



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO *Musa acuminata*-  
*Pseudocercospora musae***

**ERICA CRISTINA SILVA REGO**

**BRASÍLIA, 2018**

**ERICA CRISTINA SILVA REGO**

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO *Musa acuminata-*  
*Pseudocercospora musae***

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

**ORIENTADOR:**

**DR. ROBERT NEIL GERARD MILLER**

**BRASÍLIA, 2018**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

REGO, Erica Cristina Silva

Caracterização da interação *Musa acuminata-Pseudocercospora musae.*/ Erica Cristina Silva Rego

Brasília, 2018. p. 82

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

I. *P. musae-Musa acuminata* spp.

II. Universidade de Brasília. PPG/FIT

III. Caracterização da interação *Musa acuminata-Pseudocercospora musae.*

## AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos, INCT, CNPq e FAPDF pelo apoio financeiro para as atividades laboratoriais;

A Universidade de Brasília – UNB pela oportunidade de realização do mestrado no Departamento de Fitopatologia;

Ao professor Robert Miller pela orientação, apoio, paciência e confiança em mim depositada;

A Tatiana, minha grande amiga, companheira de trabalho que me acompanhou nessa jornada, sem você com certeza eu já teria desistido, obrigada por tudo;

Aos meus colegas de trabalho Fernando, Gabriel, Dijair, Michelle, Leticia, cada um de vocês contribuíram muito para o meu crescimento profissional, sem vocês nada disso seria possível;

A todos os professores e colegas do Departamento de Fitopatologia, meu muito obrigada;

Aos meus pais pela paciência e compreensão em tantos momentos de ausência;

E por fim, à todos que contribuíram de alguma forma para a execução desta pesquisa.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Robert Neil Gerard Miller, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), INCT, FAPDF e Embrapa Cenargen.

## **CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO *Musa acuminata-* *Pseudocercospora musae***

**Erica Cristina Silva Rego**

DISSERTAÇÃO APROVADA em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ por:

---

Dr. Danilo Batista Pinho  
Departamento de Fitopatologia  
Universidade de Brasília

---

Dra. Eliane Ferreira Noronha  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília

---

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

BRASÍLIA – DF/ 201

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE TABELAS</b>                                      | ix        |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                      | x         |
| <b>RESUMO GERAL</b>  | xii       |
| <b>ABSTRACT</b>  | xiv       |
| <br>   |           |
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>                                   | 1         |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>                              | 3         |
| 2.1. Importância da banana .....                             | 3         |
| 2.2. Taxonomia do gênero <i>Musa</i> .....                   | 3         |
| 2.3. Problemas fitossanitários.....                          | 4         |
| 2.4. Sigatoka-amarela.....                                   | 5         |
| 2.4.1. Sintomatologia da Sigatoka-amarela.....               | 7         |
| 2.4.2. Controle de Sigatoka-amarela.....                     | 8         |
| 2.5. Melhoramento genético em <i>Musa</i> .....              | 9         |
| 2.6. Imunidade Vegetal (PTI e ETI).....                      | 10        |
| 2.6.1. Imunidade em plantas desencadeada por PAMPs -PTI..... | 10        |
| 2.6.2. Imunidade disparada por efetores- ETL.....            | 11        |
| 2.7. RNAs não codificadores (ncRNAs).....                    | 14        |
| 2.7.1. MicroRNAs (miRNAs) .....                              | 15        |
| 2.7.1.2. Biogênese de miRNAs .....                           | 17        |
| 2.7.1.3. O papel de miRNAs na planta e no fungo.....         | 18        |
| <b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>                                 | <b>23</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>                                     | <b>24</b> |
| 4.1. Objetivo geral.....                                     | 24        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2. Objetivos específicos.....   | 24        |
| <b>5. METODOLOGIA.....</b>  | <b>25</b> |
| 5.1. Caracterização, identificação e manutenção de isolados de <i>Pseudocercospora musae</i> .....  | 25        |
| 5.2. Extração do DNA genômico.....  | 27        |
| 5.2.1. Identificação molecular de isolados de <i>P. musae</i> .....   | 28        |
| 5.3. Bioensaio <i>Musa acuminata</i> - <i>P. musae</i> .....  | 29        |
| 5.3.1. Extração do RNA total de material foliar de <i>M. acuminata</i> Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine inoculados e não inoculados com <i>P. musae</i> e síntese de cDNA..... | 30        |
| 5.3.2. Desenho de primers específicos para genes candidatos de defesa da planta.....  | 31        |
| 5.3.3 Desenho de primers para genes de referência.....  | 32        |
| 5.3.4. Validação de genes referência em <i>M. acuminata</i> por RT-qPCR.....  | 33        |
| 5.3.5. Validação de genes candidatos de resistência em <i>M. acuminata</i> - <i>P. musae</i> por RT-qPCR.....   | 34        |
| 5.4. Extração de RNA total de <i>P. musae</i> para construção da biblioteca de miRNA.....   | 35        |
| 5.4.1. Predição de miRNAs em <i>P. musae</i> e predição dos genes alvos.....  | 35        |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>   | <b>38</b> |
| 6.1. Identificação molecular de isolados de <i>P. musae</i> .....   | 38        |
| 6.2. Extração do RNA total de amostra foliar de <i>M. acuminata</i> Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine inoculados e não inoculados com <i>P. musae</i> e síntese de cDNA.....    | 39        |
| 6.2.1 Desenho de primers específicos para RT-qPCR.....  | 41        |
| 6.2.2 Validação dos genes de referência em <i>M. acuminata</i> por RT-qPCR.....   | 42        |
| 6.2.3 Validação de genes candidatos de resistência em <i>M. acuminata</i> - <i>P. musae</i> por RT-qPCR.....  | 47        |
| 6.3. Predição de miRNAs em <i>P. musae</i> .....  | 50        |
| 6.3.1. Predição dos genes alvos.....  | 54        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>7. DISCUSSÃO.....</b>                                     | <b>58</b> |
| 1. Validação dos genes de referência.....                    | 58        |
| 2. Validação de genes candidatos em resistência.....         | 62        |
| 3. miRNAs em <i>P. musae</i> .....                           | 65        |
| <b>8. CONCLUSÕES.....</b>                                    | <b>68</b> |
| <b>9. PERSPECTIVAS.....</b>                                  | <b>69</b> |
| <b>10. REFERÊNCIAS.....</b>                                  | <b>70</b> |
| <b>11. ANEXOS.....</b>                                       | <b>82</b> |
| 1. Tabela com os 101 Pré-miRNA candidatos em <i>P. musae</i> |           |
| 2. Figuras da estrutura secundárias dos 101 miRNAs           |           |
| 2. Tabela com os 381 genes-alvos em <i>Musa</i>              |           |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1-</b> Características dos <i>primers</i> para as regiões ITS do rDNA, ACT, H3 e EF e tamanho esperado do produto de PCR.....   | 29 |
| <b>Tabela 2-</b> Genes com potencial expressão estável, selecionados para análises de RT-qPCR.....  | 32 |
| <b>Tabela 3-</b> Resumo do delineamento experimental para o bioensaio <i>Musa acuminata-Pseudocercospora musae</i> .....  | 33 |
| <b>Tabela 4-</b> Análises das sequências via BLASTN, depositadas no Genbank, para as quatro regiões genômicas.....  | 39 |
| <b>Tabela 5-</b> <i>Primers</i> desenhados para RT- qPCR derivados de genes candidatos envolvidos com defesa na interação <i>M. acuminata- P. musae</i> e <i>M. acuminata-P. fijiensis</i> .....      | 41 |
| <b>Tabela 6-</b> Tabela de eficiência da reação da PCR em tempo real dos candidatos a genes de referência em <i>Musa</i> .....  | 43 |
| <b>Tabela 7-</b> Análise de estabilidade de expressão de cada gene de referência candidato para tecidos foliares de <i>Musa acuminata</i> com base em algoritmos geNorm, NormFinder e BestKeeper..... | 44 |
| <b>Tabela 8-</b> miRNAs de <i>P. musae</i> identificados nesse estudo.....  | 51 |
| <b>Tabela 9-</b> Genes alvos dos miRNAs de <i>Pseudocercospora musae</i> identificados em <i>Musa acuminata</i> DH Pahang potencialmente envolvidos em respostas de PTI ou ETI.....                   | 55 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1-</b> Ciclo de vida de <i>Pseudocercospora</i> spp em bananeira.....  | 6  |
| <b>Figura 2-</b> Escala de Meredith (1970) para diferentes graus de desenvolvimento das lesões de Sigatoka-amarela.....                      | 7  |
| <b>Figura 3-</b> Sintomas característicos de Sigatoka-amarela.....   | 8  |
| <b>Figura 4-</b> Modelo “ziguezague” do sistema imune em plantas.....  | 12 |
| <b>Figura 5-</b> Número de miRNAs maduros e seus precursores de nove grandes culturas depositadas no miRBase.....                            | 17 |
| <b>Figura 6-</b> Modelo da biogênese e mecanismos de ação de miRNAs em plantas.....  | 18 |
| <b>Figura 7-</b> Categoria funcional dos genes alvos dos miRNAs.....   | 21 |
| <b>Figura 8-</b> Lesões características de Sigatoka-amarela.....   | 26 |
| <b>Figura 9-</b> Conidiósporo de <i>P. musae</i> observado em microscópio de luz em folha inoculada de <i>Musa acuminata</i> .....           | 26 |
| <b>Figura 10-</b> Etapas do processo de multiplicação de <i>Pseudocercospora musae</i> .....   | 27 |
| <b>Figura 11-</b> Etapa do processo de inoculação.....   | 30 |
| <b>Figura 12-</b> Pipeline do algoritmo miRDeep para a predição da estrutura secundária do miRNA.....  | 36 |
| <b>Figura 13-</b> Esquema de UPE.....  | 37 |
| <b>Figura 14-</b> Produto da amplificação da região ITS do rDNA, em gel de agarose.....  | 38 |
| <b>Figura 15-</b> Eletroforese em gel de agarose 1% da extração do RNA total de folhas inoculadas e não inoculadas com <i>P. musae</i> ..... | 40 |
| <b>Figura 16-</b> Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando a amplificação dos oito <i>pools</i> de cDNA. ....                          | 40 |
| <b>Figura 17-</b> Curvas de dissociação apresentadas na corrida de RT-qPCR de oito genes de referência.....                                  | 42 |
| <b>Figura 18-</b> Curvas de dissociação e amplificação resultantes da corrida de PCR em tempo real.....                                      | 43 |
| <b>Figura 19-</b> Determinação de número mínimo de genes de referência.....  | 46 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 20-</b> Níveis de expressão relativa dos genes potencialmente envolvidos em resistência e respostas de defesa de <i>M. Calcutta 4</i> e <i>Cavendish Grande Naine</i> inoculados ou não inoculados com <i>P. musae</i> comparados ao controle não inoculado..... | 48 |
| <b>Figura 21-</b> Distribuição de miRNA nos cromossomos de <i>Musa acuminata</i> DH Pahang.....  | 56 |
| <b>Figura 22-</b> Predição da estrutura secundária de miRNAs em <i>P. musae</i> .....  | 57 |

## RESUMO GERAL

REGO, Erica Cristina Silva. **Caracterização da interação *Musa acuminata-Pseudocercospora musae*** 2018. 82p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A bananeira (*Musa* spp.) é uma das principais fontes de alimento do mundo. A banana é uma das frutas mais consumidas na maioria dos países tropicais e subtropicais, sendo componente básico da alimentação de mais de 400 milhões de pessoas. Um grande número de patógenos causam doenças na cultura da bananeira, dentre os principais agentes estão os vírus, bactérias, nematoides e fungos. Os fungos se destacam como um dos principais causadores de perdas na produção por causarem doenças como a Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra, e Mal do Panamá. *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton é o agente causal da Sigatoka-amarela, e se destaca como a principal doença fúngica da bananeira. *P. musae* é um patógeno hemibiotrófico, e sua infecção ocorre por meio dos estômatos. O objetivo geral desse trabalho é caracterizar os componentes moleculares presentes na interação *M. acuminata* – *P. musae* que exerçam possíveis papéis na defesa da planta frente à infecção. Desta forma foram validados nove pares de *primers* para oito genes de referência com o objetivo de normalizar a expressão gênica de genes alvos em RT-qPCR em *Musa*. Os genes utilizados foram Actina 1 (ACT1), Adenina Fosforibosil Transferase (APT), Fator de alongação 1 alfa (EF), Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), Tubulina alfa (TUBA), *GTP-Binding Nuclear Protein* (RAN), Ubiquitina 1 (UBIQ1) e Ubiquitina 2 (UBIQ2). As análises demonstraram que os genes mais estáveis foram Ubiquitina 2 e RAN. As análises de expressão diferencial de seis genes alvos por RT-qPCR demonstraram que a maioria dos genes potencialmente envolvidos em processo de defesa não foram modulados. Foi realizado também sequenciamento Illumina de isolado de *P. musae in vitro* a fim de identificar os microRNAs (miRNAs) do fungo. Um total de 101 pré-miRNAs candidatos foram identificados, e os alvos potenciais desses miRNAs foram preditos usando a ferramenta psRNATarget, onde foram identificados um total de 381 genes alvos no genoma de *Musa acuminata*. Foi observado que alguns desses genes alvos tem papel potencial em resistência a estresse biótico, tais como, NBS-LRR, fatores de transcrição da superfamília WRKY, genes análogos em resistência (RGAs) tais como, RGA1 e RGA3, citocromo P450 e quinases. A identificação contínua de genes envolvidos em resposta ao estresse biótico em *M. acuminata*, junto com a caracterização de miRNAs no patógeno e seu papel na modulação de expressão

gênica, contribuirão para o desenvolvimento de métodos de controle da doença Sigatoka-amarela.

**Palavras chaves:** *Musa acuminata*, *Pseudocercospora musae*, genes referência, expressão gênica, Illumina, microRNAs, defesa.

## ABSTRACT

REGO, Erica Cristina Silva. **Characterization of the *Musa acuminata* - *Pseudocercospora musae* interaction.** 2018. 82p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF

Banana (*Musa* spp.) is one of the world's most important crops, and the most popular fruit in many tropical and subtropical countries. It is a staple food for millions of people throughout the developing world. *Musa* spp. are hosts to many infectious diseases caused by a vast array of phytopathogenic fungi, bacteria, viruses, and nematodes. Fungal diseases may cause considerable yield losses in banana. They are responsible for diseases such as Yellow Sigatoka, Black Sigatoka, and Panama Disease. *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton is the causal agent of Yellow Sigatoka, and stands out as one of the main fungal diseases of banana. *P. musae* is a hemibiotrophic pathogen, and its' infection occurs through the stomata. The aim of this study is to characterize molecular compounds of the interaction *Musa acuminata* - *P. musae* that may exert possible roles in defense of the plant against infection. Nine pairs of primers were validated for eight potential reference genes with the objective of enabling accurate normalization of gene expression of target genes in RT-qPCR for *Musa*. The genes used were Actin 1 (ACT1), Adenine phosphoribosyltransferase (APT), Elongation factor 1-alpha (EF), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Alpha-tubulin (TUBA), GTP-Binding Nuclear Protein (RAN), Ubiquitin 1 (UBIQ1) e Ubiquitin 2 (UBIQ2). The results showed that the most stable genes were Ubiquitin 2 and GTP-binding nuclear protein RAN. Differential expression analysis of six target genes demonstrated that most of the genes potentially involved in the defense process were not modulated. Illumina sequencing of *P. musae in vitro* was also carried out to identify microRNAs (miRNAs). A total of 101 candidate pre-miRNAs were identified, and potential gene targets of these miRNAs were predicted using psRNATarget. A total of 381 target genes in *M. acuminata* genome were identified. Some of these target genes are likely involved in resistance, such as NBS-LRRs, WRKY transcription factors, resistance gene analogs (RGAs) such as RGA1 and RGA3, cytochrome P450 and kinases. The continued characterization of resistance gene candidates in *M. acuminata*, together with the characterization of miRNAs in the pathogen and their role in gene expression modulation, will contribute towards the development of efficient methods for control of Yellow Sigatoka disease.

**Key words:** *Musa acuminata*, *Pseudocercospora musae*, reference genes, gene expression, Illumina, microRNAs, defense.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

A bananeira (*Musa* spp.) é originária do sudeste asiático e oeste do pacífico. É uma das principais fontes de alimento para milhões de pessoas no mundo (BOONRUANGROD *et al.*, 2009), sendo uma das frutas mais consumidas na maioria dos países tropicais e subtropicais. O Brasil é um dos principais produtores da fruta, ficando atrás apenas da Índia, China e Filipinas (FAOSTAT, 2014). A maioria dos cultivares de bananeiras originaram-se a partir do cruzamento natural entre as duas principais espécies selvagens diplóides, *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B). Os cultivares comerciais de banana são triplóides estéreis, com frutos sem sementes desenvolvidos por partenocarpia (RAVEN *et al.*, 2001). O fato da bananeira não produzir sementes contribui para a ausência de variabilidade genética, resultando em lavouras com pouca resistência a pragas e doenças. Um grande número de patógenos causam doenças na cultura da bananeira, dentre os quais os principais agentes são vírus, bactérias, nematoides e fungos.

Os fungos se destacam como um dos principais causadores de perdas na produção de banana por causarem doenças como a Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra e mal do Panamá (H.KIMATI *et al.*, 1997). A Sigatoka-amarela se destaca como a principal doença e, é causada pelo fungo *Pseudocercospora musae* (fase sexual: *Mycosphaerella musicola*) (FERREIRA *et al.*, 2015). Essa doença provoca o surgimento de estrias e lesões na face adaxial das folhas, diminuição do tamanho dos cachos e o amadurecimento prematuro dos frutos. Dois tipos de esporos estão envolvidos no aparecimento da doença, os quais são produzidos de forma contínua em climas úmidos, sendo disseminados pela água acumulada na superfície foliar durante as chuvas ou orvalho (CORDEIRO *et al.*, 2011). Atualmente, a principal medida de controle da Sigatoka-amarela utiliza agroquímicos, no entanto, o desenvolvimento de novas variedades de bananeira resistentes à doença surge como uma abordagem promissora e sustentável. Nesse contexto é importante compreender os componentes moleculares-chaves presentes na interação *M. acuminata* – *P. musae* que exerçam possíveis papéis na defesa da planta frente à infecção.

Os microRNAs (miRNAs) estão envolvidos no estresse biótico e abiótico, tendo um papel importante na imunidade vegetal. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos de tamanho, cuja principal função é a regulação dos mecanismos moleculares à nível pós-transcricional na maioria dos organismos eucariotos (QU *et al.*, 2016). Esses atuam através da degradação ou repressão da tradução de moléculas alvos



de RNA mensageiro (mRNA) (BARTEL, 2004). Em plantas, os miRNAs desempenham papéis importantes no desenvolvimento, crescimento, sinalização hormonal, formação de raízes laterais, tempo de floração, metabolismo e resposta ao estresse (SUNKAR *et al.*, 2008). Estudos recentes evidenciam que os miRNAs influenciam a imunidade em plantas por meio do controle do silenciamento gênico (BALDRICH; SAN SEGUNDO, 2016; YANG; HUANG, 2013; ZHANG; ZHOU, 2010).

ELLENDORFF *et al.*, (2009) sugere que certos miRNA de patógenos fúngicos podem atuar como efetores de patógenos, silenciando a expressão gênica envolvida nas respostas imunes do hospedeiro, uma caracterização global dos miRNAs em *P. musae* é primordial para melhorar nossa compreensão do patossistema *Musa acuminata*- *P. musae*.

