, verificar o processo de infecção e interação do patógeno com a planta, auxiliando os programas de melhoramento na busca por cultivares resistentes, que é a melhor estratégia para controlar a doença, tanto economicamente como ambientalmente (PIMENTEL et al., 2010).

A primeira linha de defesa da planta contra patógenos é a superfície da folha, na qual os microrganismos devem se aderir e penetrar para causar a infecção (AGRIOS, 2004). Estudos histológicos permitem a caracterização do



processo de infecção, dentre outros, a partir dos metabólitos produzidos pós-infecção, os quais permitem avaliar as formas de resposta ao patógeno. Algumas características consideradas como possíveis barreiras físicas para o fungo, como o tamanho, a localização e a densidade dos estômatos, e a presença de paredes celulares espessas, já foram descritas em estudos de interação planta-patógeno (CRAENEN et al., 1997; VALERIO et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2006; ARAÚJO et al., 2014).

A produção de compostos fenólicos e a deposição de suberina nas paredes das células, também são descritas como mecanismos de resistência e desempenham função importante juntamente com possíveis barreiras físicas, na resistência contra o ataque de agentes patogênicos. Apesar disso, estudos relacionados à caracterização do processo de infecção em cultivares de *Musa* sp. são escassos, portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o processo de infecção no patossistema *Musa* spp. x *M. musicola* de forma a identificar as barreiras físicas e químicas da bananeira que possam impedir a proliferação do fungo e com isso possibilitar a escolha de genótipos promissores para uso no programa de melhoramento genético da cultura.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material genético**

O estudo foi realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAV) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), na cidade de Cruz das Almas - BA. Foram utilizados dois cultivares, Grande Naine (suscetível) e Caipira (resistente) (CORDEIRO et al., 2004). Plântulas das cultivares foram obtidas a partir de cultura *in vitro*. As plantas foram aclimatizadas em bandejas de isopor em casa-de-vegetação e aos três meses de idade, transferidas para sacos de polietileno contendo mistura de solo, substrato e fibra de coco (2:2:1).

### **Preparo da suspensão do inóculo e coleta de amostras para as análises histológicas**

Foi utilizado o isolado de *M. musicola*, 41MG, proveniente da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, preservado pelo método Castellani (PEIXOUTO et al., 2013). Para indução de esporulação, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a maceração com bastão de vidro, das colônias do isolado de *M. musicola* mantidas em BOD. Em seguida, foram diluídas em água destilada e deionizada, e espalhadas sobre superfícies de placas de Petri contendo meio V8 (150ml/L de suco de vegetais V8 Campbell, 18 g/L de ágar e 2 g/L de carbonato de cálcio, completando com água para um volume de 500mL). As placas foram seladas com filme plástico em  $\frac{3}{4}$  de seu perímetro, e transferidas novamente para BOD, com temperatura ajustada para 28°C e fotoperíodo de 12 hs. Após 10 dias de incubação, adicionou-se 15 mL de água destilada esterilizada sobre as colônias e procedeu-se a liberação dos conídios com pincel, que era passado sobre as colônias com movimentos suaves. Após 15 minutos do pincelamento, a suspensão obtida foi filtrada e quantificada sua concentração em câmara de Neubauer. Com as devidas diluições, ajustou-se a concentração de esporos para  $4 \cdot 10^4$  conídios/mL. Após obtenção da suspensão, procedeu-se às inoculações em 45 plantas de cada cultivar, ambas com seis meses de idade. Em cada planta foram selecionadas as folhas número 1 e 2 e essas inoculadas com a suspensão, na superfície abaxial do limbo, até o ponto de escorrimento (CORDEIRO et al., 2011).

As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação até o término das avaliações. A adubação das plantas seguiu as recomendações para a cultura da bananeira. Logo após a inoculação, as plantas foram irrigadas para manter umidade ideal para desenvolvimento do fungo, manejo que foi realizado duas vezes por dia durante o período de avaliação da doença.

As coletas foram realizadas selecionando amostras no terço médio de cada folha, nos tempos zero, 24, 48, 72 e 120 h.a.i (horas após a inoculação). As amostras foram selecionadas em áreas de transição entre porções sadias e infectadas e em outras, apenas regiões sadias. Em seguida, as amostras foram fixadas em FAA 50 (Formaldeído, Ácido acético e Álcool 50%) (JOHANSEN, 1940), submetidas a vácuo por aproximadamente 12h e, posteriormente, armazenadas em álcool etílico 70%.

## **Microscopia de Luz e Microscopia eletrônica de varredura**

Para microscopia de luz, amostras de folhas das cultivares inoculadas e não inoculadas foram desidratadas em série butílica terciária e infiltradas em parafina histológica (JOHANSEN, 1940). Secções seriadas transversais foram efetuadas em micrótomo rotativo (Leica RM2245) com espessura variável (12-16  $\mu\text{m}$ ), corados com safranina e azul de Astra (GERLARCH, 1969) e as lâminas montadas com resina sintética. As fotomicrografias digitais foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX51 equipado com câmera digital Olympus E330.

Para avaliação em microscópio eletrônico de varredura, amostras das cultivares inoculadas e não inoculadas foram desidratadas em série etílica, secas em aparelho de ponto crítico (Leica EM CPD 030) utilizando Dióxido de Carbono ( $\text{CO}_2$ ) líquido. Em seguida, as amostras foram fixadas em suporte metálico (*stubs*) com fita adesiva dupla face de carbono, metalizadas com ouro, em equipamento Denton Vacuum Desk IV, Moorestown, USA. As observações e eletromicrografias foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-6390LV, no Laboratório de microscopia eletrônica do Centro de Pesquisa Gonçalves Moniz – CPqGM, FIOCRUZ, Salvador – BA.

## **Diafanização**

Para a diafanização, foram utilizadas secções foliares de aproximadamente 2 cm x 2cm. As amostras foram imersas em hidróxido de sódio (NaOH) 5% por 24h e, em seguida lavadas três vezes em água destilada e então submergidas em solução de hipoclorito de sódio contendo 2,5% de cloro ativo por 4 horas. Após o clareamento total das amostras, essas foram coradas com safranina aquosa a 1% e montadas em gelatina glicerinada (JOHANSEN, 1940) entre lâmina e lamínula. A contagem de células epidérmicas e estomáticas para obtenção do índice estomático e densidade estomática, foram realizadas por meio do programa Anati Quanti 2<sup>®</sup> (AGUIAR et al., 2007). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente

casualizado com cinco repetições e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2003).

### **Deteção de compostos fenólicos**

Para deteção de compostos fenólicos gerais, foram utilizados dois testes histoquímicos, o cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) e o dicromato de potássio (GABE, 1968). Para as análises histoquímicas foram selecionadas lâminas da cultivar Grande Naine e Caipira no tempo 120 h.a.i. As lâminas foram montadas com gelatina glicerizada.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização anatômica de folhas das cultivares Grande Naine (Suscetível) e Caipira (Resistente)**

As duas cultivares apresentaram estrutura interna das folhas muito semelhante. Em folhas sadias, a epiderme é unisseriada em ambas as faces, apresentando células com formato irregular e paredes periclinais externas retas e revestidas por cutícula (Figura 1A e E). Embora a cutícula seja atribuída como importante barreira física contra a penetração de patógenos (SILVA et al., 2005), este não se constitui em um mecanismo de importância no caso de *Mycosphaerella musicola*, uma vez que a penetração deste fungo, é via estômato. Todavia, alguns autores afirmam que a penetração via estômato é a via preferencial para os fungos penetrarem para o interior dos tecidos dos seus respectivos hospedeiros em outros patossistemas (RUEHLE, 1964; MOSCOW e LINDOW, 1989).

As folhas da bananeira são anfiestomáticas, com estômatos ocorrendo no mesmo nível das células epidérmicas. Logo abaixo da epiderme de ambas as faces das folhas, ocorre uma camada de células grandes e alongadas no sentido anticlinal, formando uma hipoderme. Esta camada é constituída por células com morfologia tabular, podendo ser relativamente maiores que as

células da epiderme e dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Figura 1A e 1E).

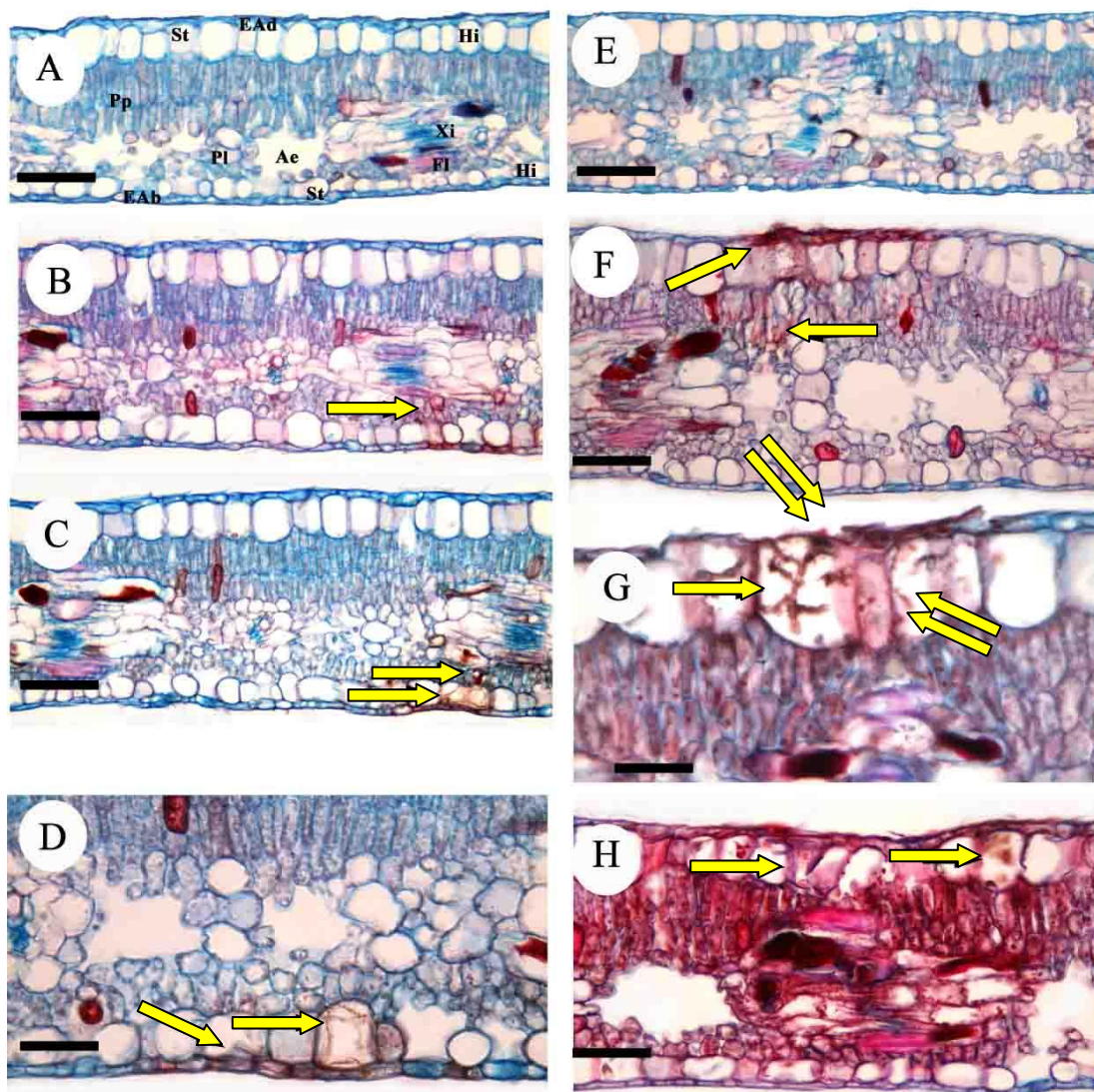
O parênquima paliçádico ocorre apenas na face adaxial, com o parênquima lacunoso restrito à porção abaxial da folha, caracterizando um mesofilo dorsiventral. As células do parênquima paliçádico são tipicamente alongadas, dispostas em arranjo compacto e em fileiras de uma a três camadas de células. O parênquima lacunoso ocupa a metade inferior do mesofilo, sendo formado por células pequenas, com formato irregular, delimitando muitos espaços intercelulares. Essa região também possui grandes espaços intercelulares, delimitando um aerênquima que ocorre imediatamente abaixo do parênquima paliçádico, podendo se expandir até a face abaxial (Figura 1A e 1E).

Os feixes vasculares da bananeira são colaterais fechados, com xilema voltado para a face adaxial e o floema para a face abaxial. Os feixes são circundados por extensão de bainha parenquimática que pode atingir a hipoderme em ambas as faces, conforme Figura 1A. Além dos feixes vasculares, as demais estruturas internas apresentadas pelas folhas das cultivares Grande Naine e Caipira, estão de acordo com Costa et al. (2009), tais como a presença e disposição do parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, hipoderme e aerênquima.

As folhas da bananeira da cultivar Grande Naine apresentaram diferenças em sua anatomia após a infecção pelo fungo *M. musicola* principalmente devido ao processo de produção de compostos químicos. Nesta cultivar, o processo de resposta da planta à infecção do fungo *M. musicola*, se deu principalmente pelo processo de produção de compostos químicos, em especial a deposição de compostos lipofílicos (suberina) (Figura 1B-D e F-H). A cultivar Caipira, por outro lado, não apresentou sinais do processo de infecção (Figura 1E).

Para a cultivar Grande Naine, em zero, 24 e 48 h.a.i, não foi observada nenhuma alteração química ou na estrutura foliar. Contudo, uma vez que a produção de suberina não foi suficiente para inibir a ação do patógeno e assim, sinais do processo de infecção na planta, foram observados a partir de 72 h.a.i (Figura 1 B, C e D), e significativamente expressos em 120 h.a.i (Figura 1 F, G

e H). Isto se deve ao fato de que o processo de infecção pode ocorrer algumas horas após a inoculação, que é o tempo estimado para início do processo de sinalização e consequentemente de defesa da planta.



**Figura 1.** Secções transversais de folha de bananeira da cultivar Grande Naine (A, B, C, D, F, G e H) e Caipira (E). Figuras B, C e D – plantas inoculadas com patógeno em 72 h.a.i. e Figuras F, G e H – plantas inoculadas com patógeno em 120 h.a.i. A = Cultivar Grande Naine, não inoculada; E = Cultivar Caipira, não inoculada. Abreviações: EAd, Epiderme da face adaxial; EAb, Epiderme da face abaxial; St, Estômato; Hi, Hipoderme; Pp, Parênquima Paliçádico; Pl, Parênquima Lacunoso; Fi, Floema; Xi, Xilema e Ae, Aerênquima. Setas indicam tecido suberificado e setas duplas indicam ruptura celular. Barra = 50  $\mu$ m. Cruz das Almas – BA, 2017.

Segundo Cordeiro e Matos (2000), havendo condições necessárias para germinação dos esporos, esta pode acontecer entre 2 a 6 horas, e a infecção poderá ocorrer no espaço de 2 a 6 dias.

A partir de 72 h.a.i., observou-se a ocorrência de tecidos infectados, os quais foram caracterizados pela deposição de suberina nas paredes das células da epiderme, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e hipoderme (Figura 1B, C e D). Nesse período, as mudanças observadas correspondem somente à deposição desse componente químico, não sendo encontradas outras alterações no padrão anatômico, tais como alteração no número de camadas de células, formato e organização das células epidérmicas ou parenquimáticas.

Segundo Silva *et al.* (2005), os tecidos parenquimáticos podem apresentar resistência a patógenos, podendo ser atribuída a organização e as características das células. Nesse sentido, é possível notar que cultivares da mesma espécie podem apresentar resultados diferentes quanto à resistência aos microrganismos, devido à densidade, compactação e espessura da parede das células do parênquima paliçádico (PRABHPREET *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005).

A partir de 120 h.a.i. (Figura 1F, G e H), nota-se que houve uma maior deposição dos compostos relacionados ao processo de infecção quando comparado às folhas avaliadas em 72 h.a.i. (Figura 1B, C e D), e também, observou-se o processo de lise celular (Figura 1G). Em nenhum tempo analisado foi observada colonização em tecido vascular.

Além dessas alterações estruturais, notou-se uma crescente suberização das células epidérmicas e hipoderme (Figura 1F, G e H). A síntese de suberina é resultante do mecanismo de resistência estrutural pós-formado, em que as células sadias localizadas na periferia da lesão modificam seu metabolismo, produzindo grande quantidade de suberina, podendo paralisar a atividade biológica. Esse processo limita o avanço do patógeno e não há fluxo de toxinas e enzimas do patógeno para os tecidos sadios da planta (AGRIOS, 2005), assim, ela oferece a primeira linha de defesa contra ataque patogênico.

Sabe-se que a resistência da planta a determinados agentes patogênicos é desencadeada por diversos fatores biológicos responsáveis pela

ativação de determinados genes de resistências. Possivelmente, a ativação de genes responsáveis pela produção de suberina é tardia para a cultivar Grande Naine, e devido ao seu alto grau de suscetibilidade, ficou demonstrado que a produção de suberina não foi suficiente para impedir o avanço do patógeno. Segundo Agrios (2005), quando o hospedeiro não possui resistência ou exibe resistência incompleta, aparentemente, o hospedeiro, com, ou sem interferência por secreções fúngicas, não consegue produzir compostos, ou produz muito lentamente para ser eficaz, e o fungo consegue invadir a célula.

A cultivar Caipira, por outro lado, mostrou-se resistente ao patógeno, o que ficou demonstrado nas observações das secções transversais das folhas infectadas em todos os tempos avaliados, onde não foi verificado processo de infecção, nem por componentes químicos pós-formados, nem por rupturas de paredes celulares, como evidenciado para a cultivar Grande Naine.

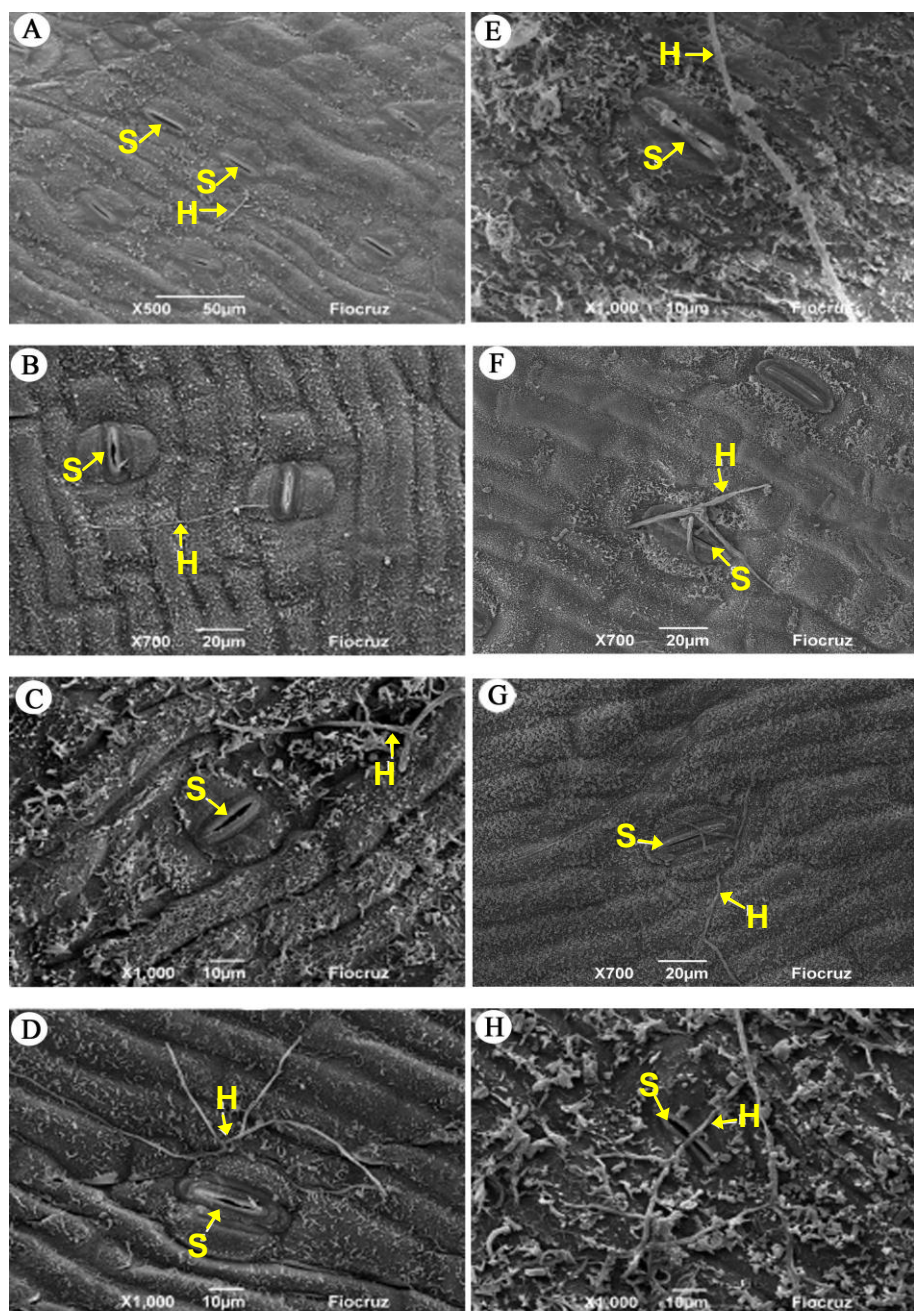
Em microscopia eletrônica de varredura, ambas as cultivares, Grande Naine e Caipira, apresentaram hifas sobre a superfície das folhas a partir das 24 h.a.i. (Figura 2). As hifas direcionaram-se para os estômatos mais próximos (Figura 2), porém, seu crescimento foi observado sobre células estomáticas a partir de 48 h.a.i., somente para a cultivar Grande Naine (Figura 2F, G e H).

Na cultivar Caipira, as hifas não apresentaram crescimento sobre células estomáticas em nenhum dos tempos observados (Figura 2B, C e D), sendo que nas 72 h.a.i, hifas foram encontradas lateralmente às células guardas do estômato, mas em direção contrária ao interior da cavidade subestomática, indicando, possivelmente, ausência de quimiotropismo (Figura 2D). Evento semelhante também foi apontado para *Ramularia areola*, *Puccinia sorghi* e *Septoria silybi*, em folhas de algodoeiro, folhas de sorgo (*Sorghum bicolor*) e cardo mariano (*Silybum marianum*), respectivamente (MOSCOW; LINDOW, 1989; CURVELO et al., 2010).

Como observado nas secções transversais de microscopia de luz, sinais de infecção foram observados a partir das 72 h.a.i. Resultado semelhante foi observado por Passos et al. (2013) em estudo da interação *Musa acuminata* x *M. musicola*, onde observou-se que tubos germinativos e hifas foram visíveis 3 dias após a inoculação (DAI), com crescimento de hifas sobre células estomáticas e penetração das hifas em Cavendish Grande Naine, ocorrendo



somente 6 DAÍ, e também não foi observado crescimento de hifas e penetração no cultivar resistente (Cacutta-4).



**Figura 2.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para observação da interação de *Mycosphaerella* da superfície abaxial de folhas dos cultivares de bananeira Caipira (A, B, C e D) e Grande Naine (E, F, G e H). Figuras A, B, C e D – Cultivar Caipira em 24, 48, 72 e 120 h.a.i, respectivamente. Figuras E, F, G e H – Cultivar Grande Naine em 24, 48, 72 e 120 h.a.i, respectivamente. Abreviações: h.a.i., horas após a inoculação; H, hifa; S, estômato. Cruz das Almas - BA, 2017.

Emediato et al. (2013) também observaram que a colonização de hifas e penetração por estômato ocorreu 6 dias após a inoculação para o mesmo patossistema.

Portanto, os dados do nosso trabalho corroboram com as informações de que a penetração do fungo *Mycosphaerella musicola* se dá via estômatos, ocorrendo normalmente em um tempo médio de 72h após a inoculação. Nesse sentido, nota-se que não basta a observação de hifas sobre o material vegetal, mas um período suficiente para que ocorra a penetração via estômatos, culminando com o processo de infecção, que é mostrado pelas alterações químicas e anatômicas discutidas anteriormente.