Um gene de referência ideal deve ser expresso de forma estável independente do tecido amostrado ou do tratamento experimental. A utilização de um gene normalizador inadequado pode tornar errôneas as conclusões obtidas em um trabalho, pois a variabilidade na expressão do gene referência pode significar diferenças significativamente relevantes nos resultados (NICOT *et al.*, 2005). A escolha e o número ótimo de genes-referência a serem utilizados podem ser orientados por alguns programas estatísticos, como o geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), BestKeeper (PFAFFL *et al.*, 2004) e NormFinder (ANDERSEN *et al.*, 2004). Esse trabalho tem o objetivo identificar e caracterizar os genes de referência mais estáveis entre diferentes condições experimentais.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

---

### **2.1. Importância da banana**

A bananeira (*Musa* spp.) originária do sudeste asiático e oeste da região Pacífica, é uma das principais fontes de alimento para milhões de pessoas no mundo (BOONRUANGROD; FLUCH; BURG, 2009), sendo cultivada em regiões tropicais e subtropicais em mais de 120 países (CHURCHILL, 2011). Em todo o mundo, são reconhecidas mais de mil cultivares de banana ou variedades que totalizam uma produção mundial de 69,2 milhões de toneladas de frutas (KANNAN; PRAKASAM, 2012). Na maioria dos países apenas de 10 a 15% das bananas são destinadas para exportação, enquanto que o restante é cultivado para consumo interno de famílias em muitos países em desenvolvimento (NOAR; DAUB, 2016). A banana é a segunda fruta mais produzida no Brasil e participa expressivamente na alimentação da população brasileira, pois 99% da produção é destinada ao abastecimento do mercado interno.

Em 2016 a área de cultivo da bananeira no Brasil alcançou 474.054 hectares, com uma produção de 6.962.134 milhões de toneladas, destacando-se como o quarto maior produtor mundial de banana, superado apenas pela Índia, China e Filipinas (IBGE, 2017).

Existem quatro subgrupos principais de variedades de bananeira: Prata, Maçã, Cavendish e Terra, os quais contam com um ou mais cultivares, sendo que os mais difundidos no Brasil são, 'Prata', 'Pacovan', 'Prata Anã', 'Maçã', 'Mysore', 'Terra' e 'D'Angola', do grupo AAB, e 'Nanica', 'Nanicão' e 'Grande Naine' do grupo AAA (BORGES; SOUZA, 2004).

### **2.2. Taxonomia do gênero *Musa***

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta monocotiledônea herbácea perene, pertencente a classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, superordem Lilianae, ordem Zingiberales, e família *Musaceae* (CHEESMAN, 1947). A família *Musaceae* é dividida em três subfamílias: Heliconoideae, Strelitzoideae e Musoideae. Os gêneros *Ensete* e *Musa* pertencem à subfamília Musoideae, sendo que o gênero *Musa* compreende as bananeiras com frutos comestíveis. A maioria dos cultivares de bananeira é proveniente do cruzamento natural de duas espécies, *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B).

CHEESMAN (1947) dividiu o gênero *Musa* em quatro seções, considerando o número de cromossomos e características morfológicas: *Eumusa* (n=11), *Rhodochlamys* (n=11),

*Callimusa* (n=10) e *Australimusa* (n=10). A partir de 1976, foi criada a seção *Ingentimusa* para acomodar uma espécie solitária, *Musa ingens*, que exibe sete pares de cromossomos. Contudo, em um trabalho mais recente de reavaliação taxonômica de *Musa*, usando técnicas moleculares, pode-se concluir que o gênero *Musa* compreende apenas de duas seções: *Musa* e *Callimusa*. Neste caso, as seções *Musa* e *Rhodochlamys*, bem como as seções *Callimusa* e *Australimusa*, são consideradas como sinônimos (HAKKINEN, 2013).

Enquanto as seções *Callimusa* e *Rhodochlamys* possuem apenas interesse ornamental, a seção *Australimusa* representa importância industrial, devido o alto rendimento de fibras. A seção *Musa* (antiga *Eumusa*) compreende mais importante, pois possui ampla distribuição geográfica, abrange as espécies de bananas comestíveis, além de conter o maior número de espécies, compreendendo plantas diploides ( $2n=22$ ), triploides ( $2n=3x=33$ ) e tetraploides ( $2n=4x=44$ ) estéreis que produzem frutos por partenocarpia e que se originam a partir do cruzamento inter e intraespecífico entre duas espécies selvagens, *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B) (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

### 2.3. Problemas fitossanitários

Além dos fatores abióticos e o ataque de pragas, o cultivo da bananeira é afetado por doenças causadas por vírus, fungos, bactérias e nematoides, que causam grandes prejuízos em condições favoráveis. Mais de 40 espécies fúngicas ocasionam doenças em pré e pós-colheita (JONES, 1999), destacando-se os principais estão as espécies *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Pseudocercospora fijiensis* e *Pseudocercospora musae*, agentes etiológicos do Mal-do-panamá, Sigatoka-negra e Sigatoka-amarela, respectivamente. O moko ou murcha bacteriana da bananeira, uma doença causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* Smith (*Pseudomonas solanacearum*), raça 2, é também um dos graves problemas que afetam a bananicultura e tem limitado a produção em alguns estados brasileiros. As principais viroses encontradas no Brasil são o *Banana bunchy top virus* (BBTV), *Banana streak virus* (BSV) e o *Cucumber mosaic virus* (CMV) (FIGUEIREDO *et al.*, 2006). O nematoide que mais tem causado danos à bananicultura é o *Radopholus similis*.

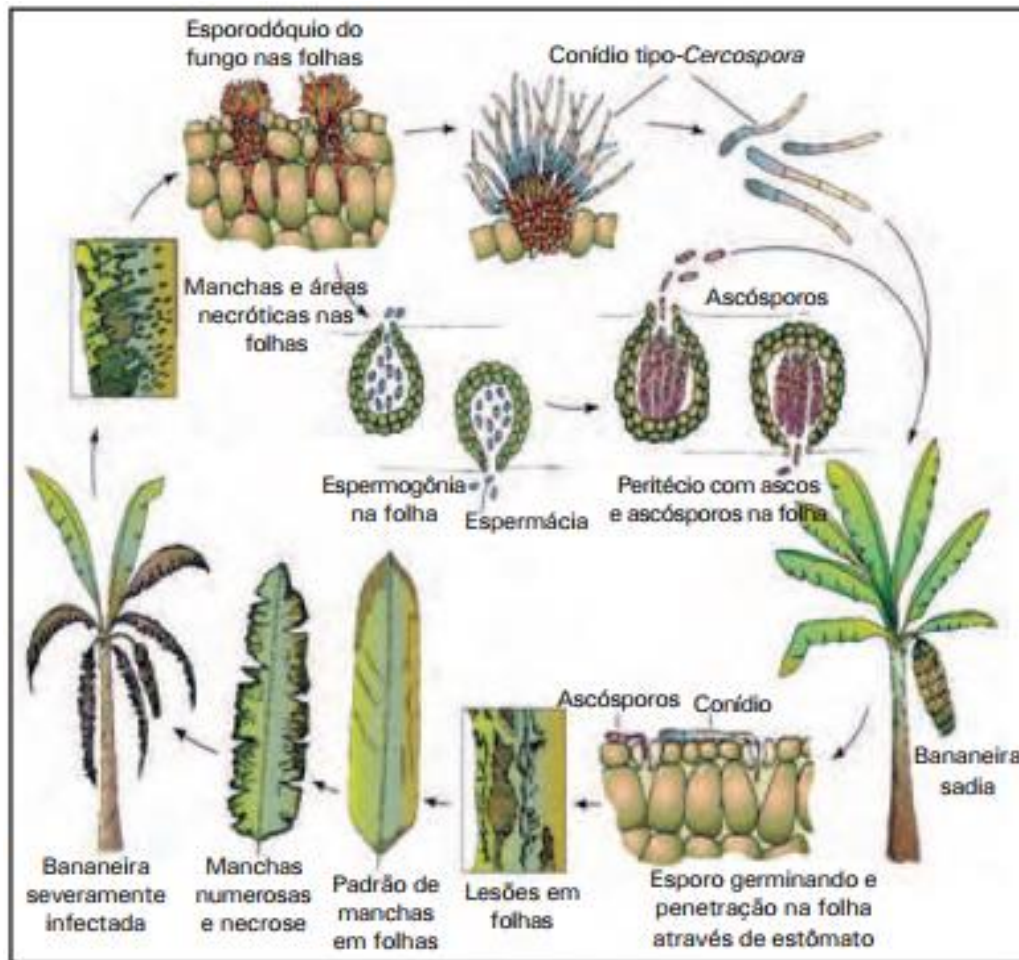
O controle químico pode ser inadequado tanto socioeconômico quanto ambientalmente, com tal controle necessitando de estratégias que não permitam o desenvolvimento da resistência do patógeno ao fungicida (MILLER *et al.*, 2008). As cultivares mais utilizadas

pelos agricultores (Prata, Pacovan, Maçã, Grande Naine e Terra) são suscetíveis a maioria das doenças fúngicas.

#### **2.4. Sigatoka-Amarela**

A sigatoka-amarela também é chamada de cercosporiose da bananeira, e seu agente etiológico é o fungo *Pseudocercospora musae* Zimm na fase anamórfica ou assexuada, e *Mycosphaerella musicola* Leach, na fase teleomórfica ou sexuada. A Sigatoka-amarela foi descrita pela primeira vez em Java por Zimmermann em 1902. No Brasil a Sigatoka-amarela foi descrita inicialmente em 1944, na região Amazônica e em 1952 foi detectada no estado de São Paulo e atualmente ocorre em todos os estados brasileiros (KIMATI; FILHO; CAMARGO, 1997). A doença é uma das mais importantes no país, onde é encontrada em todas as regiões, embora com maior relevância econômica nas regiões ou microrregiões produtoras onde as chuvas são frequentes e a temperatura se mantém próxima de 25°C. A região Sudeste é a que melhor se enquadra nessas condições e onde se encontra a maior concentração de cultivos de bananeira (CORDEIRO, 2000). A Sigatoka-amarela é fortemente influenciada pelas condições climáticas. Chuva, orvalho e temperatura são fundamentais para que ocorram infecção, produção e disseminação do inóculo, causando perdas médias de 50% na produção dos frutos das variedades suscetíveis (BORGES; MATOS, 2006). A doença afeta seriamente os cultivares de banana mais populares em todo o mundo, como é o caso das bananas de sobremesa (AAA e alguns genomas AAB) que pertencem ao subgrupo Cavendish e normalmente são cultivadas em monoculturas (CHURCHILL, 2011). *P. musae* é um fungo hemibiotrófico pertencente ao filo Ascomycota cuja infecção ocorre através de dois tipos de esporos, o sexuado denominado ascósporo e o assexuado conhecido como conídio. Três tipos de frutificação são produzidas no interior das lesões, sendo eles espermogônios, pseudotécios e esporodóquios (STOVER, 1970). Os espermagônios, formados no processo sexual de *Pseudocercospora*, produzem gametas masculinos, as espermácias, e o órgão feminino, uma hifa espiralada, formada no interior de ascomas jovens, denominadas tricóginas (WARDLAW, 1961). Em escala macroscópica, os espermogônios, assemelham-se às pontuações negras formadas pelas frutificações conidiais, porém com um formato delimitado de pontuação. Estas estruturas podem ser formadas em ambas as superfícies foliares, porém com maior predominância na abaxial. Sob microscópio de luz, os espermogônios são pequenas frutificações negras imersas em formato de frascos, que surgem no interior de uma base estromática de velhas frutificações conidiais ou independentemente. As espermácias, que

são formadas em longas cadeias, são minúsculas, oblongas e hialinas, com formato semelhante a bactérias, e podem ser visualizadas ou expelidas a partir de um ostíolo ou poro no ápice dos espermagônios (SIMMONDS, 1933). O ciclo de vida de *Pseudocercospora* spp. está ilustrado na figura 1.



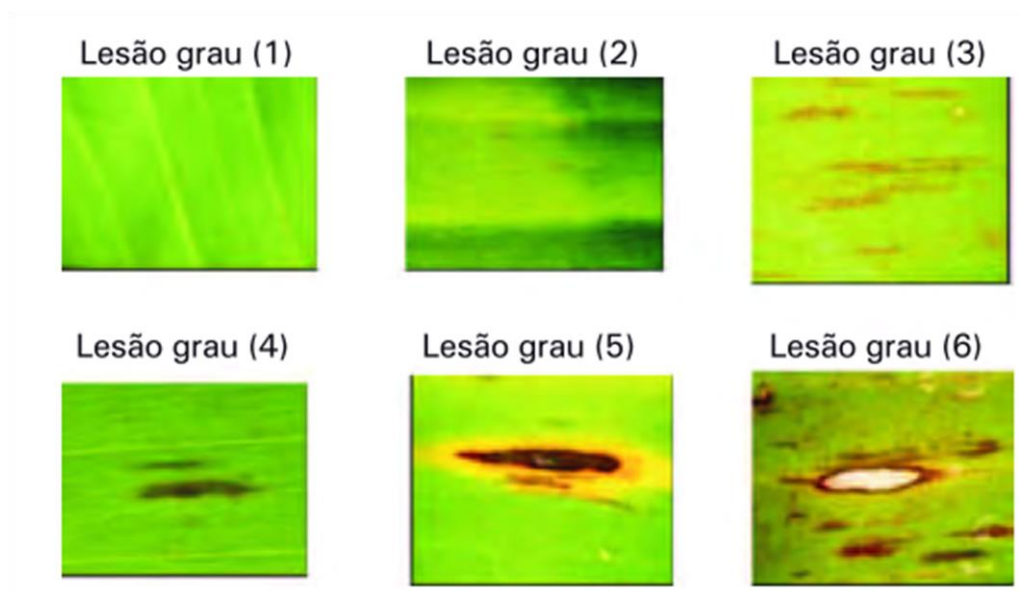
**Figura 1.** Ciclo de vida de *Pseudocercospora* spp em bananeira, mostrando as fases sexuada (teliomórfica) e assexuada (anamórfica) do patógeno (adaptado de Agrios, 2005).

Os conídios são formados no ápice dos conidióforos e ocorrem a partir dos primeiros estádios da lesão nas folhas (fase abaxial), que com a ação dos ventos e/ou água os conídios se desprendem dos conidióforos. Os esporos germinam no prazo de 2-3 horas depois de serem depositados sobre a superfície da folha, em condições de alta umidade e temperatura entre 25-29 °C. O tubo germinativo cresce durante vários dias (4-6 dias) antes de penetrar a folha através dos estômatos (STOVER R.H, 1980). Uma vez no interior da folha, hifas começam a se desenvolver e crescer de maneira que emergem através dos estômatos. Os ascósporos são produzidos nas mesmas lesões onde foram liberados os conídios anteriormente, e surgem mais tardiamente, sendo ejetados a partir dos pseudotécios em períodos de alta umidade à

noite, ou mesmo durante o dia, porém com ocorrências de orvalhos pesados (SIMMONDS, 1966).

#### 2.4.1. Sintomatologia da Sigatoka-amarela

As infecções causadas por Sigatoka-amarela ocorrem nas folhas mais jovens das plantas, incluindo as folhas zero (vela) (KIMATI; FILHO; CAMARGO, 1997). Meredith (1970) classificou o desenvolvimento das lesões em seis estádios: 1- Estádio inicial de listra – pontuação perceptível ao olho nú, com leve mancha de descoloração verde amarelada; 2 – Estádio de listra - a mancha aumenta de tamanho, permanecendo com cor verde amarelada; 3- Estádio de listra - a mancha começa a dilatar-se tornando o centro da lesão com coloração avermelhada enferrujada; 4- Primeiro estágio de mancha - a listra torna-se marrom escuro e, simultaneamente, forma-se um halo marrom visível à luz solar. Neste estágio a listra aumenta de tamanho sendo facilmente reconhecida como uma lesão circular; 5- Segundo estágio de mancha – halo torna-se de coloração mais escurecida; 6 – Terceiro estágio de mancha – a mancha encontra-se plenamente desenvolvida: porção central abaulada e de coloração cinza, halo de coloração marrom escuro ou preto (Figura 2).



**Figura 2.** Escala de Meredith (1970), para diferentes graus de desenvolvimento das lesões de Sigatoka-amarela.

A partir do estágio de mancha pode-se observar frutificações do fungo em forma de pontuações negras. Em estádios avançados da doença, principalmente em ataques severos, ocorre a coalescência das lesões e, conseqüentemente, uma grande área foliar é

comprometida, caracterizando o efeito mais drástico da mesma, que é a morte prematura das folhas. Manchas oriundas de infecções por ascósporos apresentam predominância apical, enquanto aquelas originadas a partir de conídios apresentam distribuição casualizada, mas com predominância basal, sendo comum a formação de linhas de infecção sobre o limbo foliar (KIMATI; FILHO; CAMARGO, 1997). Os sintomas característicos de Sigatoka-amarela podem ser observados na figura 3.



**Figura 3-** Sintomas característicos da Sigatoka-amarela. Foto: Tatiana Miranda

#### **2.4.2. Controle de Sigatoka-amarela**

Os prejuízos causados por Sigatoka-amarela são da ordem de 50%, mas em microclimas favoráveis, esses prejuízos podem atingir 100%, uma vez que os frutos, quando produzidos sem nenhum controle da doença não apresentam valor comercial (BORGES; SOUZA, 2004). Os fungicidas ainda são as ferramentas indispensáveis para o controle da Sigatoka, principalmente se tratando de variedades suscetíveis. A sua utilização, no entanto, deve ser baseada em uma série de cuidados de forma a minimizar os riscos ao homem e ao meio ambiente. A dependência de fungicidas mostra a importância da implementação de estratégias integradas para evitar a seleção de isolados do patógeno resistentes a fungicidas (MILLER *et al.*, 2008). Na América Central já ultrapassa mais de 50 aplicações anuais de fungicidas, ou seja, cinco vezes mais do que o número de aplicações que normalmente é utilizada para o

controle de Sigatoka. As consequências do uso excessivo de fungicidas são o aumento do custo da produção e o impacto negativo ao meio ambiente (FERREIRA *et al.*, 2015). O uso frequente de fungicidas sistêmicos também pode exercer uma pressão seletiva nas populações de patógenos e levar à emergência de linhagens resistentes capazes de competir com populações tipo selvagens. Considerando as limitações do uso de fungicidas, o melhoramento genético surge como uma abordagem promissora, a busca de cultivares resistentes às pragas e às doenças por meio da seleção dentro dos recursos genéticos existentes e pela geração de novas cultivares por hibridização são consideradas os meios mais eficientes de controle a patógenos (FERREIRA *et al.*, 2015).

## 2.5. Melhoramento genético em *Musa*

A maioria dos cultivares de bananeiras originaram-se a partir do cruzamento natural entre as duas principais espécies selvagens diplóides, *Musa acuminata* (genoma A,  $2n=2x=22$ ) e *Musa balbisiana* (genoma B,  $2n=2x=22$ ), resultando em genótipos com grupo genômico AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). A maioria dos cultivares comerciais de banana são triploides estéreis, com frutos sem sementes desenvolvidos por partenocarpia, fenômeno comum em bananeira, caracterizado pelo desenvolvimento do fruto sem a necessidade de fertilização (SILVA *et al.*, 2013). Estudos genéticos a respeito da partenocarpia sugerem que o controle genético é realizado por três genes complementares, sendo que a espécie selvagem *M. acuminata* Calcutta 4, há deficiência em um desses genes enquanto que os outros dois são homocigotos e dominantes (SIMMONDS, 1953). A ploidia, alta heterozigose, interespecificidade e baixa fertilidade gametofítica são fatores que dificultam o cruzamento desses cultivares limitando o melhoramento genético da bananeira. O fato da bananeira não produzir sementes contribui para a ausência de variabilidade genética o que resulta em lavouras com pouca resistência a pragas e doenças. Durante a evolução, genótipos com alta ploidia foram selecionados pelos agricultores, por causa do seu vigor e rendimento elevado. Dessa forma, genótipos triploides e tetraploides passaram a dominar as áreas de produção de banana (FERREIRA *et al.*, 2015). O programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA, conta com uma coleção de germoplasma oriundos de coletas nacionais e internacionais. Esse programa utiliza diferentes estratégias para o desenvolvimento dos cultivares, tais como, cruzamento de triploide com diplóide selvagens ou melhorados, cruzamentos de tetraploides com diplóides selvagens ou melhorados, duplicação de



cromossomos de diploides superiores e indução de mutação (SILVA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015). Com isso, vários avanços têm sido alcançados, como a busca de genes de importância em cultivares selvagens, fontes de resistência, como por exemplo, *M. acuminata* Calcutta 4, para que posteriormente possam ser transferidos à cultivares comerciais.

## **2.6. Imunidade vegetal (ETI e PTI)**

As plantas estão expostas constantemente a ambientes complexos, e muitas vezes são submetidas a tipos diferentes de estresses bióticos (fungos, oomicetos, nematoides, bactérias, vírus) e abióticos (déficit hídrico, alta salinidade, exposição à UV, variações de temperatura). Diversos organismos patogênicos podem prejudicar o crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas (JONES; DANGL, 2006). As interações entre planta e patógenos representam uma competição dinâmica entre um sistema imune robusto e estratégias de infecção eficientes.

### **2.6.1. Imunidade em plantas desencadeada por PAMPs- PTI**

As plantas não possuem um sistema imunológico análogo aos vertebrados, mas, no entanto, têm a capacidade de detectar o ataque por patógenos microbianos e responder com um amplo conjunto de respostas de defesa (FELIX *et al.*, 1999). A primeira linha de defesa das plantas pode ser disparada por meio do reconhecimento dos PAMPs (Padrões moleculares associados aos patógenos), resultando na ativação de defesa basal (ou não hospedeiro) da planta. Diversas moléculas microbianas são conhecidas como PAMP, dentre elas, lipopolissacarídeos (bactérias Gram-negativas), flagelina bacteriana, fator de alongação bacteriano Tu, glicoproteínas (oomicetos), peptidoglicano, ergosterol ou quitina de fungos, essenciais na sobrevivência do patógeno (ZHANG; ZHOU, 2010).

A imunidade disparada por PAMPs-PTI, anteriormente conhecida como resistência horizontal ou de não hospedeiro é determinada por mecanismos de defesa constitutiva que operam na planta sendo controlada por vários genes, por isso se diz que é poligênica ou multigênica. Este tipo de resistência é mais estável porque tem menor probabilidade do patógeno suplantar a resistência (QI *et al.*, 2011). Os PAMPs são detectados por receptores PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões) que normalmente são receptores quinases ou proteínas LRR-RLP, localizados na superfície celular. Alguns PRRs já são bem caracterizados em plantas, tais como o receptor RLP (*receptor-like protein*), contém um

domínio LysM (*Lysin Motif Receptor-like Kinase*) extracelular, que possui importante papel na percepção de oligossacarídeos de quitina. O receptor CEBiP (*chitin oligosaccharide elicitor binding protein*) uma proteína com alta afinidade a quitina, da qual foi isolada da membrana plasmática de células de arroz (*Oryza sativa*) (BOLLER; FELIX, 2009).

Os patógenos bacterianos de animais são conhecidos por secretar apenas um número limitado de efetores nas células hospedeiras, no entanto, patógenos de plantas tais como *Pseudomonas syringae* podem secretar aproximadamente 20 a 30 efetores durante a infecção (CHISHOLM *et al.*, 2006). A flagelina (flg22) é a principal proteína estrutural de flagelos bacterianos e é essencial para a motilidade bacteriana, sendo também um fator de virulência necessário para a patogenicidade bacteriana (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004). Essa flagelina é reconhecida por receptores PRR localizados na membrana plasmática da planta, conhecidos por FLS2, após o reconhecimento de efetores, ativa no citoplasma uma via de sinais MAP quinases e provavelmente os fatores de transcrição WRKY, provocando uma explosão oxidativa (ROS), alterações hormonais e reprogramação transcricional.

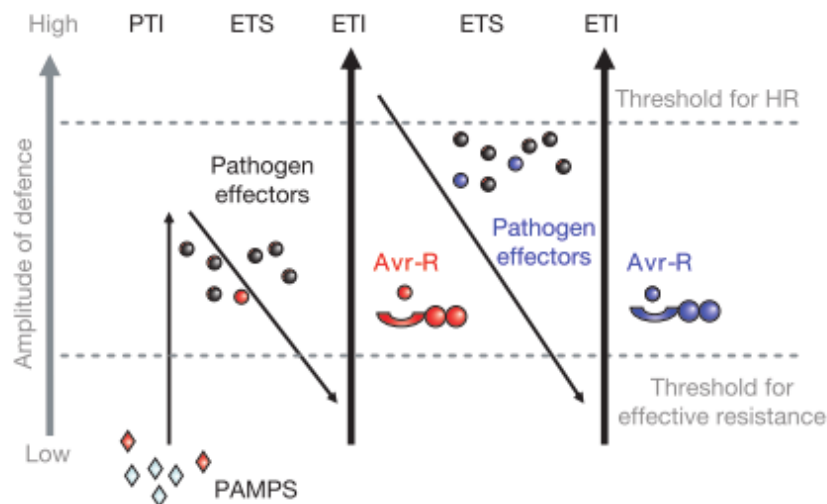
A detecção de PAMPs induz a deposição de calose, produção de espécie reativa de oxigênio (ROS), ativação de uma proteína associada ao mitógeno (MAP), acumulação de ácido salicílico (SA) e expressão de genes relacionados à patogênese (PR), impedindo ainda mais a colonização do hospedeiro, e confere resistência à maioria dos potenciais agentes patogênicos (YANG; HUANG, 2014).

### **2.6.2. Imunidade disparada por efetores- ETI**

Em um segundo ramo do sistema imune das plantas, patógenos podem superar a PTI, lançando efetores especializados, durante uma fase específica da interação planta-patógeno. Tais efetores são proteínas relativamente pequenas, com a habilidade de interferir em PTI (LO PRESTI *et al.*, 2015). Após a secreção e a translocação para a célula hospedeira, estes genes suprimem ou interferem na sinalização de PTI, resultando em plantas que são suscetíveis à infecção por agentes patogênicos. A doença então é o resultado desta suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (CHISHOLM *et al.*, 2006).

No entanto, as plantas desenvolveram um mecanismo de defesa que reconhece os efetores através das proteínas de resistência da família NBS-LRR, que possuem domínio de ligação a nucleotídeos (NB “nucleotide binding”) e repetições ricas em leucina (LRR “leucine rich repeat”) (DEYOUNG; INNES, 2006). Estes são codificados por genes *R* cujos produtos efetivamente reconhecem os efetores, por meio da interação gene a gene, e ativam uma

segunda linha de defesa, conhecida como imunidade disparada por efetores (ETI), anteriormente conhecida como resistência gene-a-gene ou resistência raça-específica. (JONES; DANGL, 2006) (Figura 4).



**Figura 4-Modelo “zigzag” do sistema imune em plantas, proposto por Jones e Dangl (2016).** Na primeira fase, as plantas detectam a população microbiana (PAMPs, diamantes vermelhos), desencadeando uma resposta de imunidade (PTI). Na segunda fase, patógenos entregam com sucesso efetores que interferem com a PTI, desencadeando a susceptibilidade por efetores (ETS). Na terceira fase, um efector (indicado na figura em vermelho, Avr) é reconhecido pelas proteínas NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), uma versão ampliada de PTI que muitas vezes induz a resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, novos efetores surgem através do fluxo horizontal de genes (em azul), ajudando os patógenos a suprimir a ETI. A seleção por parte das plantas de novos alelos de proteínas NB-LRR, que podem reconhecer um dos efetores recém adquiridos, dispara novamente a ETI.

A teoria gene-a-gene define que para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro (R gene) existe um gene complementar no patógeno que condiciona a virulência (Avr gene). Quando os dois, planta e patógeno, entram em contato, acontece um reconhecimento do produto do gene Avr pelo produto do gene R. Nesse caso, o gene R funciona como um receptor que é induzido ao receber um sinal externo (o patógeno tentando atacar a planta), liberando uma cascata de sinais que são traduzidos para que se obtenha uma resposta de defesa (FLOR, 1971).

Inúmeros genes de resistência (R) de plantas já foram caracterizados até o momento, pelo menos cinco classes de genes R são reconhecidas, com base na organização de motivos de aminoácidos conservados e seus domínios de membrana. Os exemplos dessa classe de genes de resistência incluem, RPS2 e RPM1 que conferem resistência a *Pseudomonas*

*syringae* em *Arabidopsis* (REUBER; AUSUBE, 1996), e I2 que confere resistência a raça 2 de *Fusarium oxysporum f. sp.lycopersici* em (*Solanum lycopersicum*) (WEI *et al.*, 2014).

A principal classe de genes R inclui os genes que codificam para proteínas da superfamília NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site e Leucine-rich Repeat*), estudos evidenciam que a única função conhecida para esta família está na resistência a doenças (MEYERS; KAUSHIK; NANDETY, 2005). Os domínios NBS estão envolvidos na sinalização, e eles incluem vários motivos altamente conservados e estritamente ordenados, como os motivos P-loop, quinase-2 e Gly-Leu-Pro-Leu. Já os LRRs são domínios estruturais altamente adaptáveis que são dedicados às interações proteína-proteína (MARONE *et al.*, 2013).

As análises genômicas comparativas têm indicado que os genomas das plantas podem codificar várias centenas de genes NBS-LRR e que há uma grande diversidade no número e na distribuição das subclasses desses genes. Atualmente cerca de 653 genes da família NBS-LRR foram descritos em *Oryza sativa* (SHANG *et al.*, 2009), 149 em *Arabidopsis* (MEYERS *et al.*, 2003), 89 em *M. acuminata* DH-Pahang (D'HONT *et al.*, 2012), 459 em *Vitis vinifera* (YANG *et al.*, 2008), 50 em *Cucumis sativus* (PORTER *et al.*, 2009) e 319 em *Glycine max* (KANG *et al.*, 2012).

A resistência baseada em ETI envolve várias vias de transdução de sinal e muitas vezes resultam em resposta de hipersensibilidade (HR), ou seja, morte celular programada das células vegetais atacadas pelo patógeno limitando o avanço do patógeno. Os mecanismos de sinalização desencadeados pela PTI e ETI permitem rápida comunicação entre diferentes partes da planta. Tais mecanismos envolvem moléculas que atuam em longas distâncias como fitohormônios, assim como as de alcance local ou órgão específico, tais como peptídeos, fatores transcricionais e alguns pequenos RNAs (SPARKS; WACHSMAN; BENFEY, 2013).

Entre outros fatores, a ativação das respostas de defesa envolve uma regulação do equilíbrio de fitormônio como o ácido salicílico (AS), etileno (ET) e o ácido jasmônico (JA) (ZVEREVA; POOGGIN, 2012). Espécies transgênicas e mutantes com deficiência na biossíntese hormonal apresentaram uma grande alteração no nível de resistência a patógenos específicos, demonstrando a importância da regulação hormonal no desencadeamento de respostas de defesa. Estudos deixam evidente que patógenos biotróficos e hemibiotróficos são geralmente sensíveis à respostas de defesa que são reguladas por AS, enquanto patógenos com o modo de vida necrotrófico são comumente impedidos pelas defesas controladas por JA e ET (GLAZEBROOK, 2005).

Um sistema imune robusto protege as plantas dos agentes patogênicos, mas também compete pelos recursos limitados disponíveis para o crescimento e o desenvolvimento das

plantas (DENANCÉ *et al.*, 2013). As plantas expostas a PAMPs ou com proteínas NBS-LRR ativadas em excesso, geralmente são de tamanho reduzido, refletindo uma compensação entre defesa e crescimento. (FELIX *et al.*, 1999). Estudos recentes revelam que os pequenos RNAs desempenham papel fundamental na regulação da resposta imune, bem como no desenvolvimento normal da planta (YANG; HUANG, 2014). Pequenos RNAs estão emergindo como reguladores versáteis no desenvolvimento, crescimento e resposta das plantas aos estresses bióticos e abióticos. Eles atuam em diferentes níveis de imunidade das plantas, incluindo PAMPs e ETI (YANG; HUANG, 2014).

## **2.7. RNAs não codificadores (ncRNAs)**

Os pequenos RNAs não codificantes de proteínas (ncRNAs, do inglês, “non-protein coding small RNAs”) são macromoléculas, que não codificam proteínas, mas que desempenham funções regulatórias importantes nas células, são amplamente expressos em procariotos e eucariotos, cerca de 98% de toda a produção transcricional em humanos é de RNA não codificante (MATTICK, 2001). As famílias de ncRNAs são agrupadas em ncRNA estrutural e ncRNAs regulatório com base em sua estrutura e função. O ncRNA estrutural incluem RNA de transferência (tRNA), RNA ribossômico (rRNA) e pequenos RNAs como RNAs nucleares (snRNA) e os pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) (QU *et al.*, 2016). Já os ncRNA regulatórios incluem os pequenos RNAs (sRNAs) como os miRNAs, pequenos RNAs interferentes (siRNAs) e os RNAs longos (lncRNAs) (LI *et al.*, 2014). Estes ncRNAs desempenham papéis importantes em splicing, transcrição, tradução, arquitetura de cromatina, e muitos ncRNAs estão associados a doenças (CHEN *et al.*, 2015). Os ncRNAs regulam uma infinidade de processos biológicos em plantas, como desenvolvimento, metabolismo, imunidade contra agentes patogênicos e resposta a estresse abiótico. Há evidências que sugerem que os pequenos RNAs desempenham papéis cruciais na regulação da interação do agente patogênico com as plantas (KATIYAR-AGARWAL; JIN, 2010). Recentemente alguns ncRNAs também foram identificados por métodos experimentais e computacionais, porém o estudo de pequenos RNAs ainda é escasso, principalmente em estudos de interação planta patógeno (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2013; QU *et al.*, 2016).

### 2.7.1. MicroRNAs (miRNAs)

Estruturalmente, os miRNAs são pequenas moléculas de RNAs dupla-fita e endógenos com aproximadamente 22 nucleotídeos de tamanho, cuja principal função é regular a nível pós-transcricional RNAs mensageiros-alvos (mRNA) por meio do pareamento de bases específico, resultando na clivagem do mRNA ou na inibição de sua tradução (LI *et al.*, 2014; SU *et al.*, 2017). Os miRNAs são moléculas conhecidas pela capacidade de controlar a expressão de genes nas células da maioria dos organismos eucariotos (CUI; YOU; CHEN, 2017), e funcionam como moléculas guia em diversas vias de silenciamento gênico (LEE *et al.*, 2004). Estudos mostram que os miRNAs não só influenciam o crescimento e o desenvolvimento de organismos, regulando os fatores de transcrição, mas também degradam os mRNA de genes alvo, ou impedem a tradução do gene alvo para mudar o comportamento celular das plantas através inúmeras vias fisiológicas, como a hidrólise de proteínas, metabolismo e transporte de íons, bem como as vias de transdução de sinal (SU *et al.*, 2017). Os miRNAs são codificados por genes *MIR*, os quais se encontram largamente distribuídos no genoma de plantas e animais (BARTEL, 2013). Em plantas, os genes *MIR* estão localizados principalmente no interior de regiões intergênicas, apresentando suas próprias unidades de transcrição, caracterizadas por regiões promotoras e terminadoras (ROGERS; CHEN, 2013).

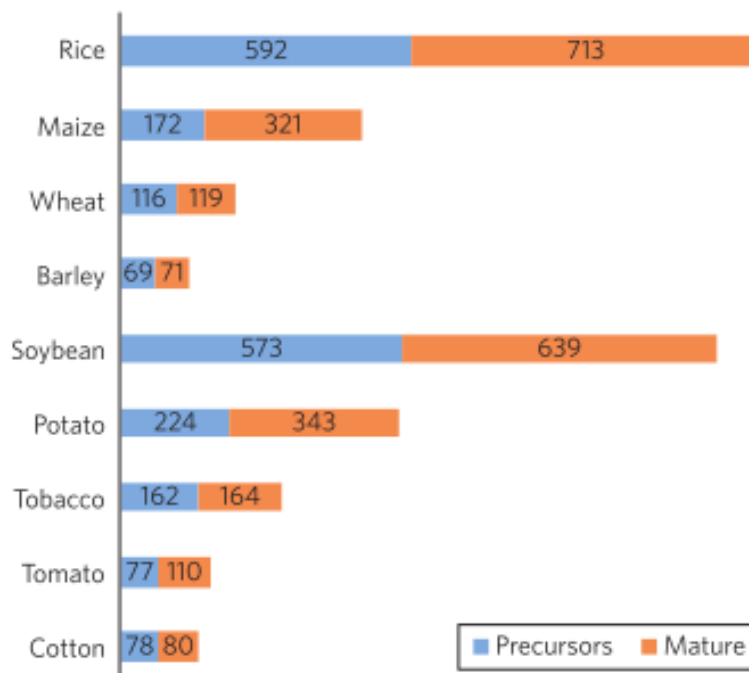
O primeiro miRNA foi descrito em 1993, com o *lin-4* (*lineage-deficient-4*) identificado como regulador pós-transcricional do gene *lin-14*, que está envolvido no controle do desenvolvimento larval do nematoide *Caenorhabditis elegans*. Foi descoberto que o gene *lin-4* não codificava uma proteína, mas expressava um pequeno RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos. Essa descoberta permitiu a descrição de um novo mecanismo de regulação gênica, pelo qual o transcrito de *lin-4* regula negativamente a tradução do transcrito de *lin-14* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993).

Desde a descoberta desse primeiro miRNA em *C. elegans*, diversos miRNAs têm sido identificados em muitos organismos, incluindo animais, plantas e eucariotos unicelulares (KANG *et al.*, 2013). A presença de miRNAs em organismos unicelulares sugere que a via de ação de miRNA é um antigo mecanismo de regulação de genes (ZHAO *et al.*, 2007). Em plantas, os miRNAs desempenham papéis importantes no desenvolvimento, crescimento, sinalização hormonal, formação de raízes laterais, tempo de floração, metabolismo, imunidade inata e resposta ao estresse biótico e abiótico (SUNKAR; JAGADEESWARAN, 2008). Estratégias computacionais e experimentais têm demonstrado que muitos miRNAs, assim como seus alvos, são conservados entre espécies de monocotiledôneas (arroz) e

dicotiledôneas (*Arabidopsis thaliana*) (ZHANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004).

A identificação de miRNAs foi iniciada principalmente por clonagem direta e sequenciamento Sanger, que levou a descoberta de miRNAs mais abundantemente expressos, os quais, em sua grande maioria compreendem a família de miRNAs conservados. Os primeiros miRNAs de plantas, tais como miR156, miR159, miR164 e miR171 foram descritos em *Arabidopsis*, isolando, clonando e sequenciando pequenas populações de miRNA (REINHART *et al.*, 2002). Nas últimas décadas a aplicação crescente de utilização de sequenciamento de nova geração (NGS) tem se provado extremamente útil na descoberta de miRNAs em várias espécies, assim como a identificação de alvos em plantas nas mais diversas condições fisiológicas tais como, por exemplo, estresse biótico e abiótico (PELÁEZ *et al.*, 2012).