Nenhum sintoma foi observado para a cultivar Caipira, o que remete a presunção de que existem diferentes mecanismos de resposta entre a cultivar resistente e suscetível, provavelmente, relacionada à fase de pré penetração. Podem também estar envolvidos mecanismos de defesa pré-formados, como o período de abertura dos estômatos, pois o patógeno pode apresentar dificuldades pelo retardamento da abertura dos estômatos pela manhã, ocorrendo ressecamento do tubo germinativo frustrando a tentativa de penetração (PASCHOLATI e LEITE, 1995), fato que pode ser observado nos resultados para a cultivar Caipira, que apresentou crescimento de tubos germinativos próximo aos estômatos sem penetrá-los (Figura 2A, B, C e D). Além disso, dependendo da quantidade de estômatos, do tamanho e do período de abertura, os patógenos podem ter dificuldade para serem bem sucedidos no processo de penetração e estabelecimento de relações parasitárias estáveis (STARGLIN, 2011). A relação entre o processo infeccioso e a penetração via estômato de alguns fungos causadores de doenças foliares é complexa e ainda pouco compreendida. Portanto, para se obter um conhecimento claro sobre o mecanismo de resistência da cultivar resistente Caipira, estudos adicionais precisam ser realizados.

Para a densidade estomática da face abaxial na cultivar Grande Naine, verificou-se que os tempo 24 h.a.i (105,31 estômatos/mm<sup>2</sup>) e 48 h.a.i (96,36 estômatos/mm<sup>2</sup>), apresentaram as maiores densidades estomáticas. Em contrapartida, o tempo 72 h.a.i. (57,12 estômatos/mm<sup>2</sup>) apresentou o menor valor desta variável. A cultivar Caipira apresentou maior densidade estomática

para os tempos 48 h.a.i (36,73 estômatos/mm<sup>2</sup>) e 72 h.a.i (35,29 estômatos/mm<sup>2</sup>), e a menor densidade estomática observada foi para o tempo 120 h.a.i. (27,91 estômatos/mm<sup>2</sup>) e 24 h.a.i (31,35 estômatos/mm<sup>2</sup>) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Índice estomático da face abaxial (I.D.) e Densidade estomática da face abaxial (D.E.) em amostras foliares de duas cultivares de bananeira, Caipira e Grande Naine, inoculadas com *Mycosphaerella musicola* cultivadas em casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA, 2017.

Tempo	Caipira I.D. (%)	Grande Naine I.D. (%)	Caipira D.E. est.mm <sup>-2</sup>	Grande Naine D.E. est.mm <sup>-2</sup>
24 h.a.i.	19,70bA	61,37aA	31,35bB	105,31aA
48 h.a.i.	20,78bA	45,38aB	36,73bA	96,36aA
72 h.a.i.	27,43aA	19,36bD	35,29bA	57,12aB
120 h.a.i.	16,76bA	31,34aC	27,91bB	64,17aB
<b>Média</b>	21,17	39,36	32,82	80,74

As médias seguidas dentro das linhas e colunas, respectivamente, pelas mesmas letras minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). I.D. = Índice estomático; D.E = Densidade estomática.

Como pode ser observado, os resultados deste estudo demonstram que a densidade estomática pode estar relacionada com a penetração do patógeno, pois a cultivar Caipira apresentou as menores densidades estomáticas para todos os tempos de avaliação (Tabela 1).

Estudos foram desenvolvidos considerando a existência de possíveis barreiras físicas para o fungo causador de *Mycosphaerella musicola* relacionados à anatomia foliar, principalmente para quantidade e tamanho dos estômatos (AGUILAR e SMITS, 1997; CRAENEN et al., 1997; VALERIO et al., 2002; GARCÍA et al., 2004; HERNANDEZ et al., 2006). De acordo com Rodriguez et al. (2009), a densidade estomática é uma das variáveis mais importantes para determinar a resistência ou a susceptibilidade à Sigatoka amarela. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que houve diferença significativa da densidade estomática entre as cultivares, tendo a cultivar Grande Naine apresentado maior densidade estomática com relação à

cultivar Caipira. Contudo, a cultivar Grande Naine apresentou uma redução na D.E. ao longo do tempo da interação (Tabela 1). Entretanto, Araujo et al. (2014) relataram um aumento da D.E. para a cultivar Grande Naine no mesmo patossistema. Esses autores mencionam que a infecção causada por *M. musicola* reduziu significativamente a D.E. para os genótipos de bananeira avaliados, com exceção da Grande Naine, avaliada também como suscetível, e BRS Platina (resistente à Sigatoka amarela).

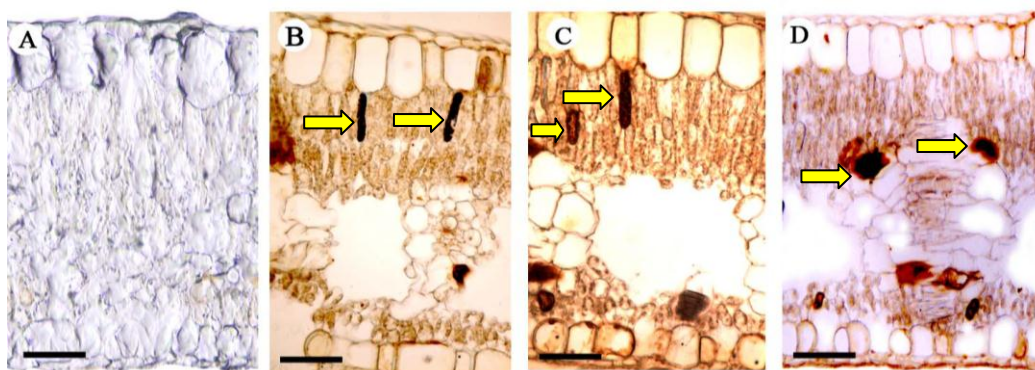
Certamente a menor densidade estomática da cultivar Caipira observada neste estudo, pode ser uma estratégia que as plantas desenvolveram para evitar a penetração e conseqüentemente o desenvolvimento do fungo, pois a penetração ocorre via estômatos (Tabela 1).

Estes resultados evidenciam que outros mecanismos de resistência devem contribuir para a resistência. Araújo et al. (2014) concluíram que houve alterações na anatomia foliar da bananeira quando inoculadas com *M. musicola*, principalmente para espessura da folha e o número e tamanho dos estômatos. Estes autores consideram que as alterações anatômicas podem afetar tanto a atividade fotossintética quanto o grau de resistência dos genótipos de bananeira.

Diferenças entre os índices estomáticos foram detectadas. Houve diferença significativa entre as cultivares para todos os tempos (Tabela 1). Para o índice estomático da cultivar Grande Naine, a 24 h.a.i (61,37%) e 72 h.a.i. (19,36%) apresentaram a maior e menor porcentagem, respectivamente. A cultivar Caipira não apresentou diferença significativa para os índices estomáticos. Houve diferença significativa entre as cultivares para todos os tempos (Tabela 1). De acordo com Salisbury (1927), o índice estomático é relativamente constante para uma espécie em particular. Assim, esta pode ser uma característica importante para a caracterização de cultivares, considerando também que o período após o processo de diferenciação celular, não ocorra alteração nessa característica.

### Testes histoquímicos

A cultivar Grande Naine apresentou resultado positivo tanto para o teste com dicromato de potássio, quanto para o cloreto férrico (Figura 3B, C e D), evidenciando que o conteúdo presente nas células do parênquima paliçádico e parênquima lacunoso decorrente do processo infeccioso, são compostos fenólicos. Observou-se que a quantidade de compostos fenólicos aumentou gradativamente ao longo do tempo da interação, sendo mais evidente no tempo 120 h.a.i. Por outro lado, a cultivar Caipira apresentou teste negativo para compostos fenólicos.



**Figura 3.** Secções transversais de folhas de bananeira da variedade Grande Naine inoculadas com *M. Musicola* 120 h.a.i. A = Controle. B e C = Teste histoquímico com cloreto ferrécico e D= Teste histoquímico com Dicromato de Potássio. Setas indicam produção de compostos fenólicos. Barra 40 μm. Cruz das Almas – BA, 2017.

Compostos fenólicos são bem conhecidos como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas (LO et al., 2008), produzindo efeitos inibitórios na germinação de esporos, crescimento micelial e produção/atividade de enzimas microbianas, os quais podem variar a depender dos diferentes grupos de fenóis. Dessa forma, os compostos fenólicos podem estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; NICHOLSON, 1995), relacionados à proteção da planta contra o ataque de animais e microrganismos, estando presentes nos vacúolos, citoplasma ou na parede celular de quase todos vegetais (ESAU, 1985).

Sabe-se que o grau de envolvimento dos fatores estruturais e bioquímicos nas respostas de resistência da planta varia de acordo com o patossistema e, num mesmo patossistema, varia ainda de acordo com a idade da planta hospedeira, do órgão e/ou tecido afetado, do estado nutricional e das condições ambientais. Embora tenha sido evidenciada a presença de compostos fenólicos como resposta a infecção pelo patógeno na cultivar Grande Naine, a produção dessas substâncias pode não ter sido um mecanismo de defesa suficiente para designar resistência para interação bananeira x *M. musicola* e evitar os danos causados. Isto indica que a cultivar é susceptível ao patógeno, sendo necessária a associação com outros mecanismos de defesa para uma efetiva resistência da planta ao patógeno. Com estes resultados ficou claro que a cultivar Caipira apresenta outros mecanismos de resistência que precisam ser investigados.

### CONCLUSÕES

A cultivar Caipira apresenta menor densidade estomática quando comparada à Grande Naine.

Em Grande Naine o tempo 120 h.a.i. foi quando se observou o maior grau de infecção.

A cultivar Grande Naine apresentou produção de compostos químicos (Suberina e Compostos Fenólicos), como resposta à infecção do fungo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. Parasitism and disease development. In: Agrios GN. **Plant Pathology**. USA: Elsevier Academic Press. pp 77-104, 2004.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: *Academic press*. 635p, 2005.

AGUILAR, R.; SMITS, G. Estructuras anatómicas en hojas de *Musa spp.* que sirven como defensa contra la sigatoka amarilla. **XV Congreso Venezolano de Fitopatología**. Sociedad Venezolana de Fitopatología. pp. 27-28, 1997.

- ARAUJO, A.G. et al. Host–pathogen interactions of *Musa* spp. and *Mycosphaerella musicola* with epidemiological variables and leaf anatomy within the pathosystem of Yellow Sigatoka disease. **Australian Journal of Crop Science**, 2014.
- CORDEIRO, Z.J.M. Doenças. In: ALVES E. J. (Org.). **A Cultura da Banana Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa. Cap. 13, p. 353-408, 1997.
- CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P. de. *Doenças fungicas e bacterianas*. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Coord.). **Banana: Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia. p. 36-65. (Frutas do Brasil, 08), 2000.
- CORDEIRO, Z.J.M. et al. O mal-de-sigatoka da bananeira. Embrapa mandioca e Fruticultura. p. 1-8. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. **circular técnica, 44**), 2001.
- CORDEIRO, Z.J.M. Folha sob ataque. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**. abril/maio, pag. 15-18, 2002.
- CORDEIRO, Z.J.M. et al. Doenças e métodos de controle. In **O Cultivo da Bananeira**, Volume 1. 1st edition. Edited by Borges AL, Souza LS. Cruz das Almas: Nova Civilização: Cruz das Almas: Nova Civilização. 146–182p, 2004.
- CORDEIRO, Z.J.M. et al. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: Kimati, H., Amorin, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 2005. p. 99-117, 2005.
- CORDEIRO, Z.J.M. et al. *Metodologias para manuseio de Mycosphaerella musicola em laboratório*. **Documentos/Embrapa Mandioca e Fruticultura, Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, 32, 2011.
- COSTA, F.H.S. et al. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p386-392, mar-abr, 2009.
- CRAENEN, K. et al. The role of stomatal traits and epicutical wax in resistance to *Mycosphaerella fijiensis* in banana and plantain (*Musa* sp.). **Tropicultura**. 15:136-140, 1997.
- CURVELO, C.R.S. et al. Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology** 35 (2) March - April 2010.