Estratégias computacionais têm sido amplamente utilizadas para identificar miRNAs em plantas. Os miRNAs de plantas exibem um alto grau de complementaridade de sequência para seus mRNAs alvos, e através de ferramentas de bioinformática é possível identificar miRNAs conservados em bancos de sequências de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (DJAMITCHATCHOU *et al.*, 2017). A identificação de miRNAs levou a criação de banco de dados contendo informações pesquisáveis sobre miRNAs. A ferramenta mais utilizada é o miRBase (<http://www.mirbase.org/>) que é um banco de dados de miRNA. De acordo com registros no miRBase (versão 21), 2.560 miRNAs maduros codificados para 2.063 precursores, foram identificados através de abordagens experimentais ou computacionais das principais culturas de arroz, milho, trigo, cevada, soja, batata, tabaco, tomate e algodão (TANG; CHU, 2017) (Figura 5).



**Figura 5-** Número de miRNA maduros e seus precursores de nove grandes culturas depositadas no miRBase. Fonte: Tang e Chu, 2017.

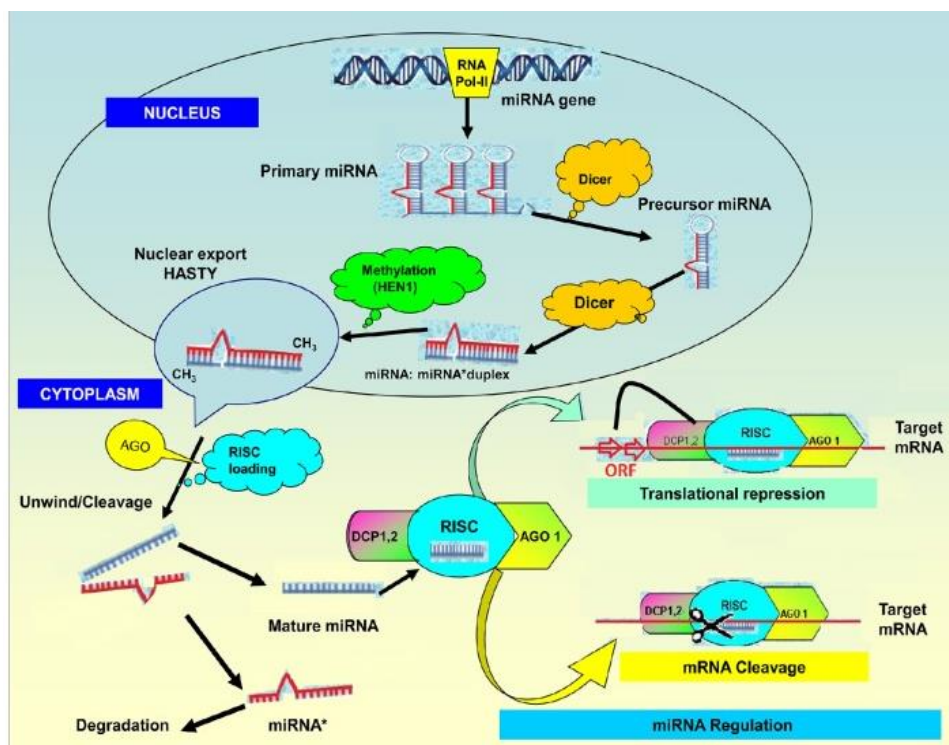
### 2.7.1.2. Biogênese dos miRNAs

A maioria das plantas possuem mais de 100 genes de miRNA (ou genes *MIR*), localizados principalmente em regiões intergênicas em todo o genoma (NOZAWA; MIURA; NEI, 2012). A biogênese do miRNA começa no núcleo, inicia-se pela transcrição do seu gene pela RNA polimerase II de locus endógeno *MIR* (LEE *et al.*, 2004), gerando um longo transcrito de miRNA primário, chamado de pri-miRNA. Esse pri-miRNA apresenta uma estrutura em formato de grampo (*hairpin*) imperfeita, à qual é clivada ainda no núcleo pela enzima RNase III, denominada *DICER- LIKE 1* (DCL1) em associação com outras proteínas, tais como, *HYPONASTIC LEAVES 1* (HYL1) e *SERRATE* (SE) em precursores de miRNA (pré-miRNA). Ainda no núcleo, o pré-miRNA é novamente clivada pela DCL1 para gerar o duplex imperfeito que contém tanto o miRNA maduro quanto a sua fita complementar denominado miRNA\*. O duplex miRNA:miRNA\* são então metilados na extremidade 3' por ação de uma metiltransferase denominada HEN 1, prevenindo assim sua degradação (YU *et al.*, 2005). O duplex é transportado do núcleo para o citoplasma com ajuda da enzima *HASTY* (HST) (PARK *et al.*, 2005). No citoplasma o duplex miRNA:miRNA\* é separado e o miRNA maduro é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que contém a enzima ARGONAUTA 1 (AGO1), enquanto que o miRNA\* é excluído do RISC e consequentemente exposto para degradação. Finalmente o miRNA maduro orienta a proteína



(AGO) para os mRNAs complementares. Os miRNA que possuem homologia alta com os mRNAs alvos levam à clivagem do mRNA, enquanto que os miRNAs com bases mal pareadas com o mRNA alvo conduzem à inibição da tradução (VOINNET, 2009) (Figura 6).

Como descrito acima, os processos de biogênese e ação de miRNAs requerem a combinação e interações físicas de várias enzimas e/ou proteínas. O arroz (*Oryza sativa* L.), possui seis genes DICER-LIKE (OsDCL), sendo a OsDCL1 a maior enzima para a produção de miRNAs maduro. Plantas mutantes com forte perda de função de OsDCL1 não são viáveis, além de apresentar suscetibilidade alterada durante a infecção por fungos filamentosos (HUANG; LI; ZHAO, 2016). Mutantes de *Arabidopsis* *dcl1-9* (incapazes de sintetizar miRNAs) são prejudicados em PTI, e apresentam maior suscetibilidade à infecção bacteriana, enquanto que o mutante de *Arabidopsis* *dcl1-7*, é mais suscetível à infecção pelo fungo *Botrytis cinerea* (WEIBERG *et al.*, 2014).



**Figura 6-** Modelo da biogênese e mecanismos de ação de miRNAs em plantas (Retirado de DJAMI-TCHATCHOU *et al.*, 2017)

### 2.7.1.3. O papel de miRNAs em planta e no fungo

As plantas possuem duas principais classes de pequenos RNAs, os miRNAs e o siRNAs, ambos possuem tamanhos semelhantes, mas diferem em estruturas precursoras, caminhos de biogênese e modos de ação (AXTELL, 2013). Os miRNAs e os siRNAs atuam

de maneira semelhante, regulando de forma negativa os seus mRNAs alvos. Os miRNAs são processados a partir de transcritos endógenos, já os siRNAs derivam do próprio mRNA alvo, transcrito a partir de um transposon, vírus ou transgene (ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005). Os miRNAs de plantas e animais apresentam algumas características distintas na sua biogênese e nas enzimas envolvidas no processamento de seus precursores. As plantas apresentam complementariedade quase perfeita com seu mRNA alvo (com poucos erros de pareamento, entre um a três normalmente (VOINNET, 2009), já nos animais a sua complementariedade é parcial entre o miRNA e o mRNA alvo (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

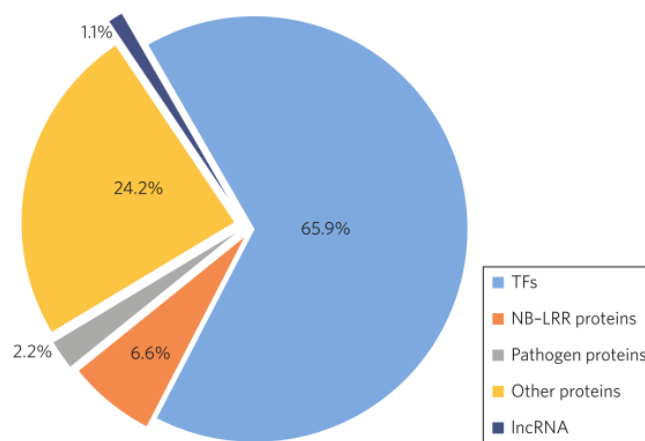
Em plantas foi verificado que os miRNAs regulam a expressão de genes que codificam fatores de transcrição (TFs), proteínas de resposta ao estresse e outras proteínas que afetam o desenvolvimento, crescimento e fisiologia das plantas (ROGERS; CHEN, 2013). Aproximadamente 66% dos seus alvos são fatores transcricionais, indicando claramente que os miRNAs desempenham papel importante nas redes de regulação gênica (TANG; CHU, 2017) (Figura 6).

Os TFs são conhecidos por serem reguladores críticos no desenvolvimento de plantas ou de resposta de estresse, já se compreende que o miR157/156 e 529 regulam negativamente fatores de transcrição da família SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) que desempenham papéis importantes na transição de fase da planta, desenvolvimento de flores e frutos, arquitetura de planta, sinalização de giberelinas, esporogênese e resposta a toxinas de cobre e fungos (CHEN *et al.*, 2010). O miR160 ou 167 têm como alvos os fatores de resposta à auxina (ARFs), que estão envolvidos em resposta de defesa e apresentam papéis importantes em vários estágios no desenvolvimento das plantas (HUANG; LI; ZHAO., 2016; LIU *et al.*, 2014). A família de TFs APETALA 2 (AP2) é alvo do miR172 que, quando superexpresso em *Arabidopsis*, causa floração precoce e interrompe a especificação dos órgãos florais (AUKERMAN; SAKAI, 2003).

Estudos recentes, evidenciam que os miRNAs desempenham papéis importantes nas respostas do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) à murcha bacteriana, doença causada pela bactéria (*Ralstonia solanacearum*) que reduz significativamente a produção (ZHAO *et al.*, 2015). Após a infecção, vários miRNAs (miR3516, miR159, miR894, miR2199, miR1511, miR162, miR530, miR2118, miR396, miR3513, miR482, miR156/157, miR169, e miR166) foram regulados positivamente, e alguns miRNAs (miR397, miR1508, miR4144, miR3515, miR408, miR2111 e miR3522) foram regulados negativamente. A predição dos genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos, revelaram que mais de 10% dos genes alvo preditos

eram genes de resposta à defesa, que incluíam: aquaporina, fatores de resposta de auxina, família GRAS de TFs, proteína de resposta induzida por hipersensibilidade, leucine-rich repeat (LRR) serina/treonina quinases, proteína de transferência de lipídeos e TFs MYB (ZHAO *et al.*, 2015).

Uma outra classe de genes preferencialmente direcionada por miRNAs é uma classe importante de genes R (resistência) que codificam proteínas que possuem domínio de ligação a nucleotídeos (NB “nucleotide binding) e repetições ricas em leucina (LRR “leucine rich repeat”) (DEYOUNG; INNES, 2006). Estudos recentes mostram que os miRNAs são importantes para respostas imunes de plantas contra vírus, bactérias, oomicetos e fungos (FEI *et al.*, 2016; NAVARRO, 2013; SEO *et al.*, 2013) modulando as vias de miRNA após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógeno ou efetores do patógeno. Após a infecção, plantas de *Arabidopsis* detectam PAMPs e modulam a acumulação de miRNA e siRNAs. O envolvimento de miRNAs nas respostas de PTI foi demonstrado pela primeira vez em *Arabidopsis*, onde a percepção de flg22, um peptídeo derivado da flagelina bacteriana, causa um aumento na acumulação de miR393. Isso por sua vez regula negativamente os transcritos para receptores de auxina F-box (AFB), TIR1, AFB2 e AFB3, com a repressão da sinalização de auxina resultando em resistência bacteriana (NAVARRO *et al.*, 2006). Este estudo estabeleceu claramente uma ligação entre o funcionamento do miRNA, a sinalização hormonal e a imunidade nas plantas. Em batata, tomate e algodão, a superfamília miR482/2118 demonstrou regular um subconjunto de genes NB-LRR, visando as sequências conservadas que codificam o motivo P-loop nas sequências de mRNA de proteínas R (OUYAHG *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015). Em tomate (*Solanum lycopersicum*), os níveis de miR393/160 e 167 são induzidos durante a progressão da doença causadas por vírus, *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV).



**Figura 7-** Categoria funcional dos genes alvo dos miRNAs. Fonte Tang e Chu, 2017

Estresses abióticos como a seca também induzem a expressão de miRNAs. MUTHUSAMY *et al* (2014) evidenciaram o aumento da expressão dos miR156, miR169 e miR211 em *Musa* em condição de déficit hídrico, sugerindo, assim, que esses podem ser um novo alvo para o melhoramento genético na tolerância das plantas à seca e outros estresses abióticos.

Estudos recentes em arroz também evidenciaram que o miR393 (OsmiR393) tem como alvo dois genes homólogos de receptores de auxina (OsTIR1 e OsAFB2), e que este miRNA foi altamente expresso em condição de seca. A sua superexpressão resultou na tolerância a seca, assim como salinidade (XIA *et al.*, 2012). Em outros estudos relacionados a temperaturas extremas (frio ou calor), foram identificados vários miRNAs (miR167, miR319, miR812q e miR1425), que desempenham papéis importantes na modulação da expressão de seus genes alvos em resposta a condição de frio. OsmiR397 foi relatado como um miRNA de alta temperatura que responde e modula a expressão de L-ascorbato oxidase ( OsLAC ) em resposta ao estresse térmico e à adaptação do arroz (JEONG *et al.*, 2011).

Os fungos filamentosos são um grupo importante de eucariotos multicelulares com mais de um bilhão de anos de evolução (DANG *et al.*, 2011). Uma variedade de pequenos RNAs (sRNA) e RNAi já foram identificados em fungos filamentosos, incluindo *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Metarhizium anisopliae*, *Zymoseptoria tritici* (P. Crous; syn. *Mycosphaerella graminicola*, *Septoria tritici*) (LEE *et al.*, 2010; ZHOU; FU; XIE, 2012; CHEN *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2012; GOODWIN *et al.*, 2011). *Z. tritici* foi o primeiro fungo filamentoso a ter seu genoma mais bem sequenciado, e através do sequenciamento GOODWIN *et al* (2011) identificaram 418 lócus de pré-microRNA-like (milRNA) que codifica para 385 sequências de pré milRNA não redundantes, que podem

resultar em miRNAs maduros distinguíveis. ZHOU *et al* (2012), através do sequenciamento Illumina, identificaram um outro fungo fitopatogênico, *Sclerotinia sclerotiorum*, e através de resultados de Northern blot e RT-PCR, foram evidenciados que alguns miRNAs são diferencialmente expressos no desenvolvimento do escleródio, sugerindo o papel desses miRNAs neste processo biológico.

ZHANG *et al* (2016) evidenciaram que, em resposta a infecção ao patógeno fúngico *Verticillium dahliae*, as plantas de algodão aumentam a produção do miR166 e miR159 e exportam as hifas fúngicas para o silenciamento específico de dois genes de *V. dahliae*, *Clp-1* que codifica uma protease de cisteína dependente de Ca<sup>2+</sup>, e *HiC-15* uma hidroxilase C-15 isotrichodermina, ambos genes essenciais para a virulência do fungo. Esse estudo evidencia uma nova estratégia de defesa das plantas contra fungos patogênicos, através da exportação de miRNAs específicos de plantas hospedeiras colonizadas, para induzir o silenciamento específico de genes de virulência fúngica (TANG; CHU, 2017). De forma semelhante, WEIBERG *et al* (2013), demonstrou que o patógeno fúngico *Botrytis cinerea* tem a capacidade de sequestrar a maquinaria de RNA de interferência (RNAi) do hospedeiro, esse patógeno transfere pequenos RNAs para plantas hospedeiras para suprimir sua imunidade e atingir a infecção. Ambos os resultados evidenciaram um modelo de interação planta-patógeno interessante, e possivelmente comum, em que os pequenos RNAs foram usados por ambos os lados como armas para lutar entre si.

### **3. JUSTIFICATIVA**

---

*Pseudocercospora musae* é um dos principais fitopatógenos da bananeira, responsável por grandes perdas da produção, sendo o agente causal da Sigatoka-amarela. A doença vem sendo controlada principalmente com a aplicação de agroquímicos, degradando o meio ambiente, promovendo a adaptação dos organismos patogênicos, além de encarecer a produção. Dessa forma, uma medida de controle mais recomendável seria o desenvolvimento de plantas resistentes.

Os microRNAs estão envolvidos no estresse biótico e abiótico, tendo um papel importante na imunidade vegetal. A literatura para miRNA de fungos é bastante escassa, muito pouco foi investigado a esse respeito. Com o objetivo de contribuir com novos dados de miRNA para o conhecimento sobre a regulação gênica no patógeno e os potenciais genes alvos de silenciamento tanto no fungo quanto na planta, os miRNA de *P. musae in vitro* foram identificados nesse trabalho.

Os genes de referência são empregados com o objetivo de normalizar a expressão gênica de genes alvo em RT-qPCR, e há uma escassez de trabalhos de genes de referência em *Musa acuminata – P.musae*. Esse trabalho tem o objetivo de contribuir com genes de referência mais estáveis durante a interação planta x patógeno.

## **4. OBJETIVOS**

---

### **4.1. Objetivos gerais**

- Caracterizar os componentes moleculares presentes na interação *M. acuminata* – *P. musae* que exerçam possíveis papéis na defesa da planta frente à infecção.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Isolar e caracterizar isolados de *P. musae* obtidos a partir de folhas sintomáticas de plantas de *M. acuminata*;
- Extrair o RNA total de folhas de *M. acuminata* Calcutta 4 (resistente) e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine (suscetível) inoculadas e não inoculadas com o patógeno *P. musae*;
- Identificar e caracterizar genes de referência com expressão constitutiva, entre diferentes condições experimentais;
- Analisar a expressão diferencial de genes envolvidos em respostas aos estresses bióticos, a partir de dados de projetos anteriores de transcriptômica, em genótipos de *M. acuminata* contrastantes em resistência, desafiados com *P. musae* e *P. fijiensis*;
- Sequenciar os miRNAs de *P. musae*, utilizando a tecnologia Illumina;
- Analisar os resultados obtidos para classificar os miRNAs e contribuir com novos dados genômicos para este gênero;
- Identificar os alvos gênicos de miRNAs em *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine, com objetivo de contribuir com novos conhecimentos sobre os mecanismos de defesa e suscetibilidade da planta frente à infecção.

## **5. METODOLOGIA**

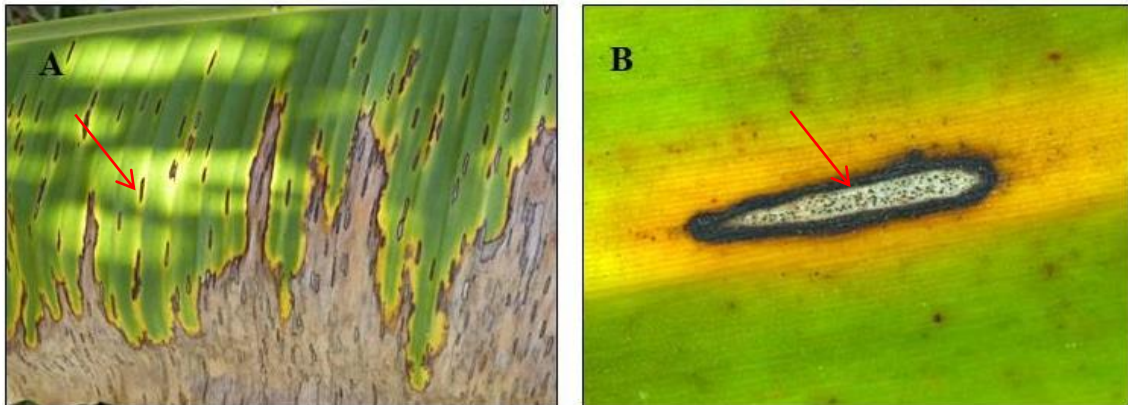
---

### **5.1. Caracterização, identificação e manutenção dos isolados de *P. musae***

A coleção de *P. musae* do presente trabalho possui seis isolados, cinco coletados na Estação Experimental de Biologia, em Brasília, e um proveniente da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. Todos os isolados apresentaram características morfológicas típicas da espécie *P. musae*. Os isolados foram identificados da seguinte forma: 018bBA - Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA; 01EB - isolado em Brasília; 12EB - isolado em Brasília; 15EB - isolado em Brasília; 55EB - isolado em Brasília; e 90EB - isolado em Brasília.

Os isolados de *P. musae* foram isolados de folhas com lesões típicas de Sigatoka-amarela. As lesões foram analisadas em microscópio estereoscópico (Figura 8 e 9), onde foi possível observar as características morfológicas do fungo, os conidiósporos foram coletados a partir dos esporodóquios e transferidos para meio de cultura V8 (450ml de água destilada, 1g de CaCO<sub>3</sub>, 9 g de Ágar, 50ml de suco de Vegetais *Campbell's* V8, 167mg de cloranfenicol). Para a multiplicação dos isolados, as colônias presentes em cada placa de petri foram maceradas com o auxílio de pistilo e cadinho com adição de 5ml de água destilada esterilizada 300µl dessa suspensão foram transferidos para meio de cultura V8, em seguida foram espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski (Figura 10). Todas as placas foram mantidas em BOD com fotoperíodo de 12h luz/ escuro e temperatura de 25°C. As culturas foram preservadas em água destilada em papel filtro esterilizados.





**Figura 8**-Lesões típicas de Sigatoka-amarela em folha de bananeira. A- Seta vermelha: diferentes graus de lesões na face adaxial; B- Seta vermelha: Formação de esporodóquios sobre as lesões



**Figura 9**- Seta vermelha: Conidiósporo de *P. musae* observado em microscópio de luz em folha inoculada de *Musa acuminata*. (barra: 10µm)



**Figura 10** - Etapas do processo de multiplicação de *P. musae* para produção de inóculo (A- F). Produção de um macerado a partir de colônias do fungo (A e B); Adição de água e maceração do fungo (C e D); Adição do macerado sobre o meio V8 e o macerado espalhado com alça de Drigalski (E e F). Foto: Tatiana Pinheiro

## 5.2. Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir dos isolados mencionados no item anterior. O micélio de isolados de *P.musae* cultivados em placas de Petri com meio V8, por 30 dias, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, seguindo o protocolo de extração fenol clorofórmio (adaptado de GONZÁLEZ-MENDOZA *et al.*, 2010). O micélio de cada isolado foi raspado da placa com auxílio de um escalpelo e colocado em cadinho para maceração com N<sub>2</sub> líquido. Os materiais resultantes das macerações foram transferidos para tubos microtubos de 1,5 ml onde adicionou-se 500 µL da solução de tampão de extração (Tris HCl a 200 mM, pH 8,5, EDTA a

25 mM, SDS-Sódio Dodecil-Sulfato a 0,5%, água ultra-pura). Após a homogeneização foram adicionados 350 µl de fenol e 150 µl de clorofórmio, a solução foi cuidadosamente homogeneizada e centrifugada a 11.800 g a 4 °C por 30 minutos, o sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos de 1,5 ml e adicionado 10 unidades de Ribonuclease A e incubadas a 37 °C por 15 minutos. Foi adicionado aproximadamente 1 ml de clorofórmio ao volume coletado. Em seguida, efetuou-se nova centrifugação a 11.800 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5 ml. O DNA foi precipitado com a adição de isopropanol gelado na proporção de 0,54 vezes o volume coletado. As amostras foram novamente centrifugadas por 2 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70%. O precipitado foi seco e ressuscitado em 50 µl de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM). O DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

### 5.2.1. Identificação molecular dos isolados de *P. musae*

Para a realização da identificação molecular de *P. musae*, a região ITS (*Internal transcribed spacer*) do rDNA (DNA ribossômico), parte do gene da histona H3 (HIS), actina (ACT) e fator de alongação 1 $\alpha$  (EF) de todos os seis isolados foram caracterizados. A região ITS do DNA ribossômico foi amplificada com *primers* universais para fungos ITS4 e ITS5 (WHITE *et al.*, 1990). Foi preparada uma solução para a PCR, em microtubos de 0,2 mL, para um volume final de 12,5 µL, contendo 10 ng de DNA, 10 µM de cada *primer*, 6,25 de MyTaq™ Master Mix (Bioline, USA) e 4.25 µL de água MilliQ esterilizada foi adicionada para completar o volume final. A reação foi conduzida em termociclador Agilent SureCycler 8800, sob as seguintes condições: 1 ciclo para etapa inicial de desnaturação (95°C por 5 min), seguido de 35 ciclos com uma etapa de desnaturação (95 °C por 20 seg.), uma de anelamento (59 °C por 45 seg.) e uma de extensão (72 °C por 50 seg.) e extensão final (72 °C por 5 min). O mesmo foi realizado para amplificação de parte do gene da HIS, utilizando os *primers* H3-1a/ H3-1b (GLASS; DONALDSON, 1995), do gene da ACT, com os *primers* ACT-512F/ACT-783R (CARBONE; M.KOHN, 1999), e do gene do EF, com os *primers* EF1-728F/EF1-986R (CARBONE; M.KOHN, 1999) (Tabela 1), com a temperatura de anelamento, respectivamente, de 52 °C, 58 °C e 62 °C. Os produtos das reações de PCR foram visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% na presença de brometo de etídio (1 µg mL<sup>-1</sup>), U.V. a 254 nm e marcador molecular padrão *Low DNA Mass Ladder*® (Invitrogen).

Os amplicons das regiões ITS do rDNA, ACT, EF e HIS foram purificados com exoSAP (USB) Affymetrix, a proporção de diluição de 5:1. Para cada 5 µl de cada reação de PCR foi adicionada 1 µl de exoSAP. O programa de purificação foi de 37 °C por 15 minutos e 80 °C por 15 minutos. Os produtos de PCR foram sequenciados em um sequenciador de DNA ABI 3130xl (Applied Biosystems). A sequência consenso foi montada com o auxílio do programa Geneious 8.1, e comparada via BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997), no banco de dados de sequências de DNA do NCBI, para a confirmação da identidade de *P. musae*.

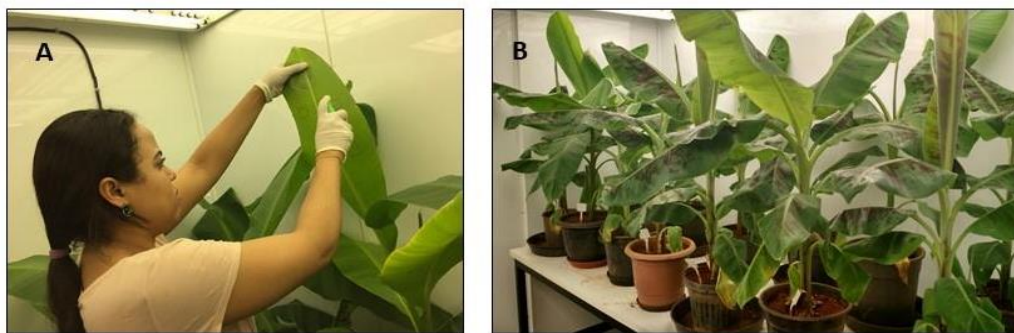
**Tabela 1-** Sequência nucleotídica dos primers para as regiões ITS do rDNA, ACT, H3 e EF e tamanho esperado do amplicon.

| Primers  | Sequência dos primers (5'-3') | Tamanho esperado (pb) |
|----------|-------------------------------|-----------------------|
| ITS 4    | TCCTCCGCTTATTGATATGCTGC       | 600                   |
| ITS 5    | TCAGCTTGAATGCTAATGTG          |                       |
| ACT-512F | ATGTGCAAGGCCGTTTCGC           | 300                   |
| ACT-783R | TACGAGTCCTTCTGGCCCAT          |                       |
| H3-1a    | ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG         | 350                   |
| H3-1b    | GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT         |                       |
| EF1-728F | CATCGAAGTTCGAGAAGG            | 800                   |
| EF1-986R | TACTTTGAAGGAACCCCTTACC        |                       |

### 5.3. Bioensaio *Musa acuminata*-*P. musae*

Com o objetivo de gerar um recurso para o estudo de genes funcionais em *M. acuminata*, por meio da análise da expressão de genes potencialmente envolvidos nos processos de defesa, um bioensaio foi conduzido, utilizando 12 plantas dos genótipos Calcutta 4 e 12 plantas Cavendish Grande Naine, ambos inoculados com *P. musae* e não inoculados (controles). Inicialmente, as plantas foram aclimatadas e mantidas em câmara de crescimento do tipo Fitotron sob um fotoperíodo de 12-h luz/12-h escuro a 25 °C e umidade relativa de no mínimo 85%. Plantas controle não inoculadas foram mantidas sob condições idênticas. Para o preparo do inóculo de *P. musae*, foi utilizado o isolado 15EB, pois o mesmo apresentou maior esporulação em relação aos outros isolados. As duas folhas mais jovens, totalmente expandidas foram inoculadas com 200 µL (equivalente a 2 pulverizadas) de uma suspensão de conídios na concentração de  $1,7 \times 10^4$  mL com auxílio de um borrifador. No total foram

inoculadas seis plantas de Calcutta 4 (resistente a Sigatoka-amarela) e seis Cavendish Grande Naine (suscetível a Sigatoka-amarela). Outras 12 plantas, sendo seis de Calcutta 4 e seis Cavendish foram inoculadas apenas com água Milli-Q esterilizada. As plantas foram distribuídas aleatoriamente e mantidas no fitotron sob um fotoperíodo de 12-h luz/12-h escuro a 25 °C e umidade relativa de no mínimo 85% (Figura 11). Foram definidos dois pontos de coleta do material foliar desafiado: 3 DAI e 12 DAI (de acordo com trabalho de CAVALCANTE *et al.*, 2011) de onde 6 fragmentos foliares da região inoculada foram recortados e imediatamente colocados em nitrogênio líquido. O material coletado foi mantido em freezer -80°C até sua utilização.



**Figura 11-** Etapa do processo de inoculação. Inoculação da folha de bananeira com *P. musae* (A). Distribuição espacial das bananeiras distribuídas no fitotron (B).

### **5.3.1. Extração do RNA total do material foliar de *M. acuminata* Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine inoculados e não inoculados com *P. musae* e síntese de cDNA**

Para a extração do RNA total foram coletados três fragmentos foliares de cada planta. O RNA foi extraído usando o reagente Concert RNA Plant Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA isolado foi purificado com o kit INVISORB Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex, Hayward, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para evitar a interferência causada pela presença de DNA genômico nas amostras de RNA durante a análise de RT-qPCR, as amostras foram submetidas ao tratamento com DNaseI (BioLabs, New England, EUA), a 37 °C por 20 minutos, seguida de desnaturação a 75 °C por 10 minutos. A quantificação e integridade foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, e espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acordo com o seguinte protocolo: 1 µg de RNA total foi utilizado para uma reação de 28 µL, contendo 1,4 µL de oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/mL), 1,4 µL de dNTP (10 mM), as amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos, após essa etapa as amostras foram mantidas no gelo por 5 minutos, e depois foram adicionados 5,6 µL de tampão da transcriptase reversa (5X), 2,8 µL de DTT (0.1 M) e 1,4 µL de RNase OUT (40 U/µL), as amostras foram incubadas a 42 °C por 2 minutos, e em seguida foi adicionado 1,4 µL da enzima transcriptase reversa (200 U/µL). Após essa etapa as amostras foram incubadas 42 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos para inativar a enzima.

### 5.3.2 Desenho de *primers* específicos para genes candidatos de defesa da planta

Para o desenho dos *primers* foi realizada uma busca por sequências de genes de *M. acuminata* em uma base de dados local de RNAseq, resultante do sequenciamento de bibliotecas de cDNA dos genótipos Calcutta 4 e Caipira, desafiadas ao ataque de *P. fijiensis* e *P. musae*, respectivamente. Essas bibliotecas foram obtidas em estudos anteriores (dados não publicados). A busca foi restringida aos genes já descritos na literatura, por participar nas vias de resposta imune PTI e ETI, e que tiveram sua expressão alterada em resposta ao ataque do patógeno, tais como NBS-LRR, ROS (*Reactive Oxygen Species*) e proteínas PR (*Pathogenesis-related*). A identificação dos genes que foram diferencialmente expressos foi realizada a partir de uma série de filtros aplicados aos dados: Foram selecionadas as sequências que apresentaram log de Fold Change  $\leq -2$  ou  $\geq 2$  e Q-value  $\leq 0,1$ . Em seguida, as sequências selecionadas foram alinhadas contra o genoma de referência de *M. acuminata* (DH Pahang), disponível no banco de dados Banana Genome Hub (<http://banana-genome-hub.southgreen.fr/>) (D'HONT *et al.*, 2012).

Após a identificação, as sequências completas dos cDNAs dos genes foram selecionadas e utilizadas para o desenho dos *primers*. Todos os pares de *primers* foram desenhados utilizando-se o programa Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007), disponível no endereço eletrônico: (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), seguindo os seguintes parâmetros: amplicon entre 80 e 90 pb, tamanho do primer de 22 pb, Tm 60 °C, e porcentagem de GC entre 45 e 55 %. As sequências foram analisadas quanto a formação de estruturas secundárias e dímeros por meio dos programas OligoAnalyzer, disponível no endereço eletrônico (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) e Multiple Primer Analyzer, disponível em ([31](https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-</a></p></div><div data-bbox=)

scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html). Após o desenho dos *primers*, foi realizada uma PCR eletrônica utilizando a ferramenta PrimerBlast no banco de dados não redundante (nr) do NCBI para avaliação da especificidade de amplificação do gene alvo.

### 5.3.3 Desenho de primers para genes de referência

Com base no trabalho de CHEN *et al* (2011), que validou genes de referência para uso em *Musa*, com foco principal em fruta e casca, foram desenhados 11 pares de *primers* para genes potencialmente constitutivos. Foi realizada uma busca inicial dos genes em comparação com o genoma de *M. acuminata*, disponível no banco de dados do NCBI (Tabela 2). As sequências completas dos genes em questão foram analisadas quanto à similaridade por BLAST para confirmação da identidade no genoma de *M. acuminata* DH Pahang. A partir disso, foram desenhados *primers* para esses genes com o uso do programa online OligoPerfect™ Designer (ThermoFisher Scientific), seguindo os seguintes parâmetros: amplicons entre 80 e 150 pb, tamanho do primer de 22 pb, Tm 60 °C, e porcentagem de GC entre 45 e 55 %. Sempre que possível, o primer *forward* e *reverse* foram desenhados em éxons diferentes.

**Tabela 2-** Genes com potencial de expressão estável, selecionados para análises de RT-qPCR.

| Nome do Primer | Gene                                  | Primer forward / Reverse (5'-3')               | Produto esperado (pb) |
|----------------|---------------------------------------|--|-----------------------|
| Actin1pp1      | Actina                                | CTGCGACAATGGTACTGGAAT<br>CCTCGTCACCAACATAAGCAT | 146                   |
| Actin1pp2      | Actina                                | GAGCGGAAGTACAGTGTCTGG<br>AGAAGCACTTCTGTGGACAA  | 127                   |
| APT            | Adenina Fosforibosil Transferase      | TTGAACTGCCAGAATTGAAGG<br>TTGGGAAGAACAGAGAAGCAG | 125                   |
| CAC            | Complexo Adaptador de Clatrin         | AATGCCAGTGCCAACTCATAC<br>TCCTGCCTTCTTTAGACACCA | 121                   |
| EF1A           | Fator de Elongação 1 <i>alfa</i>      | AAGAGCCAAAGAGACCCTCAG<br>CCACGCTTAAGATCCTTGACA | 148                   |
| GAPDH          | Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase | CATCAAGCAAGGACTGGAGAG                          | 99                    |

|       |                                      |                        |     |
|-------|--------------------------------------|------------------------|-----|
|       |                                      | AAGCAGGGAGAACTTTTCCAA  |     |
| TUB-A | <u>Tubulina <i>alfa</i></u>          | GGAAGAAGTCGAAGCTTGGTT  | 95  |
|       |                                      | GGAATGGGTGGATAGGACACT  |     |
| TUB-B | <u>Tubulina <i>beta</i></u>          | TGTTGGACAACGAAGCTCTCT  | 94  |
|       |                                      | GTGGCCGAAATAAGATGGTTC  |     |
| RAN   | <u>GTP - Binding Nuclear Protein</u> | AGCTGCAATTGGATCGAAAAGT | 90  |
|       |                                      | GTAACATCGCCACCATAGCAT  |     |
| UBQ1  | <u>Ubiquitina 1</u>                  | GGCAGGAGTAACGAACAACAA  | 142 |
|       |                                      | CATTTCTCGTAGCTGGGTCAG  |     |
| UBQ2  | <u>Ubiquitina 2</u>                  | AGAGAGATGCTGCAAAATCCA  | 140 |
|       |                                      | CCAGCTGTCTGCTCTTGTCT   |     |

### 5.3.4. Validação dos genes de referência em *M. acuminata* por RT-qPCR

Para a realização dos experimentos de RT-qPCR, foi necessária a validação dos genes de referência que apresentem expressão constitutiva de acordo com o tecido biológico e as condições de tratamento (agente infeccioso e genótipo de *M. acuminata*) desse trabalho. Desta forma, foram selecionados 11 pares de *primers* para 10 genes que, de acordo com a literatura, possuem expressão estável em amostras foliares de diferentes espécies. Para a validação da expressão gênica via qRT-PCR das amostras foliares, um total de oito bibliotecas de cDNA foram preparadas, sendo que, cada biblioteca é composta de um *pool* de 3 plantas (Tabela 3).

**Tabela 3-** Resumo do delineamento experimental para o bioensaio *Musa acuminata-Pseudocercospora musae*. Para cada genótipo de *M. acuminata*, os tratamentos controle e inoculado foram compostos por 3 plantas e a coleta realizada em dois períodos (3DAI e 12DAI), totalizando 24 plantas.

|   | 3 DAI     |               | 12 DAI    |               |
|---|-----------|---------------|-----------|---------------|
|   | Inoculado | Não Inoculado | Inoculado | Não Inoculado |
| <i>M. acuminata</i> Cavendish<br>Grande Naine | 3         | 3             | 3         | 3             |
| <i>M. acuminata</i> Calcutta 4                | 3         | 3             | 3         | 3             |
| <b>Total de plantas</b>                       | 6         | 6             | 6         | 6             |

As reações de qRT-PCR foram realizadas no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada reação de RT-qPCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 2 µL de cDNA com diluição 1:20, par de *primers* (0,4 µL dos



*primers forward e reverse* na concentração de 10  $\mu$ M), 5  $\mu$ L de Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG w/ROX kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, e 2,3  $\mu$ L de água de injeção. As condições da reação utilizadas na RT-qPCR foram 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento e extensão do primer a 60 °C por 60 segundos, seguido de uma curva de dissociação gerada a partir da desnaturação do produto amplificado pelo aumento gradativo da temperatura no fim da reação para verificar a especificidade do *primer* (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 60 segundos e 95 °C por 15 segundos).