- EMEDIATO, F.L. et al. Analysis of Expression of NBS-LRR Resistance Gene Analogs in *Musa acuminata* during Compatible and Incompatible Interactions with *Mycosphaerella musicola*. **Acta Horticulturae**. 986, 2013.
- ESAU, K. **Anatomía vegetal**. 3rd ed. Omega, Barcelona, 1985.
- FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.0 (Build 67). Lavras: DEX/UFLA, 2003.
- GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson & Cie. 1113 p, 1968.
- GARCÍA, E. et al. Aspectos morfoanatômicos y moleculares de la infección *in vitro* de plantas de plátano cv. Hartón (AAB) por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. In: OROZCO, M.; OROZCO, J.; ROBLES, M.; VELÁZQUEZ, J.; MEDINA, V.; HERNÁNDEZ, J. (Eds.). **XVI reunión internacional de la asociación para la cooperación en investigaciones de bananos en el caribe y la américa tropical**. Oaxaca, México. p. 217, 2004.
- GERLARCH, D. **Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung**. Stuttgart: Georg Thieme, 311p, 1969.
- HERNÁNDEZ, Y. et al. Densidad estomática en materiales de plátano (*Musa* AAB, AAAB y ABB) susceptibles y resistentes a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet). **Revista de la Facultad de Agronomía LUZ**. 23(3):294-300, 2006.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill. 523p, 1940.
- LO, L.C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.49, p.21-31, 2008.
- MOREIRA, R.F.C. et al. Caracterização genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por marcadores RAPD. **Summa Phytopathologica**, v. 29 n. 3, p. 275-277, 2003.
- MOSCOW, D.; LINDOW, S.E. Infection of milk thistle (*Silybum marianum*) leaves by *Septoria silybi*. **Phytopathology** 79:1085-1090, 1989.
- NICHOLSON, R.L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**. v.21, p.95-99, 1995.
- NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopatology**. v.30, p.369-389, 1992.
- OLIVEIRA, J.R. et al. Diversidade genética de isolados de *Mycosphaerella*



*musicola* obtidos de bananais do norte de Minas Gerais, Brasil por meio de marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.43, n.1, jan, 2013.

PEIXOUTO, Y. S. **Estrutura genética de isolados do fungo causador da sigatoka amarela em bananeira**. 69p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA. 2013.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. Pp. 417-453. In: BERGAMINI-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. v.I. Princípios e Conceitos, 3 ed. São Paulo, Agronômica Ceres Ltda, 1995.

PASSOS, M.A.N. et al. Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. **BMC Genomics**. Feb 5;14(1):78, 2013.

PIMENTEL, R.M.A. et al. Qualidade pós-colheita dos genótipos de banana PA 42-44 e Prata-Anã cultivados no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 32(2):407-413, 2010.

PRABHPREET, I. et al. Mesophyll characteristics of muskmelon leaf in relation to resistance/susceptibility to downy mildew. **Plant Disease Research** 15(1): 18-23, 2000.

RODRÍGUEZ, G. et al. Evaluación de algunas variables de la epidermis foliar en três clones de *Musa* y su relación con resistencia a sigatoka (*Mycosphaerella* sp.). **Revista de la Facultad de Agronomía LUZ**. 35(3): 100 - 105, 2009.

RUEHLE, G.D. A strain of *Alternaria citri* Ellis & Pierce causing a leaf spot of rough lemon in Florida. **Phytopathology**. 27:863-865, 1964.

SALISBURY, E.J. On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences**, vol. 216, p. 1-65, 1927.

SILVA, L.M. et al. Inter-relações entre anatomia vegetal e produção vegetal. **Acta botânica brasílica**. v.19, n. 1, p.183-194, 2005.

STANGARLIN, J.R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. Volume 10, número 1, p 18-46, 2011.

VALERIO, R. et al. Anatomia foliar comparada de ocho cultivares de banano com relação a La resistência o susceptibilidad a la Sigatoka (amarilla y negra). **Agronomia Tropical**. 52(4):507-521, 2002.

WILKINSON, H. P. The plant surface (mainly leaf) In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Systematic anatomy of the leaf

and stem, with a brief history of the subject. Oxford: Clarendon Press, v. 1, p. 97-165. 1979.

ZANDJANAKOU-TACHIN, M. et al. Identification and genetic diversity of *Mycosphaerella* species on banana and plantain in Nigeria. **Plant Pathology**, 58, 536–546, 2009.

## ARTIGO 2

# EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES DE RESISTÊNCIA VIA RT-qPCR NO PATOSSISTEMA BANANEIRA X *Mycosphaerella musicola*<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao comitê editorial do periódico científico Genetics and Molecular Research, em versão na língua inglesa

## **Expressão gênica de genes de resistência via RT-qPCR no patossistema bananeira x *Mycosphaerella musicola***

**RESUMO:** O objetivo do presente estudo foi quantificar a expressão de genes de resistência por RT-qPCR ao longo do tempo durante a interação *Musa* spp. x *Mycosphaerella musicola*. Foram utilizadas duas cultivares de bananeira contrastantes para resistência à Sigatoka amarela, Caipira (resistente) e Grande Naine (suscetível). As folhas 1 e 2 das cultivares foram inoculadas com isolado virulento de *M. musicola* na concentração de  $4 \times 10^4$  conídios/ml. Amostras de tecidos inoculados e não inoculados de ambas as cultivares foram coletadas nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i). Foram avaliados 18 pares de primers específicos obtidos da análise de RNAseq (Illumina High-seq2000) e destes, apenas dois foram selecionados por apresentarem apenas um produto de amplificação e altos valores de expressão diferencial: os genes proteína quinase e proteína quinase 2 associada a parede (WAK2), esse último, relacionado a estímulos ambientais. Foi verificada a indução significativa do gene proteína quinase em todos os tempos avaliados em bananeira Grande Naine. Para o genótipo Caipira, houve repressão em todos os tempos avaliados. O gene WAK2 foi induzido com 24 e 48 h.a.i após desafio com *M. musicola* e reprimido após 72 h.a.i. para o genótipo Grande Naine e o genótipo Caipira apresentou repressão em todos os tempos avaliados. Assim, os resultados sugerem que possivelmente, o gene WAK2, por estar envolvido com função “de receptor de sinal na parede celular”, pode estar favorecendo ao recebimento de sinais do fungo (efetores) e iniciando o rompimento da parede celular, facilitando ainda mais a penetração do fungo e causando a proliferação da doença em Grande Naine (suscetível), processo que não ocorreu em Caipira, possivelmente, conferindo-lhe a resistência.

**Palavras-chave:** Sigatoka amarela; genes de defesa; *Musa* sp.; PCR em tempo real.

**Gene expression of resistance genes by RT-qPCR in the bananas  
patosystem x *Mycosphaerella musicola***

**Abstract:** The aim of the present study was to the quantification of RT-qPCR resistance gene expression over time during the *Musa spp.* X *Mycosphaerella musicola*. Two contrasting banana cultivars were used for resistance to yellow Sigatoka, Caipira (resistant) and Grande Naine (susceptible). Leaves 1 and 2 of the cultivars were inoculated with virulent *M. musicola* isolate at the concentration of  $4 \times 10^4$  conidia / ml. Samples of inoculated and uninoculated tissues of both cultivars were collected at times 24, 48 and 72 hours after inoculation (h.a.i.). We evaluated 18 pairs of specific primers obtained from the RNAseq (Illumina High-seq2000) analysis, of which only two were selected because they presented only one amplification product and high values of differential expression: protein kinase and protein kinase 2 associated with wall (WAK2), the latter, related to environmental stimuli. Significant induction of the protein kinase gene was verified at all times evaluated in Grande Naine banana. For the Caipira genotype, there was repression at all evaluated times. The WAK2 gene was induced at 24 and 48 h.a.i after challenge with *M. musicola* and repressed after 72 h.a. For the Grande Naine genotype and the Caipira genotype presented repression at all evaluated times. The results suggest that possibly the WAK2 gene, because it is involved with the function of "signal receptor on the cell wall", may be favoring the reception of signals from the fungus (effectors) and initiating the rupture of the cell wall, facilitating even more The penetration of the fungus and causing the proliferation of the disease in Grande Naine (susceptible), a process that did not occur in Caipira, possibly conferring resistance.

**Key words:** Yellow Sigatoka; defense genes; *Musa sp.*; Real-time PCR.

## INTRODUÇÃO

A bananeira é cultivada na maioria dos estados brasileiros, sendo uma importante fonte de renda, principalmente, para pequenos e médios agricultores. Destaca-se como a fruta mais produzida no mundo, com uma produção de 107 milhões de toneladas. O Brasil produz cerca de sete milhões de toneladas, com participação de 6,5% nesse total (FAO, 2016).

A doença conhecida como Sigatoka amarela que tem como agente etiológico o fungo *Mycosphaerella musicola* (CORDEIRO et al., 2000), é uma das mais destrutivas doenças foliares em bananeira e encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras de banana do Brasil, provocando consideráveis prejuízos na produção de frutos (FOURÈ, 1994) cujos danos podem chegar à ordem de 100% da produção (KON et al., 2008).

Medidas que visam atenuar as perdas causadas pela Sigatoka amarela são tomadas como fundamentais para a produção em determinadas áreas. Práticas culturais e a utilização de controle químico são normalmente as medidas mais utilizadas, mas a bananicultura passa a não ser rentável para o produtor devido ao alto custo gerado, além do aumento dos riscos ambientais e para saúde. Diante desta situação, o uso de cultivares resistentes que apresentem alta produtividade e qualidade dos frutos, torna-se a melhor alternativa de controle.

A produção de cultivares resistentes se faz mediante a utilização de melhoramento convencional, entretanto, o desenvolvimento dessas cultivares apresenta alguns entraves como a natureza poliploide e a baixa fertilidade (BAKRY et al., 2009), dificultando o melhoramento da bananeira, onde a seleção de genes de resistência via melhoramento genético torna-se uma abordagem alternativa.

Nesse sentido, estudos de expressão gênica constituem numa importante estratégia para entender processos relacionados à interação planta-patógeno. Estudos de análise global de transcriptomas para analisar a expressão gênica, como o RNA-seq, que envolve o sequenciamento em larga escala de pequenos fragmentos de transcritos empregando sequenciamento de nova geração, associado à disponibilidade do sequenciamento do genoma da

bananeira, permitiram identificar alguns principais genes envolvidos na resistência e defesa da bananeira mediante a interação *Musa* spp. x *M. musicola* (PASSOS et al., 2013).

A utilização de técnicas biotecnológicas, como PCR quantitativo nos programas de melhoramento auxiliando a obtenção de novas cultivares resistentes torna-se cada vez mais atrativa e mais frequente. Com a utilização da técnica de PCR quantitativo, a expressão de determinados genes em diferentes patossistemas pode ser mensurada e permitir a seleção de genes candidatos para futuros processos de transformação genética. Assim, o conhecimento dos genes envolvidos na resistência e o nível de expressão destes em interações compatíveis de bananeira x *M. musicola*, são importantes para desenvolvimento de cultivares resistentes. Contudo, poucos estudos sobre quantificação da expressão gênica por RT-qPCR em bananeira foram relatados (LI et al., 2012; CHEN et al., 2012; WANG et al., 2012; MAHDAVI et al., 2012, PASSOS et al, 2013). Assim, o objetivo do presente estudo foi quantificar a expressão de genes de resistência por RT-qPCR ao longo do tempo durante a interação *Musa* spp. x *Mycosphaerella musicola*

## MATERIAL E MÉTODOS

### Bioensaio

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Avançada (NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, na cidade de Cruz das Almas - BA. Foram utilizados dois cultivares, Grande Naine (suscetível) e Caipira (resistente) (CORDEIRO et al., 2004), obtidos a partir de cultura *in vitro*. Após o recebimento, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos de 28 x 15 cm, contendo uma mistura de solo superficial, esterco bem curtido e fibra de coco (2:1:2), e mantidas em casa de vegetação a 25°C durante 6 meses.

Para indução de esporulação, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a maceração com bastão de vidro, das colônias do isolado de *M. musicola*

mantidas em BOD. Em seguida, foram diluídas em água destilada e deionizada, e espalhadas sobre superfícies de placas de Petri contendo meio V8 (150ml/L de suco de vegetais V8 Campbell, 18 g/L de ágar e 2 g/L de carbonato de cálcio, completando com água para um volume de 500mL). As placas foram seladas com filme plástico em  $\frac{3}{4}$  de seu perímetro, e transferidas novamente para BOD, com temperatura ajustada para 28°C e fotoperíodo de 12 hs. Após 10 dias de incubação, adicionou-se 15 mL de água destilada esterilizada sobre as colônias e procedeu-se a liberação dos conídios com pincel, que era passado sobre as colônias com movimentos suaves. Após 15 minutos do pincelamento, a suspensão obtida foi filtrada e quantificada sua concentração em câmara de Neubauer. Com as devidas diluições, ajustou-se a concentração de esporos para  $4.10^4$  conídios/mL. Após o preparo das suspensões, procedeu-se a inoculação na superfície abaxial das folhas número 1 e 2, até o ponto de escorrimento (CORDEIRO et al., 2011).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 45 plantas para cada cultivar, sendo constituído por dois tratamentos, cultivar inoculada e não inoculada com o patógeno. Amostras foliares de aproximadamente 1 g de cada genótipo foram coletadas nos tempos 24, 48 e 72 h.a.i. (horas após a inoculação), sendo que para cada tempo de coleta, foram utilizadas: três amostras foliares de plantas inoculadas com o patógeno; três não inoculadas; 15 plantas inoculadas e 10 plantas não inoculadas (água estéril) como controles para avaliação dos sintomas da doença ao longo dos tempos. As amostras foram alocadas em papel alumínio, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o processamento posterior.