Os dados brutos da expressão foram obtidos com o auxílio do software StepOne v.2.3, onde os valores de  $\Delta$ Rn para cada poço da placa de PCR foram organizados em planilhas do Excel. Em seguida, esses dados brutos foram analisados pelo programa LinRegPCR (v. 2017.1) (RAMAKERS *et al.*, 2003), para determinação da eficiência de cada par de *primer* e a Cq (Ciclo de quantificação, que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção) correspondente para cada reação. A especificidade dos produtos de PCR gerados para cada conjunto de *primers* foi verificada pela análise da curva de dissociação. Os resultados individuais expressos em valores de Cq foram transferidos para as planilhas e agrupados de acordo com o tempo após inoculação (DAI) e a condição inoculado e não inoculado. A validação dos genes de referência foi realizada de acordo com a literatura (CHEN *et al.*, 2011; PODEVIN *et al.*, 2012) por meio de três programas: BestKeeper, NormFinder e GeNorm (PFAFFL *et al.*, 2005; ANDERSEN *et al.*, 2004; VANDESOMPELE *et al.*, 2005). Ao final da validação por cada programa, os valores de Cq foram aplicados junto à ferramenta virtual RefFinder (DE SPIEGELAERE *et al.*, 2015) para o ranqueamento dos genes mais estáveis para cada situação determinada.

### **5.3.5. Validação de genes candidatos para resistência a *P. musae* em *M. acuminata* por RT-qPCR**

Após a validação dos genes de referência, procedeu-se à investigação do padrão de expressão dos genes candidatos em *pools* de *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine, inoculadas e não-inoculadas com *P. musae*, por meio de reações de PCR em tempo real. As condições de reação utilizadas para a RT-qPCR foram as mesmas utilizadas no tópico anterior. Os dados brutos da expressão foram obtidos com o auxílio do software StepOne v.2.3, onde os valores de  $\Delta$ Rn para cada poço da placa de PCR foram organizados em planilhas do Excel. Em seguida, esses dados brutos foram analisados pelo

programa LinRegPCR (v. 2017.1) para determinação da eficiência de cada par de *primer* e a Cq correspondente para cada reação. Os resultados individuais expressos em valores de Cq foram então transferidos para planilhas e agrupados de acordo com o tempo após a inoculação (DAI) e a condição inoculado e não inoculado. A análise da expressão diferencial de cada gene foi determinada por meio do programa qbase<sub>+</sub> (v. 3.1) (HELLEMANS *et al.*, 2007). Por fim, os valores de Cq foram utilizados para o cálculo estatístico por meio do programa REST2009 (v. 2.0.13) (QIAGEN, 2009) e determinação da significância das respostas observadas.

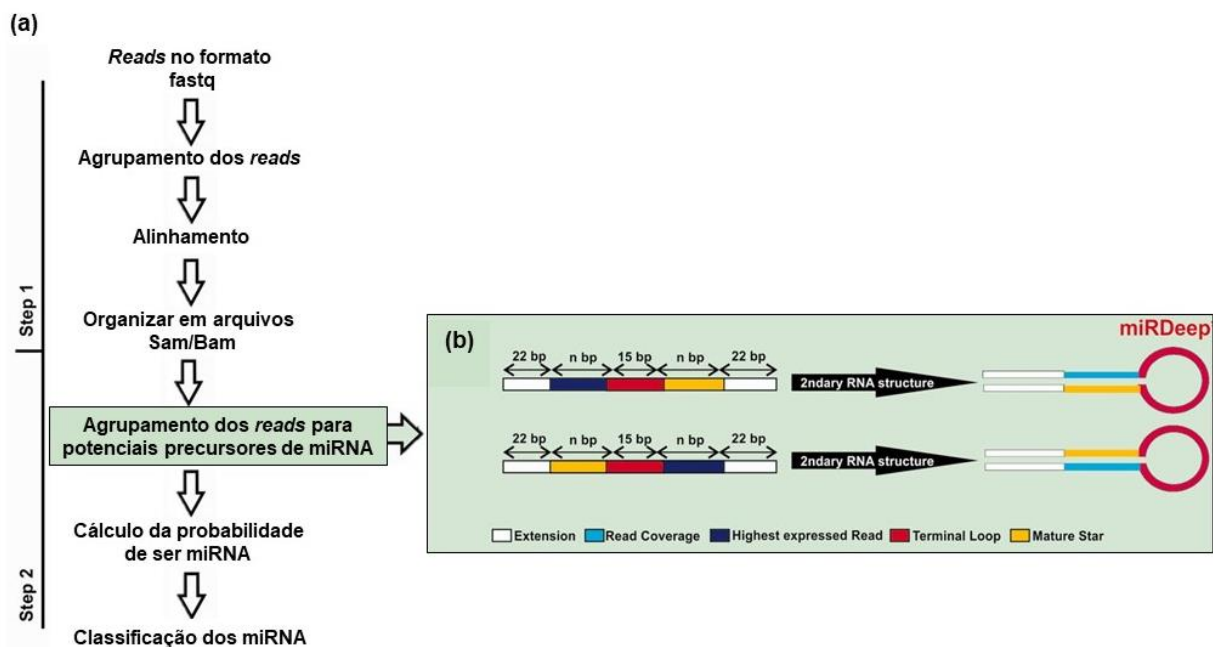
#### **5.4. Extração de RNA total de *P. musae* para construção da biblioteca de miRNA**

O isolado 15EB de *P. musae* foi cultivada em meio V8 a 25° C, e após 22 dias de cultivo o micélio foi raspado e macerado com auxílio de um pistilo e nitrogênio líquido, para a posterior extração do RNA. O RNA total de *P. musae* cultivado *in vitro* foi extraído usando o reagente Concert RNA Plant Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo as instruções do fabricante, seguido da purificação com o uso do kit ReliaPrep™ miRNA Cell and Tissue Miniprep System. A quantificação e integridade foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Foi realizado o sequenciamento utilizando a tecnologia Illumina, a partir do RNA total de *P. musae*. A construção da biblioteca foi realizada utilizando o NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Kit para Illumina e o sequenciamento foi realizado na Empresa McGill University / Génome Québec Innovation Centre - Canadá, utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500 SR50 (Illumina, San Diego, CA, EUA). As amostras de RNA foram transportadas em RNAsable (Biomátrica), de acordo com as instruções do fabricante. Após ressuspensão, a integridade do RNA foi avaliada utilizando o sistema do Agilent 2100 Bioanalyzer. O sequenciamento *single-read* (50 pares de bases) foi conduzido usando TruSeq RNA Chemistry v3. Os dados do sequenciamento Illumina serão depositados no NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

##### **5.4.1. Predição de miRNAs em *P. musae* e predição dos genes alvos**

O pipeline do algoritmo miRDeep foi adaptado para a predição de miRNA do fungo a partir de dados de RNAseq (Figura 12a). Os *reads* com sequências de tamanhos distintos aos dos miRNAs (18-23 nucleotídeos) foram excluídos antes do mapeamento genômico. Para

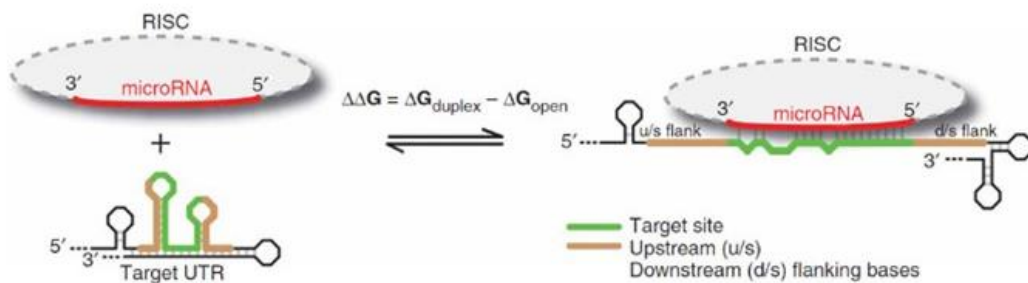
reduzir o tempo de mapeamento, todos os *reads* com sequências semelhantes foram primeiro agregadas, e os *reads* mais representativos foram mapeados contra o genoma de *P. musae*. Os *reads* mapeados foram registrados no formato SAM para integração ao pipeline miRDeep (AN *et al.*, 2013). O algoritmo miRDeep agrega os *reads* que se alinham na mesma fita a uma distância máxima de 30 pb um do outro, para formar uma região de cobertura de leitura. Entretanto, o miRDeep adota diferentes estratégias para determinar potenciais loci para precursores de miRNAs. Os *reads* que são mais expressos nos loci de miRNA são considerados potenciais miRNAs maduros. Um dos lados do *read* é estendido de 15-22 pb e o outro lado do *read* é a região do loop. O RNA maduro tem o mesmo número de pares de bases de nucleotídeos do miRNA maduro, bem como 22 pb para o deslocamento do RNA para miRNA.



**Figura 12-** Pipeline do algoritmo miRDeep para a predição da estrutura secundária do miRNA. Modificado de (AN *et al.*, 2013)

Para a predição *in silico* de genes alvos foi utilizado o *software* psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) (DAI; ZHAO, 2011), adotando os seguintes parâmetros: i- expectativa máxima padrão de 5,0 (Essa pontuação refere-se ao alinhamento do miRNA maduro com seu possível alvo, quanto menor o valor melhor é o alinhamento) ii- Comprimento de complementaridade (hspsize) de 19 pb (Este valor refere-se ao comprimento

da região em que o programa marcará a complementaridade entre o miRNA e o transcrito alvo, o intervalo recomendado para hspsize é 19-20) iii- UPE (energia necessária para abrir a estrutura secundária do alvo e do sítio de reconhecimento (menos energia significa melhor acessibilidade ao alvo), a acessibilidade do sitio alvo do mRNA ao miRNA foi identificada como um dos fatores importantes que estão envolvidos no reconhecimento do alvo, porque a estrutura secundária em torno do sitio alvo irá prevenir o miRNA e o alvo de entrarem em contato (Figura 13).



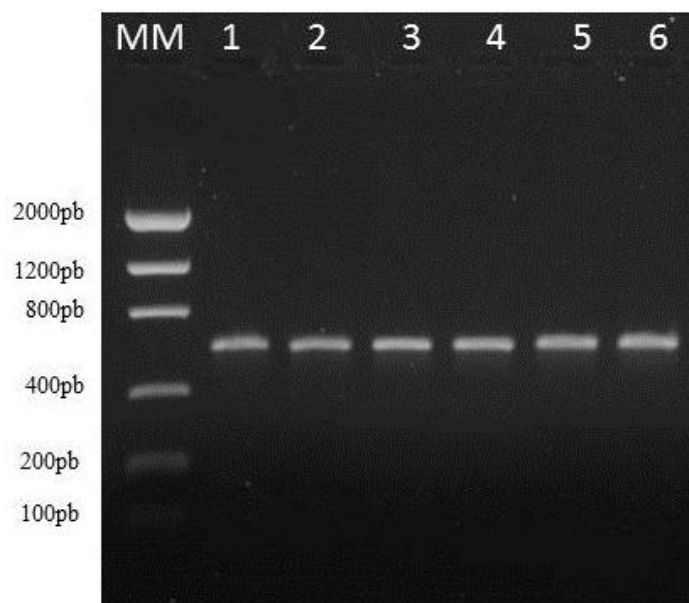
**Figura 13-** Esquema de UPE. Na figura acima  $\Delta\Delta G$  representa a energia necessária para abrir uma estrutura secundária em torno do sítio alvo. Adaptado de KERTESZ *et al.*, 2007.

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1. Identificação molecular dos isolados de *P. musae*

Dos seis isolados obtidos todos apresentaram após a PCR um único fragmento no tamanho esperado de 600 pb para a região ITS1 e 2 do rDNA (Figura 14), 250 pb para o gene ACT, 350 pb para o gene HIS, e 800 pb para o gene EF. Após o sequenciamento dos produtos de PCR, a homologia e similaridade das sequências obtidas foram verificadas por BLASTN em comparação com as sequências disponíveis na base de dados GenBank. A análise das quatro regiões genômicas utilizadas confirmaram a identidade de todos os isolados como *P. musae* (Tabela 4).



**Figura 14-** Produto da amplificação da região ITS do rDNA, em gel de agarose. Isolados de *P. musae* coletadas na Estação Biológica – UnB. MM: Marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Coluna 1: 018bBA, 2: 01EB, 3: 12EB, 4: 15EB, 5: 55EB e 6: 90EB.

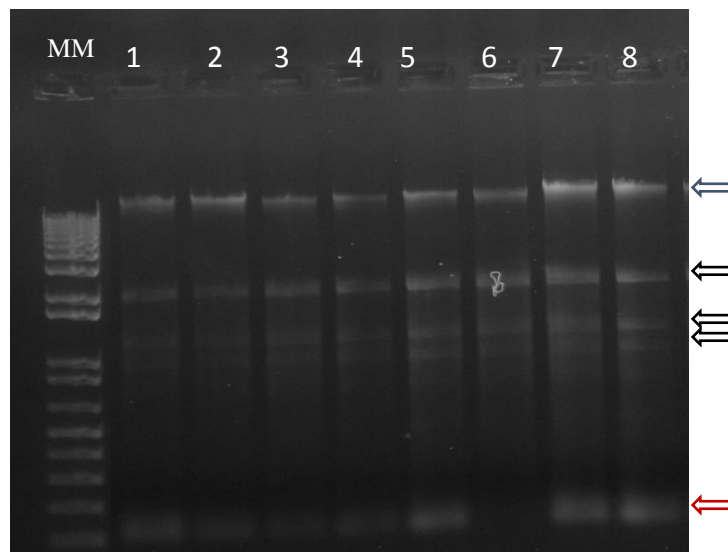
**Tabela 4-** Análises das sequências por comparação via BLASTN no Genbank, para as quatro regiões genômicas.

| Isolado  | Região genômica | Identidade | Resultado                            |
|----------|-----------------|------------|--------------------------------------|
| 01 EB    | ITS 5-4         | 98,4%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | EF              | 89,5%      | <i>Pseudocercospora mapelanensis</i> |
|          | Actina          | 94,7%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | Histona         | 98,9%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
| 12 EB    | ITS 5-4         | 98,3%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | EF              | 90,8%      | <i>Pseudocercospora mapelanensis</i> |
|          | Actina          | 71,5%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | Histona         | 99,7%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
| 15 EB    | ITS 5-4         | 98,6%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | EF              | 92,6%      | <i>Pseudocercospora mapelanensis</i> |
|          | Actina          | 99,6%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | Histona         | 99,0%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
| 018 b BA | ITS 5-4         | 100,0%     | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | EF              | 91,0%      | <i>Pseudocercospora mapelanensis</i> |
|          | Actina          | 99,0%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | Histona         | 99,7%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
| 55 EB    | ITS 5-4         | 93,2%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | EF              | 90,3%      | <i>Pseudocercospora mapelanensis</i> |
|          | Actina          | 97,3%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | Histona         | 99,6%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
| 90 EB    | ITS 5-4         | 98,2%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | EF              | 90,5%      | <i>Pseudocercospora mapelanensis</i> |
|          | Actina          | 97,8%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |
|          | Histona         | 99,5%      | <i>Mycosphaerella musicola</i>       |

\* *Pseudocercospora musae* (fase assexual) é a nomenclatura mais utilizada para *Mycosphaerella musicola* (fase sexual).

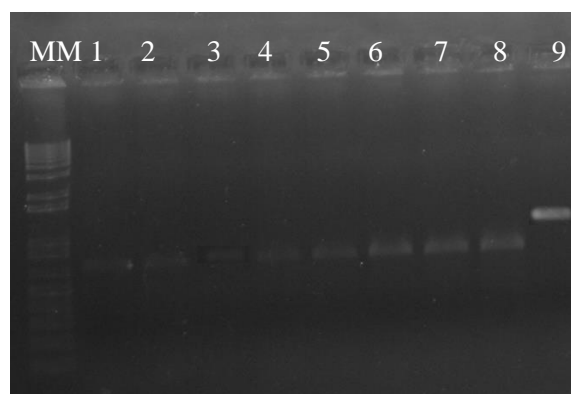
## 6.2. Extração do RNA total de amostra foliar de *M. acuminata* Calcutta 4 e Cavendish Grande Naine inoculados e não inoculados com *P. musae* e síntese de cDNA

As amostras de RNA total, extraídas pelo Kit Concert®, possuem boa integridade dos fragmentos. A figura 14 representa um gel de agarose 1% com quatro amostras de RNA total de Calcutta e quatro amostras de Cavendish Grande Naine. As amostras possuem boa qualidade após passarem pela coluna de purificação, com valores de  $A_{260/280}$  próximos a 2,0.



**Figura 15-** Eletroforese em gel de agarose a 1% da extração do RNA total de folhas inoculadas e não inoculadas com *P. musae*. MM- Marcador Molecular 1kb Plus (Invitrogen) 1- *Musa acuminata* Calcutta 4 3DAI NI, 2- *M. acuminata* Calcutta 4 3 DAI I, 3- *M. acuminata* Calcutta 4 12 DAI NI, 4- *M. acuminata* Calcutta 4 12 DAI I, 5- *M. acuminata* Cavendish Grande Naine 3 DAI NI, 6- *M. acuminata* Cavendish Grande Naine 3 DAI I, 7- *M. acuminata* Cavendish Grande Naine 12 DAI NI e 8- *M. acuminata* Cavendish Grande Naine 12 DAI I. Seta azul- DNA genômico, Setas pretas RNA 28S, 18S e 5S em ordem decrescente, seta vermelha- pequenos RNAs. (I- inoculado, NI- não inoculado).

Após a síntese de cDNA foi realizada uma PCR com o *primer* fator de alongação para verificar se não houve contaminação com o DNA genômico, já que o mesmo está localizado em regiões do éxon, que flanqueiam uma região do íntron. A amplificação resultante a partir do cDNA produziu um fragmento menor de 600 pb em relação ao fragmento amplificado (750 pb) a partir do DNA genômico. A diferença nos tamanhos dos produtos gerados nos *pools* de cDNA e no DNA genômico confirma que as amostras estão livres de DNA contaminante, uma vez que a diferença dá-se pela presença de um íntron na região genômica.



**Figura 16-** Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando a amplificação dos oito *pools* de cDNA. Para a

amplificação foi utilizado o *primer* fator de alongação . MM- Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen), 1- *M. acuminata* Calcutta 4 3 DAI NI; Coluna 2- *M. acuminata* Calcutta 4 3 DAI I; Coluna 3- *M. acuminata* Calcutta 4 12 DAI NI; 4- *M. acuminata* Calcutta 4 12 DAI I; 5 – *M. acuminata* Cavendish Grande Naine 3 DAI NI; 6- *M. acuminata* Cavendish Grande Naine 3 DAI I; 7- *M. acuminata* Cavendish Grande Naine 12 DAI NI; 8- *M. acuminata* Cavendish Grande Naine 12 DAI I e 9- Controle positivo com DNA genômico.

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

Seis pares de *primers* que apresentaram os maiores valores para a cobertura de *reads* corrigida e normalizada entre os tratamentos inoculado e controle (Log de *Fold Change*) foram selecionados para a análise de RT-qPCR (tabela 5).