### **Extração de RNA**

O RNA total foi extraído de amostras foliares dos cultivares inoculados e controles ao longo do tempo na interação bananeira x *Mycosphaerella musicola*, utilizando 200 mg de tecido seguindo o protocolo de Gambino *et al.* (2008), e a quantificação realizada utilizando gel de agarose 1% (p/v). O RNA total foi tratado com DNase, TURBO DNA-free™ DNase Treatment- Ambion®,



seguindo especificações do fabricante, e a concentração e qualidade do RNA tratado, realizada no espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o RNA total tratado com DNase de acordo com as recomendações do fabricante do kit (*High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied biosystems), quantificados em espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e armazenados em ultrafreezer (-80 °C).

### **Escolha e desenho de primers**

Foram desenhados 18 pares de primer específicos utilizado o software *Primer Express® Version 3.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências foram obtidas de dados prévios, oriundos do sequenciamento via técnica de RNA-Seq (Helixxa – Illumina HighSeq 2000 – TruSeq) que gerou 30 G de dados a partir de 8 bibliotecas da interação *Musa x M. musicola*. A bioinformática contou com o apoio do CENARGEN (Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia), Brasília-DF e a Embrapa CNPTIA – Campinas, SP (FERREIRA et al., 2016). As sequências de primers testados com êxito encontram-se listadas na Tabela 1.

A análise da expressão gênica foi realizada em amostras foliares dos tratamentos a 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Foram utilizados os genes 25S e Tubulina como genes de referência, considerados ideais para normalização da expressão gênica em *Musa* (PODEVIN et al., 2012) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica de genótipos e bananeira provenientes da interação *Musa* spp. x *M. musicola* via RT-qPCR. Cruz das Almas – BA, 2017.

ID	Gene	Descrição	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
GSMUA_Achr9 T28030_001	MUSA 1	Putative Disease resistance protein RPM1	F:TCATAGACAAGCGCAACCTG R: AGTCATTGCATGCGTTTCTG	150
GSMUA_Achr4 T18230_001	MUSA 2	Putative Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	F:TAACGGAGAAGTGCGATGTG R:GGCTGTGGTTATCTCCTCCA	185
GSMUA_AchrUn_randomT233 80_001	MUSA 3	Protein kinase domain containing protein, expressed	F: CAGTGGTGGATTTGTTGTGC R: TACGGGAATTCCATTGGGTA	250
GSMUA_Achr3 T17410_001	MUSA 4	Putative Probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	F:GGAAGTCGCCAGTAATCCAA R: AGAACAGGTACGCGCTGTCT	242
GSMUA_Achr1 T09200_001	MUSA 5	Putative Wall-associated receptor kinase 2	F: ACGTCATTGGCATCGTCATA R: GTCGGCAACGAAGGTA AAAAG	230
GSMUA_Achr7 T16090_001	MUSA 6	Putative Probable WRKY transcription factor 40	F: TGTTGCCTGCACAAGTCTTC R: ATACCCATCCTTCACCACCA	247
GSMUA_Achr1 0T27930_001	MUSA 7	ABC transporter C family member 8	F: TCTCGGATGGAAGCCATATC R:CGAGTCCATGAGAGAGGAG	176
GSMUA_Achr2 T16490_001	MUSA 8	Putative Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	F: GTTCTTGGCGGTAGCTCTG R: TGCGAGATCCATTAGGGAAG	228
GSMUA_Achr9 T28030_001	MUSA 9	Putative Disease resistance protein RPM1	F: AAGGAGCTCAGGAGCATTCA R: ACACCAGTGCATGAGCGTAG	157
GSMUA_AchrUn_randomT034 50_01	MUSA 10	Putative LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	F: ACCATCTGGTGTCAACTCC R: AGGTCCAAAATCCCATCACA	203
GSMUA_AchrUn_randomT272 60_001	MUSA 12	Putative Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	F: TTAAGTAGCGGCAAGGTGCT R: TCCCAGACTTCTCTCTCCA	201
GSMUA_Achr7 T20770_001	MUSA 13	Chitinase-like protein 1	F: AAGCCCACAAAGAACGACAC R: CTCCCATCAGGTCCAGGTAA	154
GSMUA_Achr4 T26160_001	MUSA 14	Putative disease resistance protein RGA3	F: TACAGAGCCCGATCATTTC R: ACTGCCACACTTTCATTCC	161
GSMUA_Achr5 T15040_001	MUSA 15	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1	F: GTCGTGGTACATTGGGCTTT R: GCAGATCCAAAGGAATCCAA	155
GSMUA_Achr2 T16490_001	MUSA 16	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	F: GATGGACTGACCTCGGTTGT R: CAACTCAAGCGCAGAAATGA	221
<i>TUB*</i>	MUSA 17	Beta Tubulina	F: TGTTGCATCCTGGTACTGCT R:GGCTTTCTTGC ACTGGTACAC	112
25S	MUSA 18	25S rRNA	R: ACATTGTCAGGTGGGGAGT F: CCTTTTGTCCACACGAGATT	106

\*Genes de referência.

Para validação dos cDNAs e validação dos iniciadores, foi realizado um PCR convencional para todas as amostras de cDNA. Para tanto, utilizou-se um mix para reação final de 20µl, contendo: H<sub>2</sub>O Mili-Q autoclavada; 1 U da enzima Taq DNA Polimerase (Fermentas) 5 U/µl em tampão apropriado; 0,2

$\mu\text{M}$  de cada iniciador (*forward* e *reverse*); 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM de dNTPs e 1  $\mu\text{l}$  de cDNA na diluição 1:200 (v:v).

Para o controle negativo, foi pipetado 1  $\mu\text{l}$  de água ultrapura autoclavada ao invés do cDNA, e para o controle positivo foi utilizado um DNA de banana. O produto das amplificações foi verificado em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x corado com brometo de etídio.

### **Eficiência dos iniciadores e amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)**

Para as análises de RT-qPCR foi utilizado o equipamento ABI 7500 Fast *Real-Time PCR* System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O cDNA individual de cada tempo em condição inoculada e não-inoculada, foi empregado como molde na análise da expressão gênica quantitativa.

Para cada gene, foram conduzidas três repetições biológicas para cada tempo analisado (24, 48 e 72 horas após a inoculação), um *pool* dos tempos não inoculados da cultivar Caipira (NI) e o controle negativo (água DEPC autoclavada).

A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada por curva padrão, com cinco diluições seriadas dos cDNAs utilizados e pelo coeficiente  $R^2$  resultante. Para avaliação dos genes alvos e do gene de referência, foram utilizadas três plantas diferentes para cada tempo, denominadas replicas biológicas, uma triplicata técnica de cada planta e uma triplicata do *pool* não inoculado para cada cultivar NTC (*No Template Control*) utilizando-se água DEPC autoclavada ao invés de cDNA.

Os níveis de expressão dos genes alvos foram determinados pela quantificação utilizando-se a expressão:  $QR = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), que se baseia na reação exponencial da PCR, onde QR (Quantificação Relativa) representa o nível de expressão gênica e o Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial. O  $\Delta\text{Ct}$  se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene endógeno (de referência), e  $\Delta\Delta\text{Ct}$

representa a diferença entre o  $\Delta Ct$  da amostra de interesse em determinado tempo e o  $\Delta Ct$  da amostra de referência (controle).

Para determinar a diferença da expressão gênica entre os tempos após a inoculação (24, 48 e 72 horas após a inoculação), foram utilizados os valores dos Ct (*cycle threshold*). Todos os resultados dos Ct's das reações foram visualizados no equipamento ABI 7500 Fast *Real-Time PCR* System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a normalização dos valores de expressão para cada uma das amostras, calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes de interesse de forma relativa aos genes de referência - Tubulina e 25S, de acordo com Pfaffl et al., (2002).

Cada reação de RT-qPCR foi realizada em um volume final de 10  $\mu\text{L}$  contendo: 2  $\mu\text{L}$  de cDNA (50 ng), um par de iniciadores (0,6  $\mu\text{L}$  dos iniciadores *forward* + *reverse* na concentração de 10 $\mu\text{M}$ ) e 6 $\mu\text{L}$  de GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix, 2x kit (Promega, Madison, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e 0,8  $\mu\text{L}$  de água Miliq autoclavada. As análises de RT-qPCR foram conduzidas no equipamento ABI 7500 Fast *Real-Time PCR* System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As condições de termociclagem utilizadas na RT-qPCR foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão do iniciador a 60°C por 60 segundos, seguido de uma curva de dissociação gerada a partir da desnaturação do produto amplificado pelo aumento da temperatura no fim da reação para verificar a especificidade do iniciador (95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e 95°C por 15 segundos) com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. A curva de *melting* foi determinada após o término dos ciclos de reações de cada produto amplificado entre 72 e 95°C.

Para a realização da quantificação relativa da expressão gênica, foi utilizado o software Expression Suite versão 1.0.3, que realiza a quantificação comparativa pelo método de "*Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*" (PFAFFL et al., 2002).

## RESULTADOS

### Validação dos genes por RT-qPCR

Dos 18 primers desenhados após as análises em larga escala dos dados obtidos do RNA-seq (Tabela 1), foram selecionados 2 genes relacionados as respostas de defesa da planta (MUSA 3 e MUSA 5) por apresentarem apenas um produto de amplificação e altos valores de expressão ( $\log_2$  fold change) diferencial (Tabela 2). Os genes de referência foram selecionados por serem os mais estáveis em plantas de *Musa* spp. (PODEVIN et al., 2012).

**Tabela 2.** Genes selecionados para estudo de expressão gênica diferencial no patossistema bananeira x *M. musicola*. Cruz das Almas – BA, 2017.

ID	Gene	Descrição	Fold change	pValue
GSMUA_AchrUn_rando mT23380_001	MUSA 3	Protein kinase domain containing protein, expressed	1,97	1.54 <sup>E-12</sup>
GSMUA_Achr1T09200_ 001	MUSA 5	Putative Wall-associated receptor kinase 2	1,88	2.31 <sup>E-11</sup>

*Fold-change* = valor da razão entre genótipo inoculado e controle (não-inoculado), onde valor abaixo de 1 indica que o gene foi reprimido e valor acima de 1 indica gene induzido. *P-value* < 0001= valor de corte para identificar genes diferencialmente expresso.

A partir da obtenção da curva padrão gerada para cada iniciador, foi possível calcular a eficiência de amplificação (*E*) dos primers, que variou entre 97.0 e 110.0% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Eficiência dos primers utilizados na análise da expressão gênica diferencial no patossistema *Musa* spp. x *M. musicola*. Cruz das Almas – BA, 2017.

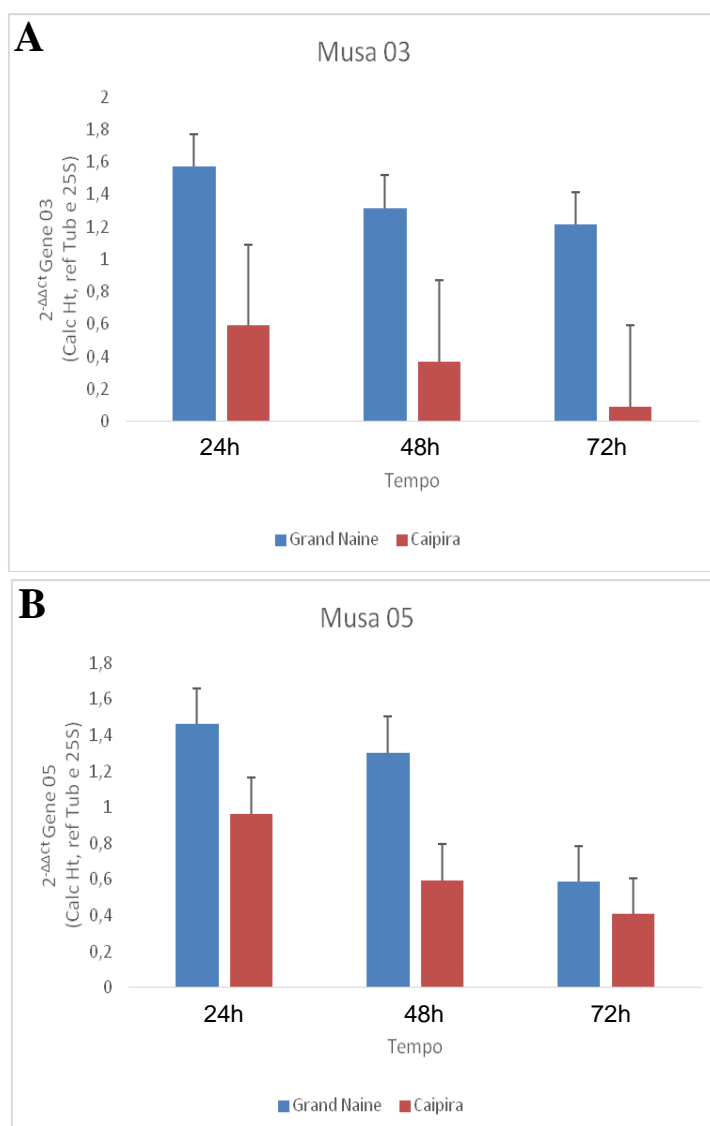
ID	Gene	Descrição	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Eficiência	Ta*
GSMUA_AchrUn_random_T23380_001	Musa 3	protein kinase domain containing protein, expressed	F: CAGTGGTGGATTTGTTGTGC R: TACGGGAATTCCATTGGGTA	250	0,98	60
GSMUA_Achr1T09200_001	Musa 5	Putative Wall-associated receptor kinase 2	F: ACGTCATTGGCATCGTCATA R: GTCGGCAACGAAGGTA AAAAG	230	1,10	60
25S	25S	25S rRNA	F: ACATTGTCAGGTGGGGAGTT R: CCTTTTGTCCACACGAGATT	106	0,99	60
TUB	Tubulina	Beta Tubulina	F: TGTTGCATCCTGGTACTGCT R: GGCTTTCTTGCACTGGTACAC	112	0,97	60

\*Ta = temperature de anelamento específica do primer

### Expressão gênica da proteína quinase (MUSA 3) e proteína quinase 2 (MUSA 5)

A expressão do gene MUSA 3 foi maior na interação compatível com a cultivar suscetível (Grande Naine) para todos os tempos avaliados (Figura. 2, A). Para a cultivar resistente (Caipira), a expressão detectada foi inferior ao controle, abaixo da expressão basal, havendo um decréscimo na expressão ao longo do tempo da interação.

Para o gene MUSA 5, que codifica para a proteína receptora da proteína quinase 2, a expressão foi menor que a do controle em todos os tempos analisados para a cultivar Caipira (resistente). A cultivar suscetível apresentou maior expressão diferencial em relação à expressão basal nos tempos 24 e 48 h.a.i. Para ambas as cultivares, houve maior expressão para os tempos iniciais (Figura 2, B).



**Figura 2.** Expressão relativa baseada em dados de RT-qPCR de dois genes candidatos a genes de defesa calculada em três tempos de inoculação (24, 48 e 72 h.a.i) em plantas de Grande Naine e Caipira no patossistema bananeira x *M. musicola*. A = Perfil da análise de expressão relativa do gene proteína quinase (Musa 3) para as cultivares Grande Naine e Caipira e B = Perfil da análise de expressão relativa do gene proteína quinase 2 (Musa 5) para as cultivares Grande Naine e Caipira. Cruz das Almas – BA, 2017.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho, analisaram-se as variações na expressão gênica durante a infecção de bananeira utilizando informações obtidas do sequenciamento de

última geração (NGS – Next Generation Sequencing) - RNA-seq, durante os estágios iniciais da interação bananeira x *M. musicola*, de genes escolhidos para confirmação via RT-qPCR. Para isso, foram utilizados cultivares comerciais de bananeira contrastantes para a resistência, sendo que, este, é o primeiro trabalho a analisar o padrão de expressão gênica na interação do fungo *M. musicola* com o genótipo resistente Caipira.

A cultivar Caipira, conhecido internacionalmente como Yangambi km 5, é um triploide do grupo AAA, destacando-se por ser resistente às sigatokas negra e amarela, e ao mal-do-Panamá. Já a cultivar Grande Naine, é caracterizada como altamente suscetível à Sigatoka amarela, culminando, a depender das condições ambientais, em perdas significativas da produção com o seu cultivo. Juntamente com as variedades Nanica e Nanicão, são tradicionalmente utilizadas na indústria (SILVA et al., 2015).

Nesse estudo pode-se verificar o nível de expressão gênica de proteínas quinases para ambas as cultivares na interação *Musa spp. x M. musicola*. As proteínas quinases estão envolvidas em processos metabólicos e de regulação celular, sendo também responsáveis pela recepção e transdução de sinais nas células. São responsáveis por catalizarem a transferência reversível dos  $\gamma$ -fostatos dos ATPs para as cadeias laterais dos aminoácidos (STONE et al. 1995).

Em relação aos genes selecionados a partir dos dados de RNA-seq, foi verificada a indução significativa de MUSA 3 em todos os tempos avaliados em bananeira Grande Naine. Para o genótipo Caipira, houve repressão em todos os tempos avaliados. O gene MUSA 5 foi induzido com 24 e 48 h.a.i após desafio com a *M. musicola* e reprimido após 72 h.a.i. para o genótipo Grande Naine. O genótipo Caipira apresentou repressão em todos os tempos avaliados (Figura 2).

Estes genes, dentre outras funções, estão associados à resposta de distúrbios ocasionados na parede celular, entretanto, sabe-se que genes WAK também estão ligados a stress abiótico e são necessários para o desenvolvimento de células (HE et al., 1996, WAGNER e KOHORN, 2001).

Uma família de cinco quinases associadas à parede de Arabidopsis (WAKs) apresentou potencial de proporcionar uma contínua sinalização entre a



parede celular e o citoplasma (WAGNER e KOHORN, 2001). A comunicação entre a parede celular e o citoplasma é muito importante, pois eventos como infecção por patógenos induzem a alterações na biossíntese e modificação dos componentes da parede celular e do fluxo citoplasmático ocasionando eventos como resistência sistêmica adquirida (WAGNER e KOHORN, 2001).

Vários genes WAKs têm sido identificados e caracterizados com a função de regulação de resposta de defesa em plantas. WAK1 de *Arabidopsis* e OsWAK1 de arroz aumentaram a resistência aos patógenos *B. cinerea* e *M. oryzae*, respectivamente (BRUTUS et al. 2010; LI et al., 2009). Li et al., 2012 relataram pelo menos três genes WAK's induzidos pela infecção de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (FOC) em bananeira, Cavendish Grande Naine, considerada resistente a raça 1 de FOC. Brutus et al. (2010) mostraram que plantas transgênicas de *Arabidopsis* que expressam WAK1 são mais resistentes a *Botrytis cinérea*.

Yang et al. (2012) identificaram um gene WAK em trigo diferencialmente expresso entre *Rhizoctonia cerealis* em linhagens resistentes e suscetíveis. Observaram uma rápida indução do gene TaWAK5 após a inoculação com o patógeno *R. cerealis*. O TaWAK5 em linhagens de trigo resistentes foi induzido a níveis mais elevados do que nas linhagens susceptíveis aos 7 dias após a inoculação com *R. cerealis*, resultando em um novo subgrupo WAK da família LRK de genes ligados a resistência.

Os receptores quinases também fazem parte do tipo de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares conservados associados à patógenos (PAMPs) (FRITZ-LAYLIN et al., 2005). Normalmente são receptores quinases RLK (*Receptor Like kinases*) localizados na superfície celular, que formam uma das maiores famílias de genes em plantas. São encontrados em domínios extracelulares distintos, envolvidos em reconhecimento de patógeno, sendo eles: LRR-RLK (*Leucine-rich repeat receptor-like protein kinases*) (KOBÉ e DEISENHOFER, 1995); LecRKs (*lectin receptor protein kinases*): (DESCLOS-THEVENIAU et al., 2012) e LysM (*Lysin Motif Receptor-like Kinase*) (PETUTSCHNIG et al., 2010).

Avaliando a expressão diferencial de três genes alvos, Putative LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase, obtidos a partir de RNA-Seq da

interação *M. acuminata* e *M. musicola*, Passos *et al.* (2013) observaram que não houve nenhuma mudança significativa destes genes em relação à expressão basal de controles não inoculados. O genótipo resistente Calcutta 4, não apresentou expressão significativa, semelhante ao que foi observado neste trabalho para o cultivar Caipira, que também é resistente a sigatoka-amarela.

Mecanismos de proteção da planta pode envolver a indução de respostas de defesa. A habilidade das plantas para ativar suas reações de defesa é presumível ser mediada pelo processo de reconhecimento entre hospedeiro e patógeno e envolve a detecção de PAMPs e/ou elicitores do patógeno pelos receptores tipos quinase da planta, com a subsequente cascata de eventos bioquímicos que leva à indução da resistência (DIXON *et al.*, 1994; DE ASCENSAO *et al.*, 2000). As interações entre elicitor-receptor gerariam sinais que ativariam genes envolvidos com a resposta de defesa, tais como os genes escolhidos neste estudo, contendo proteínas PRs, quitinases, glucanases, receptores LLR, WRK, WAK, reforço de parede celular, entre outros, que podem contribuir para o sistema de defesa da planta (KEEN, 1992).

O gene Musa 3 (Proteína quinase) apresentou indução da expressão no tempo 24 h.a.i. (Figura 2A). Proteínas quinases exercem um papel importante na sinalização durante o reconhecimento e subsequente ativação/regulação dos mecanismos de defesa da planta (DING *et al.*, 2008).

Passos *et al.* (2013) relatam regulação negativa de genes em folhas infectadas na interação compatível, quando comparados com tecidos não infectados em Cavendish Grande Naine. Dentre estes estão incluídos o fator de transcrição WRKY 17 e MAP quinase BIMK1 (sinalizadoras de defesa), endo-quitinases e putativos quitinases (degradação da parede celular dos fungos) e serina/treonina-quinase com LRRs, Ser/Thr quinase e proteínas de resistência NBS-LRR (genes receptores). Esse resultado difere dos encontrados em nosso trabalho, pois o cultivar Grande Naine apresentou expressão diferencial significativa para o gene proteína quinase (Figura 2A).

Assim, os resultados sugerem que possivelmente, o gene WAK2, por estar envolvido com função de receptor de sinal na parede celular, pode ter recebido o sinal do fungo (efetores) e iniciado o rompimento da parede celular, facilitando ainda mais a penetração do fungo causando a proliferação da

doença em Grande Naine (suscetível); processo que não ocorreu em Caipira, possivelmente, conferindo-lhe a resistência. Esse resultado é importante, pois uma vez validado em outros patossistemas, se torna um excelente candidato para trabalhos de transformação genética em bananeira, acelerando o processo de obtenção de variedades mais resistentes à Sigatoka amarela. Assim, compreende-se que a relação planta patógeno é dependente de diversos fatores físicos, químicos e biológicos.

As condições de manejo experimental têm efeito significativo na análise de expressão gênica, em se tratando de análises em ambiente controlado, e principalmente da interação patógeno hospedeiro. Contudo, outros fatores também podem estar associados com a expressão gênica dos genes analisados neste estudo, como comentado anteriormente.

## CONCLUSÕES

A cultivar Caipira não apresentou respostas de defesa ao fungo avaliado neste patossistema.

O gene WAK2 apresentou maior indução no padrão de expressão no genótipo suscetível em relação ao genótipo resistente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKRY, F. et al. Genetic Improvement of Banana. In **Breeding Plantain Tree Crops: Tropical Species**. Edited by Jain SM, Priyadarshan PM. New York: Springer Verlag Publisher: 3–46. 2009.

BRUTUS, A. et al. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 107, 9452–9457. 2010.