**Tabela 5-** *Primers* desenhados para RT- qPCR derivados dos genes candidatos envolvidos com a defesa na interação *M.acuminata- P. musae* e *M. acuminata-P. fijiensis*

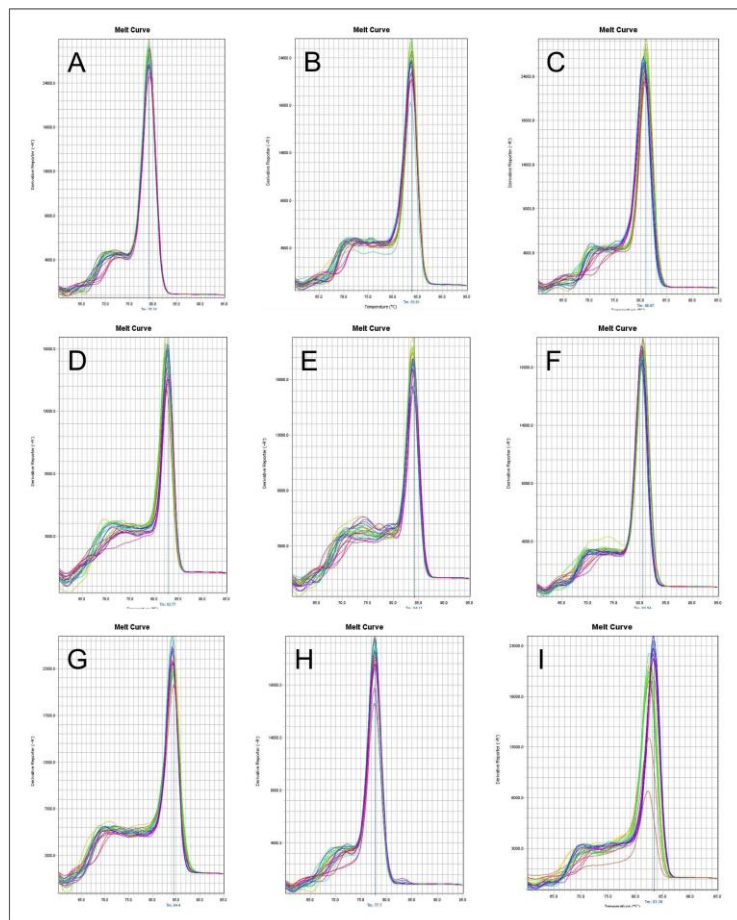
| Nome do Primer                 | Número de acesso          | Gene   | Sequência do <i>primer forward</i> e <i>Reverse</i> (5'-3') | Produto esperado | Classe      |
|--------------------------------|---------------------------|--|---|------------------|-------------|
| Achr9G05550 F<br>Achr9G05550 R | GSMUA_Achr9G<br>05550_001 | <i>Pathogen-related protein</i>  | GCCCTTACAAAGGTCATGCT<br>CCTCAACTGTTCGTCCACCT                | 83               | PR          |
| Achr7G20250 F<br>Achr7G20250 R | GSMUA_Achr7G<br>20250_001 | <i>Probable disease resistance protein.</i><br>Acesso:<br>XM_009389958.2 | GAGGACTCACCAACTGGAG<br>CATCCCCAATATCCTTCTGC                 | 81               | NBS-<br>LRR |
| Achr8G26080 F<br>Achr8G26080 R | GSMUA_Achr8G<br>26080_001 | Peroxidase 25  | GGTTGCGATGGATCAGTTTT<br>TCGAATCCTCTCAACCCAAG                | 80               | ROS E<br>PR |
| Achr5G11980 F<br>Achr5G11980 R | GSMUA_Achr5G<br>11980_001 | <i>Disease resistance protein</i><br>RPS2 NBS-LRR                        | ATCTCGCACTCCAGCAA<br>AGGACGTGCATATTGGGAAG                   | 89               | NBS-<br>LRR |
| Achr9G12130 F<br>Achr9G12130 R | GSMUA_Achr9G<br>12130_001 | <i>Disease resistance</i><br>RPP13-like protein 4<br>LRR                 | CGGAAGGGATATTCGAGACA<br>ACTCCAAAATCGCGTACCAC                | 81               | NBS-<br>LRR |
| Achr5G11640 F<br>Achr5G11640 R | GSMUA_Achr5G<br>11640_001 | <i>Putative disease resistance protein</i> RGA1<br>NBS-LRR               | ACATGGTTGGCAGATTCACA<br>TTCCAACTGAGGGATACGC                 | 88               | NBS-<br>LRR |



## 6.2.2. Validação dos genes de referência em *M. acuminata* por RT-qPCR

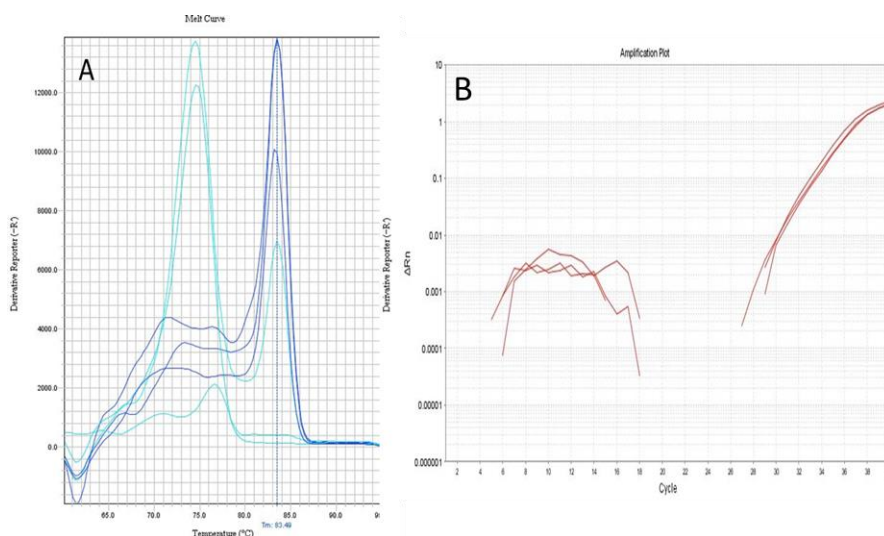
Com base em estudos anteriores em *Musa* e outras espécies de monocotiledôneas (CHEN *et al.*, 2011; PODEVIN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2017), um total de dez candidatos foram selecionados como possíveis genes de referência para esse estudo. Dos onze pares de *primers* de referência submetidos à análise por RT-qPCR, nove resultam em apenas um produto de amplificação observado na curva de dissociação (Figura 17). O par de *primers* CAC apresentou Cq (ciclo de quantificação) muito alta, acima de 35 e TUBb apresentou amplificação inespecífica, por isso foram descartados das análises (Figura 18).

Os valores de eficiência de amplificação de cada par de primer obtidos com o auxílio do programa LinRegPCR, variaram de 90.55% a 98.21% (com coeficiente de regressão  $R^2 = 0.99$ ) (tabela 6). Os oito genes selecionados foram analisados quanto à sua estabilidade de expressão em oito *pools* de cDNA (C4NI, C4I, CAVNI, CAVI).



**Figura 17-** Curvas de dissociação obtidas na corrida de RT-qPCR de oito genes de referência. As curvas de dissociação representam a temperatura em função da fluorescência com formação de pico único, gerado pelo alcance na curva de *melting* da sequência e queda abrupta da fluorescência. A- EF; B- GAPDH; C- RAN; D-

APT; E- UBIQ1; F- UBIQ2; G- ACTIN 1; H- TUBA; I- ACT



**Figura 18-** Curvas de dissociação e amplificação resultantes da corrida de PCR em tempo real. A- Curvas de dissociação do gene TuBb com amplificação inespecífica, B- Curva de amplificação do gene CAC, o qual apresentou Cq bastante elevada.

**Tabela 6-** Eficiência da reação da PCR em tempo real dos candidatos a genes de referência em *Musa*.

| Nome do gene | Descrição                              | Número de acesso ao Phytzome | Nome do Primer  | Sequência do Primer (5'-3')   | Amplicon Tm (°C) | Tamanho do Amplicon (bp) | Eficiência de Amplificação da PCR (%) ± SD |
|--------------|--|------------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------|--------------------------|--|
| ACT1         | Actina 1                               | GSMUA_Achr6G25350            | Macu_Act1pp1-Fw | CTGCGACAATGGTACTGGAAT         | 84.21            | 146                      | 90.55 ± 0.022                              |
|              |  |                              | Macu_Act1pp1-Rv | CCTCGTCACCAACATAAGCAT         |                  |                          |  |
|              |  |                              | Macu_act1pp2-Fw | GAGCGGAAGTACAGTGTCTGG         | 82.86            | 127                      |  |
|              |  |                              | Macu_act1pp2-Rv | AGAAGCACTTCTGTGGACAA          |                  |                          |  |
| APT          | Adenina Fosforibosil Transferase       | GSMUA_Achr2G18510            | Macu_APT-Fw     | TTGAAGTCCAGAAATGAAGG          | 82.7             | 125                      | 98.21 ± 0.029                              |
|              |  |                              | Macu_APT-Rv     | TTGGGAAGAACAGAGAAGCAG         |                  |                          |  |
| EF           | Fator de Elongação 1 alfa              | GSMUA_Achr10G22980           | Macu_EF1a-Fw    | GCTACAACCCAGAGAAGATAC<br>CCTT | 78.87            | 80                       | 96.63 ± 0.030                              |
|              |  |                              | Macu_EF1a-Rv    | CAGGTTGGTAGACCTCTCAAT<br>CATG |                  |                          |  |
| GAPDH        | Gliceraldeído -3-Fosfato Desidrogenase | GSMUA_Achr11G11040           | Macu_GAPDH-Fw   | CATCAAGCAAGGACTGGAGAG         | 83.27            | 99                       | 95.63 ± 0.027                              |
|              |  |                              | Macu_GAPDH-Rv   | AAGCAGGGAGAACCTTTTCCAA        |                  |                          |  |
| TUBA         | Tubulina alfa                          | GSMUA_Achr2G12390            | Macu_TubA-Fw    | GGAAGAAGTCGAAGCTTGTT          | 77.65            | 95                       | 92.96 ± 0.023                              |
|              |  |                              | Macu_TubA-Rv    | GGAATGGGTGGATAGGACACT         |                  |                          |  |
| RAN          | GTP - Binding Nuclear Protein          | GSMUA_Achr10G21070           | Macu_RAN-Fw     | AGCTGCAATTGGATCGAAAGT         | 80.58            | 90                       | 97.70 ± 0.028                              |
|              |  |                              | Macu_RAN-Rv     | GTAACATCGCCACCATAGCAT         |                  |                          |  |
| UBQ1         | Ubiquitina 1                           | GSMUA_Achr7G04060            | Macu_Ubq1-Fw    | GGCAGGAGTAACGAACAACAA         | 83.14            | 142                      | 92.59 ± 0.024                              |
|              |  |                              | Macu_Ubq1-Rv    | CATTTCTCGTAGCTGGGTCAG         |                  |                          |  |
| UBQ2         | Ubiquitina 2                           | GSMUA_Achr5G11110            | Macu_Ubq2-Fw    | AGAGAGATGCTGCAAAATCCA         | 80.48            | 140                      | 94.44 ± 0.026                              |
|              |  |                              | Macu_Ubq2-Rv    | CCAGCTGTCTGCTTTGTTCT          |                  |                          |  |

O desempenho dos genes candidatos de referência foi avaliado para as oito bibliotecas de cDNA. A análise de estabilidade de expressão dos oito genes candidatos de referência foi determinada usando os algoritmos geNorm, NormFinder e BestKeeper. Foi utilizado também o programa RefFinder que agrega os dados de todos os programas e mostra um ranking geral dos melhores genes de referência para o estudo (tabela 7).

**Tabela 7-** Análise de estabilidade de expressão de cada gene de referência candidato para tecidos foliares de *Musa acuminata* com base em algoritmos geNorm, NormFinder e BestKeeper. O ranking geral foi realizado usando o RefFinder. GM, Média Geométrica; SV, Valor de Estabilidade; Std Dev, Desvio Padrão; Cp, Capacidade de Processo. Com NormFinder e GeNorm, valores de estabilidade abaixo de 0.5 indicam uma maior estabilidade da expressão gênica. Com o BestKeeper, os genes com valores de desvio padrão maiores que 1 são considerados inconsistentes.

| Amostra    | Gene    | RefFinder |      | geNorm |       | NormFinder |       | BestKeeper |                     |
|------------|---------|-----------|------|--------|-------|------------|-------|------------|---------------------|
|            |         | Rank      | GM   | Rank   | SV    | Rank       | SV    | Rank       | Std Dev [ $\pm$ Cp] |
| Global     | RAN     | 3         | 2.28 | 2      | 0.33  | 4          | 0.014 | 3          | 0.493               |
|            | EF      | 2         | 1.86 | 4      | 0.479 | 3          | 0.014 | 1          | 0.442               |
|            | GAPDH   | 4         | 4.43 | 5      | 0.513 | 5          | 0.016 | 6          | 0.617               |
|            | APT     | 7         | 7    | 7      | 0.599 | 7          | 0.025 | 7          | 0.688               |
|            | UBQ1    | 6         | 5    | 3      | 0.371 | 1          | 0.005 | 5          | 0.589               |
|            | UBQ2    | 1         | 1.41 | 1      | 0.287 | 2          | 0.011 | 4          | 0.498               |
|            | TUBa    | 8         | 8.24 | 8      | 0.639 | 8          | 0.030 | 9          | 0.915               |
|            | ACT1pp1 | 9         | 8.74 | 9      | 0.716 | 9          | 0.033 | 8          | 0.699               |
|            | ACT1pp2 | 5         | 4.56 | 6      | 0.543 | 6          | 0.022 | 2          | 0.450               |
| Global C4  | RAN     | 3         | 3.16 | 6      | 0.266 | 4          | 0.005 | 1          | 0.432               |
|            | EF      | 4         | 3.72 | 7      | 0.3   | 3          | 0.004 | 4          | 0.540               |
|            | GAPDH   | 8         | 7.71 | 9      | 0.355 | 9          | 0.009 | 9          | 0.751               |
|            | APT     | 1         | 1.19 | 1      | 0.087 | 5          | 0.005 | 2          | 0.525               |
|            | UBQ1    | 9         | 8.74 | 3      | 0.103 | 6          | 0.005 | 8          | 0.673               |
|            | UBQ2    | 2         | 1.86 | 2      | 0.091 | 1          | 0.003 | 3          | 0.529               |
|            | TUBa    | 5         | 4.21 | 5      | 0.231 | 2          | 0.004 | 7          | 0.670               |
|            | ACT1pp1 | 7         | 6.93 | 8      | 0.325 | 7          | 0.007 | 6          | 0.654               |
|            | ACT1pp2 | 6         | 5.96 | 4      | 0.184 | 8          | 0.009 | 5          | 0.573               |
| Global CAV | RAN     | 2         | 1.93 | 1      | 0.081 | 1          | 0.003 | 7          | 0.332               |
|            | EF      | 4         | 3.41 | 4      | 0.129 | 6          | 0.007 | 5          | 0.304               |
|            | GAPDH   | 5         | 4.47 | 2      | 0.097 | 2          | 0.003 | 4          | 0.302               |
|            | APT     | 7         | 5.45 | 7      | 0.266 | 7          | 0.012 | 3          | 0.270               |
|            | UBQ1    | 9         | 9    | 6      | 0.236 | 8          | 0.014 | 9          | 0.503               |
|            | UBQ2    | 3         | 3.13 | 5      | 0.18  | 4          | 0.004 | 6          | 0.309               |
|            | TUBa    | 1         | 1.78 | 3      | 0.105 | 3          | 0.003 | 1          | 0.253               |
|            | ACT1pp1 | 8         | 8    | 9      | 0.363 | 9          | 0.016 | 8          | 0.495               |
| ACT1pp2    | 6       | 4.74      | 8    | 0.299  | 5     | 0.006      | 2     | 0.261      |                     |

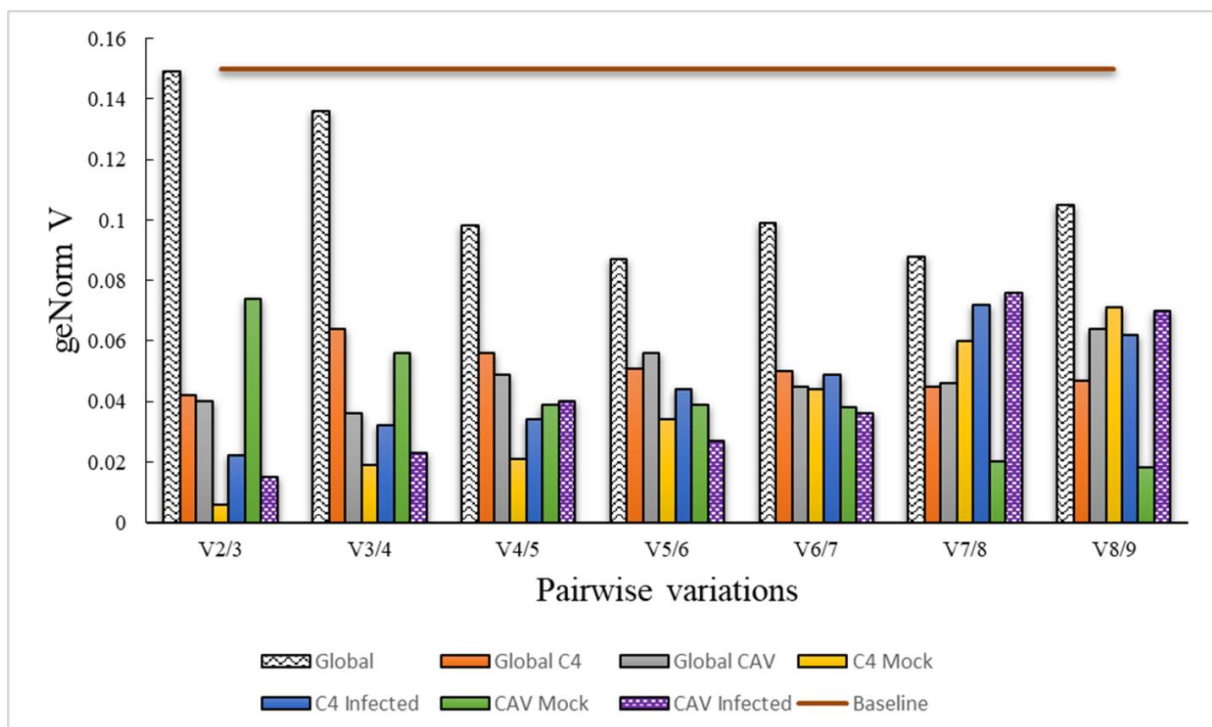
Com base na análise do geNorm, uma grande quantidade de genes de referência mostrou valores de estabilidade (SV) abaixo do limite padrão de 0,5 sugerido pelo programa, quando utilizados para diferentes amostras (CAV ou C4). Para a análise global dos dados, que inclui todos os tecidos estudados, os genes UBQ2, RAN e UBQ1 apresentaram os melhores valores de estabilidade. No grupo Global C4, que inclui todas as amostras de *M. acuminata* Calcutta 4 inoculadas e não inoculadas com *P. musae*, todos os genes apresentaram valores de estabilidade abaixo do limiar aceito, sendo que APT, UBQ2 e UBQ1 foram destacados como os genes mais estáveis. Para amostras de *M. acuminata* Cavendish Grande Naine inoculadas e não inoculadas com *P. musae* (Global CAV), todos os genes mostraram novamente valores de SV abaixo do limiar aceito, com os genes RAN, GAPDH e TUBa entre os mais estáveis.

O programa geNorm também pode ser utilizado para seleção dos melhores genes de referência usando o princípio de que a taxa de expressão de dois genes de referência deva ser a mesma entre todas as amostras testadas, independentemente das condições experimentais, isto é, não faz distinção entre situações intra e inter-grupos (OHL *et al.*, 2001). Dessa forma, o programa determina o mínimo de genes de referência que são necessários para que a análise da expressão gênica possa ser conduzida com confiabilidade. De acordo com a análise feita pelo programa geNorm, o uso de 2 genes (V1 + V2 ou V1 + V3) já é suficiente para a realização das análises, pois em todos os casos a estabilidade da combinação dos genes ficou abaixo do limite de 0.15 sugerido pelo programa (Figura 19). Assim, o programa determinou que, para o caso do grupo Global a combinação dos genes UBIQ2 e RAN mostrou maior estabilidade dentre os oito genes avaliados.