CHEN, J. et al. Molecular characterization and expression profiles of MaCOL1, a CONSTANS-like gene in banana fruit. **Gene**, v.496, n.2, 110-117, 2012.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P. de. Doenças fungicas e bacterianas. In: **Banana: Fitossanidade**. (Cordeiro ZJM, coord.). Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, p. 36-65. (Frutas do Brasil, 08). 2000.

CORDEIRO, Z.J.M. et al. Doenças e métodos de controle. In **O Cultivo da Bananeira**, Volume 1. 1st edition. (Borges AL, Souza LS, Eds) Cruz das Almas: Nova Civilização: Cruz das Almas: Nova Civilização:146–182. 2004.

CORDEIRO, Z.J.M. et al. **Metodologias para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2011.

DE ASCENSAO, A.R.D.C.F. e Dubery, I.A. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race four. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 1173-1180. 2000.

DESCLOS-THEVENIAU, M. et al. The Arabidopsis Lectin Receptor Kinase LecRK-V.5 Represses Stomatal Immunity Induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. 2012. **PLoS Pathog** [Internet].

DING, X. et al. A Rice Kinase-Protein Interaction Map1[W][OA]. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, p. 1478 - 1492. 2008.

DIXON, R.A. et al. Early events in the activation of plant defence responses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 479-501. 1994.

FAO. **Agricultural Database**. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 15 jul. 2016.

FERREIRA et al. X International Symposium on Banana / ISHS-ProMusa symposium **Agroecological approaches to promote innovative banana production systems** Montpellier, France • 10 - 14 October 2016 Trabalho ainda não publicado: <http://ishs-promusa2016.cirad.fr/> .

FOURÉ, E. Leaf spot disease of Banana and Plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis*. In: **Conference of the international musa testing program held at fhia**, Honduras. *Proceedings Montpellier*. INIBAP, p.37-46. 1994.

FRITZ-LAYLIN, L.K. et al. Phylogeonomic analysis of the receptor-like proteins of rice and Arabidopsis. **Plant Physiol**, v.138, p.611-23, 2005.

GAMBINO, G. et al. A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants. **Phytochem. Anal.** v. 19, p. 520–525, 2008.

HE, Z. H. et al. A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. **J. Biol. Chem.** 271 19789–19793. 1996.

KEEN, N.T. The molecular biology of disease resistance. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, p. 109-122. 1992.

KOBE, B. e DEISENHOFER, J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. **Nature**. Mar 9;374(6518):183–6. 1995.

KON, I. Controle de Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola*, Leach) na cultura da bananeira (*Musa sp*) com o fungicida biológico serenade. In: **XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 54., Vitória – ES. Anais da Sociedade Brasileira de Fruticultura. 2008.

LI, H. et al. A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, OsWAK1, plays important roles in rice blast disease resistance, **Plant Mol. Biol.** 69 337–346. 2009.

LI, C. et al. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium*. **BMC Genomics**, London v. 13, p.374. 2012.

LIVAK, K.J. e SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods*, v. 25, p. 402–408. 2001.

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

PASSOS, M.A.N. et al. Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. **BMC Genomics**. New York. p. 1-17. 2013.

PETUTSCHNIG, E.K. et al. The Lysin Motif Receptor-like Kinase (LysM-RLK) CERK1 Is a Major Chitin-binding Protein in *Arabidopsis thaliana* and Subject to Chitin-induced Phosphorylation. **J Biol Chem**. Sep 10;285(37):28902–11. 2010.

PFAFFL, M.W. et al. 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.

PODEVIN, N. et al. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop *Musa*. **Molecular Breeding**. 30:1237–1252. 2012.

SILVA, S. de O. et al. Cultivares. In: N Volume 1. 1st edition. Edited by Ferreira, C.F.; Silva, S. de O.; Amorim, E.P.; Santos-Serejo, J.A dos. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. 832 p., 2015.

STONE, J.M. e WALKER, J.C. Plant protein kinase families and Signal Transduction. **Plant physiology**. 108: 452-457, 1995.

WAGNER, T. A.; KOHORN B. D. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. **Plant Cell** 13 303–318. 2001.

WANG, Z. et al. De novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* tropical race 4 infection. **BioMedCentral Genomics**. v. 21, n. 650, 2012.

YANG, Q. et al. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium*. **BMC Genomics**, London, v. 13, p.374. 2012.

## **ARTIGO 3**

### **AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella musicola* EM CULTIVARES DE BANANEIRA (*Musa* sp.)<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao comitê editorial do periódico científico Summa Phytopathologica, em versão na língua inglesa

## **Agressividade de isolados de *Mycosphaerella musicola* em cultivares de bananeira (*Musa* sp.)**

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de isolados de *M. musicola* oriundos de diferentes locais no Brasil, avaliar a agressividade do patógeno por meio da severidade da doença, em dois cultivares de bananeira suscetíveis ao fungo. Plantas de bananeira das cultivares Prata Anã e Grande Naine foram inoculadas com uma suspensão de  $4 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>. Foram selecionadas as folhas número 1 e 2 e essas inoculadas na superfície abaxial do limbo, até o ponto de escoamento. As avaliações da severidade da doença foram realizadas a cada sete dias após a inoculação (DAÍ) por um período de 70 dias, sendo obtidas imagens por meio de fotografia digital utilizando uma câmera de alta resolução. A partir dos dados de severidade, calculou-se a área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD). Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias agrupadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. As análises da AACPSD revelaram diferenças na agressividade dos isolados, sem observar nenhuma relação quanto à origem geográfica. As curvas de progresso da severidade da Sigatoka-amarela revelam início dos primeiros sintomas entre 35 e 42 DAÍ. Assim, nota-se que há variabilidade entre os isolados quanto à agressividade, evidenciando a existência de diversidade genética.

**Palavras-chave:** Severidade; Curvas de Progresso; epidemiologia.



## **Aggressiveness of *Mycosphaerella musicola* isolates in banana cultivars (*Musa* sp.)**

**Abstract:** The objective of this work was to evaluate the behavior of isolates of *M. musicola* from different locations in Brazil, and to evaluate the aggressiveness of the pathogen through the severity of the disease, in two banana cultivars susceptible to the fungus. Banana plants of the cultivars Prata Anã and Grande Naine were inoculated with a suspension of  $4 \times 10^4$  conidia mL<sup>-1</sup>. Leaves number 1 and 2 were selected and sprayed on the abaxial surface until the point of runoff. The disease severity assessments were performed every seven days after inoculation (DAI) for a period of 70 days, and images were obtained by digital photography using a high resolution camera. From the severity data, the area under the disease severity progression curve (AACPSD) was calculated. The data were submitted to analysis of variance, and the means grouped by the Scoot Knott test at 5% probability. The AACPSD analyzes revealed differences in the aggressiveness of the isolates, without observing any relation as to the geographic origin. The progression curves of the severity of yellow Sigatoka show early onset of symptoms between 35 and 42 DAI. Thus, there is variability among isolates regarding aggressiveness, evidencing the existence of genetic diversity.

**Key words:** Severity; Progress Curves; epidemiology.

## INTRODUÇÃO

*Mycosphaerella musicola* é o fungo causador da Sigatoka-amarela da bananeira, considerada uma das doenças mais importantes para a cultura. O fungo apresenta grande variabilidade genética, dificultando o seu controle. Alguns estudos têm sido relatados com a finalidade de avaliar a variabilidade genética de isolados de *M. musicola* (MOREIRA et al., 2003; CARLIER et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013; PEIXOUTO et al. 2015). Contudo, estudos relacionados à agressividade de isolados no patossistema *Musa x bananeira* ainda são escassos.

A avaliação da resistência de bananeira à Sigatoka amarela é comum ser realizada em campo, entretanto, existe algumas dificuldades como disponibilidade de áreas uniformemente infectadas e dependência de condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da doença. Rocha et al. (2012) relataram que as variáveis climáticas tiveram maior efeito sobre a doença, e que as curvas de progressão da Sigatoka amarela, apresentaram dois períodos de maior gravidade, durante a estação chuvosa e durante a estação mais seca do ano.

A natureza heterotática de *M. musicola*, que gera a troca de material genético, contribui de forma significativa para o aumento da variabilidade genética dentro das populações dos fungos (CARLIER et al., 2003). Esse aumento na variabilidade genética pode ser responsável pelo aumento da agressividade de isolados.

Devido aos prejuízos causados pelo fungo surge a necessidade do conhecimento de seu comportamento, que pode auxiliar os programas de melhoramento para resistência, possibilitando a criação de estratégias de controle da doença. A análise por meio da quantificação da doença ao longo do tempo na interação planta patógeno é uma alternativa importante para conhecimento do comportamento do fungo.

No patossistema Bananeira x *Mycosphaerella musicola* são escassos os estudos que se referem à agressividade de isolados em plantas infectadas. Neste contexto, objetivou-se neste estudo avaliar o comportamento de isolados de *M. musicola* oriundos de diferentes locais no Brasil, avaliar a agressividade

do patógeno por meio da avaliação da evolução da severidade da doença, em duas cultivares de bananeiras suscetíveis ao fungo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e local de estudo

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada na cidade de Cruz das Almas-BA. Plantas das cultivares, Grande Naine e Prata Anã, foram obtidas a partir de cultura *in vitro*. As plantas foram aclimatadas em bandejas de isopor em casa de vegetação e aos três meses de idade, transferidas para sacos de polietileno contendo mistura de solo, substrato e fibra de coco (2:2:1), onde permaneceram até o término das avaliações. Com relação ao manejo experimental, foram seguidas recomendações para o cultivo da bananeira.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados, com dez repetições, em esquema fatorial (11x2), correspondente a 10 isolados de *Mycosphaerella musicola* de diferentes regiões do Brasil (Tabela 1) e dois cultivares de bananeira, Prata Anã e Grande Naine, e uma testemunha sem inoculação, totalizando 22 tratamentos. Ambos os cultivares são suscetíveis ao patógeno (CORDEIRO et al., 2004).

### Preparo da suspensão e inoculação em casa de vegetação

Para este estudo foram utilizados 10 isolados de *M. musicola* de diferentes regiões do Brasil, provenientes da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura (Tabela 1). Para indução de esporulação, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a maceração com bastão de vidro, das colônias do isolado de *M. musicola* mantidas em BOD. Em seguida, foram diluídas em água destilada e deionizada, e espalhadas sobre superfícies de placas de Petri contendo meio V8 (150ml/L de suco de vegetais V8 Campbell, 18 g/L de ágar e 2 g/L de carbonato de cálcio, completando com água para um volume de 500mL). As placas foram seladas com filme plástico em  $\frac{3}{4}$  de seu perímetro, e transferidas novamente para BOD, com temperatura

ajustada para 28°C e fotoperíodo de 12 h. Após 10 dias de incubação, adicionou-se 15 mL de água destilada esterilizada sobre as colônias e procedeu-se a liberação dos conídios com pincel, que era passado sobre as colônias com movimentos suaves. Após 15 minutos do pincelamento, a suspensão obtida foi filtrada e quantificada sua concentração em câmara de Neubauer. Com as devidas diluições, ajustou-se a concentração de esporos para  $4.10^4$  conídios/mL. Após obtenção das suspensões procedeu-se as inoculações, sendo que em cada planta foram selecionadas as folhas número 1 e 2 e essas inoculadas na superfície abaxial do limbo, até o ponto de escorrimento (CORDEIRO et al., 2011).

**Tabela 1.** Isolados de *Mycosphaeralla musicola* e suas respectivas origens geográficas. Cruz das Almas – BA, 2017.

Isolados	Cultivar	Microrregião	Município
1 – (033MG)	-	Jaiba/MG	Jaiba
2 – (034BA)	-	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
3 – (040MG)	-	Lavras/MG	Lavras
4 – (002BA)	Prata anã	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
5 – (056BA)	-	Litoral Sul/BA	Itajuípe
6 – (075RN)	Pacovan	Mossoró/RN	Baraúna
7 – (018BA)	Prata comum	Baixo Sul/BA	Presidente Tancredo Neves
8 – (062BA)	-	Litoral Sul/BA	Itajuípe
9 – (044RN)	Caipira	Chapada do Apodi/RN	Apodi
10 – (066BA)	-	Baixo Sul/BA	Gandu

As avaliações da severidade da doença foram realizadas a cada sete dias após a inoculação (DAÍ) por um período de 70 dias, sendo obtidas imagens por meio de fotografia digital utilizando uma câmera de alta resolução, posicionando a máquina a 40 cm das folhas número 1 e 2 de cada planta inoculada e não inoculada (testemunha), as quais foram transferidas para um microcomputador para determinar o percentual de área lesionada, severidade real, com auxílio do programa ASSESS 2.0 (LAMARI, 2008).

A partir dos dados de severidade, calculou-se a área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) por meio da seguinte fórmula:

$$\text{AACPSD} = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

AACPSD = Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade da Doença;

$Y_i$  = proporção da doença na  $i$ -ésima observação;

$t_i$  = tempo em dias na  $i$ -ésima observação;

$n$  = número total de observações.

Os valores de AACPSD foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas por meio do teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, com a utilização do software Estatística 6.0 (Tulsa, Statsoft, 2001).

A partir das médias da AACPSD foi realizada regressão entre as variáveis tempo (DAI) e isolados, para inferências quanto ao comportamento da doença frente às variações do tempo como subsídio a futuro planejamento de controle da doença.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa entre isolados, genótipos (Tabela 2). Essa diferença é um indicativo de variabilidade genética dentro da espécie.

**Tabela 2.** Análise de variância para AACPSD de Sigatoka-amarela em bananeira, com diferentes isolados de *Mycosphaerella musicola*, em casa de vegetação, Cruz das Almas – BA, 2017.

Fator	Gl	SQ	QM	F	p>F
Genótipo	1	10824811,8	10824811,8	14,48	<0,00
Isolado	10	24252415,7	2425241,57	3,24	<0,00
Bloco	9	8130143,91	903349,32	1,20	0,29
Resíduo	199	148754217,00	747508,63		
Total	219	191961588,41			
Média	636,40				
CV	135,51				

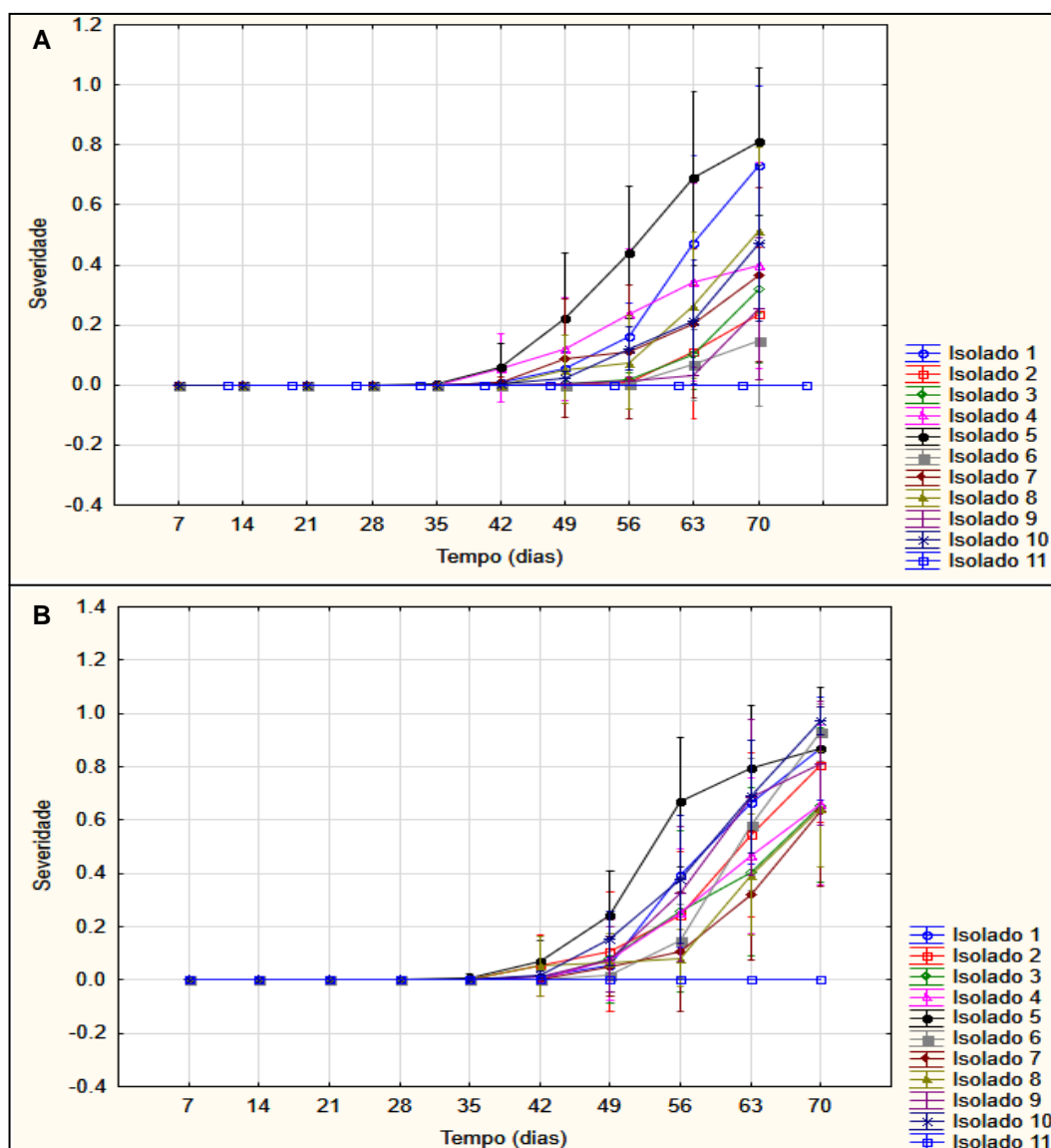
Quando se compara o comportamento dos isolados em relação ao cultivar Prata Anã, verificou-se que o isolado 5 (1273,50) foi o mais agressivo (Tabela 4). Contudo, para o cultivar Grande Naine os isolados 5 (1551,96), 10 (1209,75), 1 (1092,34), 9 (1054,03) e 2 (947,34) foram os mais agressivos, respectivamente, com agrupamento diferente dos demais (Tabela 4). O coeficiente de variação apresentou-se com alta magnitude, contudo esse alto valor deve-se principalmente a média zero das testemunhas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Médias das áreas abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) e médias das severidades em cultivares de bananeira inoculadas com isolados de *Mycosphaerella musicola*. Cruz das Almas – BA, 2017.

Isolados	AACPSD	
	Prata Anã	Grande Naine
1	744,92 <sup>1</sup> B	1092,34 A
2	168,00 C	947,34 A
3	197,40 C	750,93 B
4	663,60 B	789,51 B
5	1273,50 A	1551,96 A
6	102,98 C	848,59 B
7	417,40 C	555,49 B
8	455,85 C	640,50 B
9	121,64 C	1054,03 A
10	415,16 C	1209,75 A
11 <sup>2</sup>	0,00 C	0,00 C
Média	414,59	858,22
CV (%)	135,51	

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo agrupamento, pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ); <sup>2</sup>Testemunha não inoculado.

As curvas de progresso da severidade da Sigatoka-amarela revelam diferenças do tempo para início dos primeiros sintomas em ambos os cultivares. Foi possível observar o início dos sintomas no período compreendido entre 35 e 42 DAÍ (Figura 1A e B). O período de incubação, que é considerado o tempo compreendido entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas, tem se mostrado extremamente variável em função do ambiente, tendo registro de 15 até 76 dias (CORDEIRO et al., 2005).



**Figura 1.** Curvas de progresso da severidade de sigatoka amarela (*Mycosphaerella musicola*) em bananeira nos cultivares Prata Anã (A) e Grande Naine (B) avaliadas a cada 7 dias por um período de 70 dias após a inoculação. Barras verticais inferem sobre intervalo de confiança de 0,95. Cruz das Almas – BA, 2017.

Na cultivar Prata Anã, o isolado que apresentou maior severidade da doença aos 70 DAI foi o isolado 5, sendo também um dos primeiros a apresentar aumento progressivo da severidade nos tempos 42 a 70 DAI (Figura 1A). O isolado 1 apresentou severidade semelhante ao isolado 5, porém com aumento do progresso da severidade nos tempos 49 a 70 DAI (Figura 1A).

Nas curvas de progresso da Sigatoka-amarela no cultivar Grande Naine observa-se um aumento da severidade nos tempos 42 a 70 DAI (Figura 1B). Os isolados 1, 2, 5, 6 e 10 foram os mais agressivos de acordo com a curva da severidade aos 70 DAÍ. Contudo, somente no tempo 56 DAÍ foi observada diferença entre esses isolados, com o isolado 5 apresentando maior severidade, diferenciando significativamente (Figura 1B).

Os diferentes níveis de agressividades relatados em nosso estudo evidenciam diferentes expressões genótípicas para a agressividade do isolado. Independente da origem, todos os isolados ocasionaram lesões em ambas as cultivares.

No estudo da variabilidade genética de isolados de *M. musicola* de diferentes regiões do Brasil, Peixoto et al. (2015) não observaram diferenças significativas em relação a origem dos isolados. Contudo, nossos resultados mostram que há variação na agressividade dos isolados independente da origem geográfica. Neste contexto, observa-se a formação de grupos de isolados em relação à agressividade pela análise da AACPSD, não havendo relação quanto às origens dos isolados (Tabela 4).

Os resultados indicam o isolado 5, que apresentou maior agressividade tanto para as análises da AACPSD quanto para as curvas de progressos, como um isolado promissor para seleção de cultivares resistentes a Sigatoka-amarela.

O estudo da agressividade de isolados torna-se de fundamental importância para doenças que têm a utilização de cultivares resistentes como estratégia para controle da doença, em que os isolados que apresentam maior agressividade podem ser utilizados nas avaliações desses cultivares pelos programas de melhoramento visando resistência a doença.

## CONCLUSÕES

Há variabilidade entre os isolados de *M. musicola* quanto a agressividade, evidenciando a existência de diversidade genética.



Os isolados mais agressivos, principalmente o isolado 5, são recomendados para programas de melhoramento da bananeira visando resistência a *M. musicola*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARLIER, J. et al. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases, San José, 2002 Costa Rica. **Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook**. Montpellier: INIBAP. P123-129, 2003.
- CORDEIRO, Z. J. M. et al. E. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (ed). **O cultivo da bananeira**. Embrapa mandioca e fruticultura. Ed.1. Cruz das Almas-BA. p. 279, 2004.
- CORDEIRO, Z.J.M. et al. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: Kimati, H., Amorin, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 2005. p. 99-117, 2005.
- CORDEIRO, Z.J.M. et al. Metodologias para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório. Embrapa Mandioca e Fruticultura: (**Documentos / Embrapa Mandioca e Fruticultura**, ISSN 1516-5728; 198) Cruz das Almas, 32.p 2011.
- LAMARI, L. **ASSESS 2.0: Image analysis software for disease quantification**. Saint Paul: APS, 125p, 2008.
- MOREIRA, R.F.C. et al. Caracterização genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por marcadores RAPD. **Summa Phytopathologica**, v.29, p.275-277, 2003.
- OLIVEIRA, et al. Diversidade Genética de Isolados de *Mycosphaerella musicola* Obtidos de Bananeiras do Norte de Minas Gerais, Brasil por Meio de Marcadores RAPD. **Cienc. Rural** 43: 45-48, 2013.
- PEIXOUTO, Y.S. et al. Estimation of genetic structure of a *Mycosphaerella musicola* population using inter-simple sequence repeat markers. **Genet Mol Res.** 14, 8046-57, 2015.
- ROCHA, H. S. et al. Temporal Progress of Yellow Sigatoka and Aerobiology of *Mycosphaerella musicola* Spores. **Journal of Phytopathology**, 160(6), 277-285, 2012.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta de resistência e defesa no patossistema bananeira x *M. musicola*, devem ser estudados para auxiliar os programas de melhoramento genético que visam resistência à doença.

Outros genes de interesse devem ser analisados em estudos de expressão gênica de *Musa spp.*

Estudos histopatológicos podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de resistência da planta e de penetração pelo fitopatógeno. Assim, no estudo da interação no patossistema bananeira x *M. musicola* deve-se integrar o estudo anatômico ao estudo molecular para melhor compreensão da interação planta-patógeno.

A avaliação da resistência de cultivares é possível quando se tem condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno. Em condições favoráveis de desenvolvimento, é importante que se determine o grau de agressividade do isolado, dando-se preferência pelo isolado mais agressivo para obtenção de uma análise de resistência mais acurada.

O estudo dos mecanismos de resistência da bananeira à Sigatoka-amarela deve ser realizado de forma conjunta por meio das análises de expressão gênica, estudos histológicos e análise da severidade.