A análise baseada em NormFinder forneceu dados de classificação de estabilidade de genes com uma certa sobreposição à obtida com geNorm. Ao considerar o conjunto de dados combinados (Global), os três genes expressos de forma mais estável foram: UBQ1, UBQ2 e EF, classificados em ordem de maior estabilidade. Com base nos resultados obtidos após a análise com o programa BestKeeper, todos os genes candidatos foram calculados para ter um valor de desvio padrão inferior a 1, com este algoritmo, uma certa sobreposição na maioria dos genes candidatos de referência expressos de forma estável também foi observada quando comparada às posições de classificação, com base em dados geNorm e NormFinder. No caso de dados que consideram o conjunto de dados (Global), os três genes classificados como mais estáveis estavam de acordo, sendo o gene EF mais estável, seguido por ACT2 e RAN. Ao considerar as amostras de dados (Global C4), três dos genes mais estáveis e bem classificados estavam de acordo com os resultados obtidos usando a NormFinder e dois de acordo com o ranking derivado de GeNorm. Então no BestKeeper o gene RAN classificou-se como o mais

estável, seguido por APT, UBQ2 e EF. No caso de dados derivados das amostras (global CAV), dois genes mais bem classificados em termos de estabilidade de expressão estavam de acordo com dados de classificação obtidos usando a NormFinder e outros dois de acordo com os dados de classificação obtidos usando o geNorm. Os quatro genes mais bem classificados, em ordem de estabilidade de expressão, foram TUBa, ACT2, APT e GAPDH.

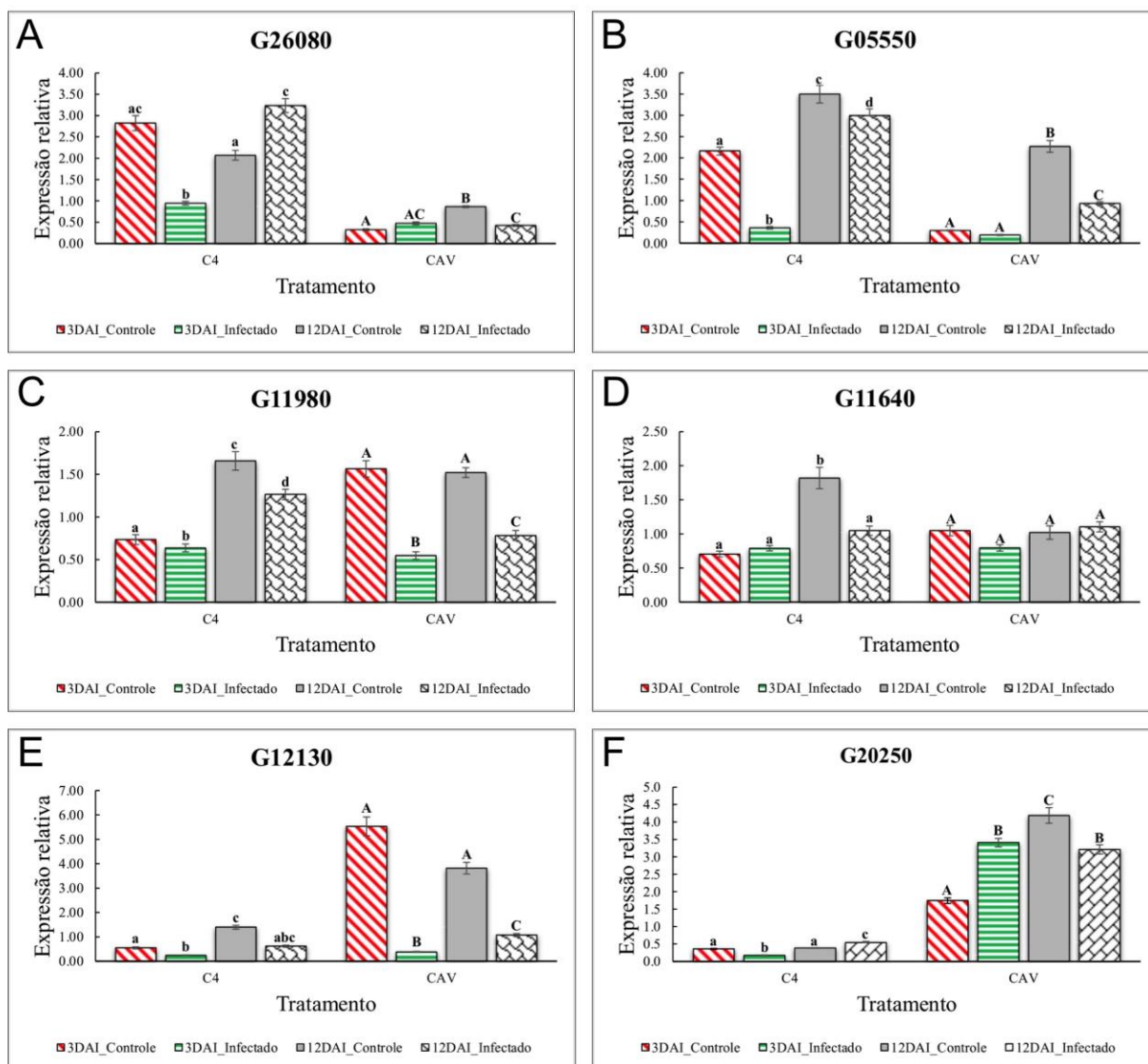
RefFinder foi utilizado para permitir uma reclassificação mais abrangente de estabilidade de expressão nos genes candidatos de referência com base na integração dos dados dos três algoritmos anteriores (geNorm, NormFinder e BestKeeper). Ao levar em consideração o conjunto de dados (Global) tanto para *M. acuminata* Calcutta 4 quanto para *M. acuminata* Cavendish Grande Naine inoculadas ou não com *P. musae*, os quatro genes candidatos de referência mais bem classificados para estabilidade foram: UBQ1, EF, RAN e GAPDH. No caso do conjunto de dados (Global C4), os genes candidatos de referência mais estáveis foram APT, seguido de UBQ2, RAN e EF. Para o conjunto de dados (Global CAV) os genes candidatos de referência mais estáveis foram TUBa, seguido de RAN, UBQ2 e EF (Tabela 7).



**Figura 19-** Determinação de número mínimo de genes de referência. Para a determinação de um número mínimo de genes de referência determinada por geNorm V, para a normalização precisa para a expressão de genes alvos por RT-qPCR. Para os dados abaixo de um valor de corte de 0,15, a inclusão de genes de referência adicionais não contribuirá significativamente para a normalização dos dados de expressão gênica.

### 6.2.3. Validação de genes candidatos de resistência em *M. acuminata*-*P. musae* por RT-qPCR

Os genes alvos foram inicialmente avaliados por meio de PCR convencional, seguidos por eletroforese em gel de agarose 1%, e posteriormente por PCR em tempo real, o qual tiveram sua eficiência de *primer* determinada com o auxílio dos programas LinRegPCR e qbase+ (HELLEMANS *et al.*, 2007), dá qual foi utilizado para a análise da expressão e construção dos gráficos, e o software REST2009 para a significância estatística entre os tratamentos. Por meio de análises de curvas de dissociação, não foram observados qualquer produto indesejado, garantindo a especificidade dos *primers*. Após os pares de *primers* terem sido testados e a eficiência da amplificação mensurada, procedeu-se à investigação do padrão de expressão dos genes candidatos em *pools* de *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine, inoculados e não inoculados com *P. msusae*, por meio de reações de PCR em tempo real (figura 20).



**Figura 20-** Níveis de expressão relativa dos genes potencialmente envolvidos na resistência e respostas de defesa de *M. Calcutta* 4 e Cavendish Grande Naine inoculados com *P. musae* comparados ao controle. As barras de erros indicam o desvio padrão entre as triplicatas técnicas. As letras indicam significância estatística entre os tratamentos para os valores de  $p < 0.05$ . Diferenças estatísticas são mostradas por letras diferentes. As letras minúsculas referem-se à significância estatística para os dados de Calcutta 4. As letras maiúsculas indicam significância estatística para os dados de Cavendish. A- Peroxidase (G26080) B- Proteína PR (G05550) C- *Disease resistance protein* RPS2 NBS-LRR (G11980) D- *Putative disease resistance protein* RGA1 NBS-LRR (G11640) E- *Disease resistance RPP13-like protein* 4 LRR (G12130) e F- *Probable disease resistance protein* At1g58602 (G20250)

Para o gene da peroxidase (G26080) Figura 20-A, em Calcutta 4, pode-se observar que houve uma redução significativa da expressão gênica na condição 3 DAI inoculada em relação ao controle não inoculado, e na condição 12 DAI inoculada houve um aumento significativo em relação ao controle não inoculado. Já em 12 DAI inoculado houve uma redução significativa da expressão, já em relação aos dois genótipos pode-se observar que houve uma tendência do gene ser mais expresso em Calcutta 4 do que em Cavendish.

Para a Proteína PR (G05550) (*Pathogen-related protein*) Figura 20-B, em Calcutta 4, pode-se observar que houve uma diminuição significativa da expressão gênica em 3 DAI e 12 DAI inoculada, em relação ao controle não inoculado. Para Cavendish, não houve diferença significativa em 3 DAI inoculado, já para 12 DAI inoculado houve uma diminuição significativa comparada à condição não inoculada. Comparando os dois genótipos, pode-se observar que houve uma tendência de o gene ser mais expresso em Calcutta 4 do que em Cavendish.

Para o gene RPS2 NBS-LRR (G11980) (*Disease resistance protein*) Figura 20-C, em Calcutta 4, pode-se observar que houve uma diminuição significativa na expressão gênica em 3 DAI inoculada, e em 12 DAI também houve uma diminuição significativa da expressão gênica em relação ao controle não inoculado. Para Cavendish, houve uma diminuição da expressão em 3 DAI inoculado e em 12 DAI inoculado também houve diminuição da expressão gênica.

Para o gene RGA1 NBS-LRR (G11640) (*Putative disease resistance protein*) Figura 20-D, em Calcutta 4, pode-se observar que 3 DAI C4 inoculado não houve diferença significativa, já em 12 DAI inoculado houve uma redução significativa da expressão comparada com o controle não inoculado. Em Cavendish não houve diferença de expressão tanto em 3 DAI e 12 DAI inoculado.

Para o gene RPP13-like *protein* 4 LRR (G12130) (*Disease resistance*) Figura 20-E, em Calcutta 4, pode-se observar que em 3 DAI e 12 DAI inoculado houve uma diminuição da expressão se comparado ao controle não inoculado. Em Cavendish houve uma diminuição significativa da expressão gênica em 3 e 12 DAI inoculado.

Para o gene At1g58602 (G20250) (*Probable disease resistance protein*) Figura 20-F, em Calcutta 4, pode-se observar que houve uma diminuição da expressão em 3 DAI inoculado, já em 12 DAI inoculado houve aumento de expressão se comparado ao controle não inoculado. Em Cavendish houve um aumento significativo da expressão gênica em 3 DAI inoculado, já em 12 DAI inoculada houve uma redução significativa da expressão gênica.



### **6.3. Predição de miRNAs em *P. musae***

#### **Análise da biblioteca de pequenos RNAs**

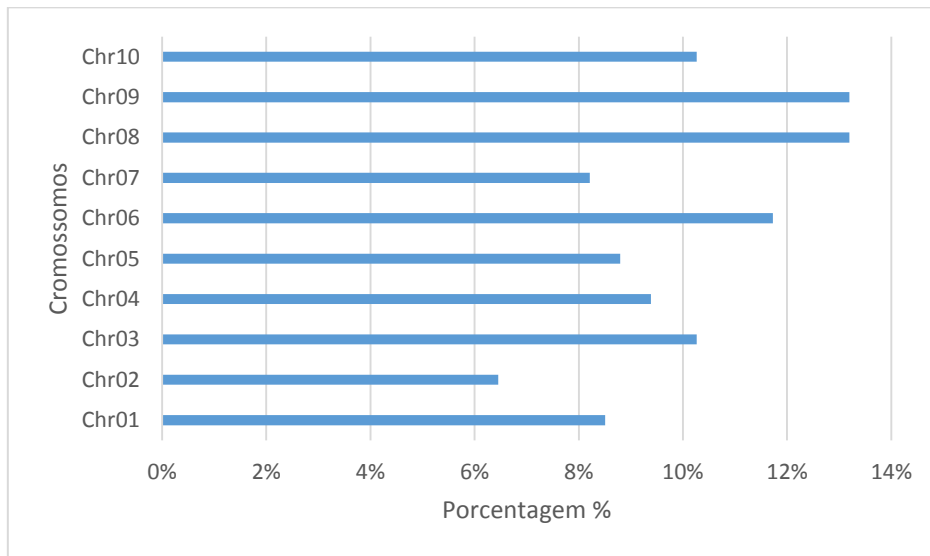
Foram geradas 17.967.999 leituras brutas. Após a remoção de leituras de baixa qualidade e sequência de adaptador 3', foram obtidas 1.254.339 (100%) leituras limpas, e 631.627 (50.36%) apresentaram ao menos uma região com identidade total ao genoma de *P. musae* dentro dos parâmetros necessários as análises subsequentes.

#### **Identificação de miRNA em *P. musae***

Como resultado, 101 novos pré-miRNAs candidatos foram adquiridos, assim como as suas estrutura (Tabela Suplementar 1 e 2). Em seguida, as estruturas dos pré-miRNAs foram curadas manualmente, seguindo os seguintes critérios: não pode haver mais que quatro nucleotídeos no anel; não pode haver mais que sete bases mal pareadas com sequência oposta. A partir dessas análises, um total de 62 pré-miRNAs foram obtidos (tabela 8). Após a curadoria manual foi selecionado 10 miRNAs evidenciando as diferentes formas que eles podem apresentar (Figura 22).

#### **6.4. Predição dos genes alvos**

Os 101 miRNAs identificados em *P. musae* foram analisados quanto a similariedade contra o genoma de *Musa acuminata* DH pahang, e com o resultado do Blast foram identificados um total de 381 genes-alvos (Tabela suplementar 3). Dos 381 alvos identificados, foram selecionados somente 21 alvos dentro daqueles 62 miRNAs manualmente curados, das quais foram selecionados aqueles que apresentaram como gene alvos genes ligados à via de PTI e ETI (Tabela 9). A análise de distribuição cromossômica mostrou que os miRNAs foram gerados intensamente nos cromossomos Chr06, Chr8 e Chr09 de *Musa acuminata* DH Pahang (Figura 21).



**Figura 21-** Distribuição de miRNA nos cromossomos de *Musa acuminata* DH Pahang

## 7. DISCUSSÃO

---

### 1. Validação de genes de referência em *Musa acuminata*

Neste estudo, oito genes foram avaliados como possíveis genes de referência para normalização de dados de expressão gênica em material foliar de *M. acuminata*. Estes foram escolhidos com base em estudos anteriores de validação de genes de referência. CHEN *et al.*, (2011) validou 20 genes candidatos de referência em diferentes tecidos, com foco principal em fruto e casca, da qual selecionamos oito genes para as nossas análises em folha de banana inoculadas ou não inoculadas com *Pseudocercospora musae*.

Para facilitar a identificação de genes de referência estáveis, foram utilizados vários algoritmos matemáticos, tais como os programas geNorm, NormFinder e BestKeeper (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; (ANDERSEN *et al.*, 2004) (PFAFFL, 2004). Estes foram amplamente utilizados no desenvolvimento de genes de referência em espécies de plantas monocotiledôneas, incluindo, por exemplo, arroz (XU *et al.*, 2015), milho (LIN *et al.*, 2014), cana-de-açúcar (de ANDRADE *et al.*, 2017) e setaria (MARTIN *et al.*, 2016).

Em *Musa*, CHEN *et al.*, (2011) realizaram o primeiro estudo para a validação de genes de referência para uso em bananas do subgrupo Cavendish, com foco em frutas e cascas em diferentes estádios de desenvolvimento, após o tratamento hormonal e após a exposição de frutos a estresses bióticos e abióticos. Os genes também foram validados utilizando *pools* de tecidos da planta tais como raiz, folha, flor, casca e polpa. Do mesmo modo, PODEVIN *et al.* (2012) investigaram a estabilidade dos genes de referência para análise da expressão gênica em tecidos foliares e meristemais em variedades cultivadas *in vitro*, em casa de vegetação e em material de fragmentos foliares. ZHANG *et al.* (2016) também identificaram genes de referência estáveis para os tecidos radiculares em duas cultivares de *Musa* durante a interação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raças 1 e 4. Esses dados destacam a importância da seleção de múltiplos genes de referência para a normalização de acordo com os tecidos vegetais, estágio de desenvolvimento e condições experimentais específicas.

Já foram realizados vários estudos sobre a expressão gênica em *Musa*, com foco principalmente em tecidos, desenvolvimento e respostas a estresses bióticos e abióticos. Nestes estudos, inúmeros genes de referência foram utilizados para normalização de dados de expressão de RT-qPCR em diferentes genótipos, tecidos, estádios de desenvolvimento e em resposta a diferentes estresses. Os genes incluíam, entre outros, Actin 1 (ACT-1), complexo de adaptador de clatrina (CAC), (EF1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH),

pectina liase (MWPL1), proteína ribossômica 2 (RPS2), proteína ribossômica 4 (RPS4) proteína de ribossomo L2 (L2), pequenos RNAs nucleares (U6), ubiquitina 2 (UBQ2), ubiquitina 4 (UBQ4) e RNA ribossômico 25S (ASIF *et al.*, 2014; BA *et al.*, 2014; BAI *et al.*, 2013 ; BUAH *et al.*, 2016; CASTAÑEDA *et al.*, 2017; ELITZUR *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2015; GE *et al.*, 2017; KUMARAVEL *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2015; MBEGUIE-MBEGUIE *et al.* 2007; THOMAS-HALL *et al.* 2007; VAN DEN BERG *et al.* 2007; YANG *et al.*, 2015). Muitos desses genes, no entanto, foram frequentemente selecionados, dado seus papéis nas atividades celulares, sem investigação da estabilidade da expressão gênica em condições experimentais.

Actina (ACT), UBIQ, GAPDH, EF e ciclofilina (CYP) são genes de referência comumente utilizados para estudos de expressão gênica em muitas espécies de plantas (TONG *et al.* 2009; HU *et al.*, 2009; MAROUFI *et al.*, 2010). No entanto, estudos recentes indicam que os genes de referência tradicionais nem sempre são expressos de forma estável quando testados em outras espécies ou em uma gama mais ampla de tratamentos experimentais (JAIN *et al.*, 2006; ARTICO *et al.*, 2010). Por exemplo, NICOT *et al.* (2005) demonstraram que ACT não pareceu ser o melhor gene para ser usado como referência durante os diferentes tratamentos de estresse biótico e abiótico em batata. Além disso, GUTIERREZ *et al.* (2008) também encontraram alta variabilidade na expressão relativa de genes de referência comuns, incluindo ACT, TUB, UBQ e EF durante vários estágios de desenvolvimento em *Arabidopsis*.

A RT-qPCR é um método preciso e sensível para análise de expressão gênica, mas o resultado de veracidade e confiabilidade depende de se selecionar um gene de referência apropriado ou não (NICOT *et al.*, 2005). Um gene de referência apropriado deve possuir expressão invariante em todas as amostras e em diferentes condições experimentais. GAPDH e Actina são genes de referência que exibem diferentes níveis de expressão em diferentes plantas, tecidos e condições experimentais (YPERMAN *et al.*, 2004; BARBER *et al.*, 2005). GUTIERREZ *et al.*, ( 2008 ) evidenciou que a expressão gênica de *TUB*, *Actina*, *UBQ*, e *EF* variaram em todas as amostras. Por isso, os genes de referência devem ser avaliados sistematicamente para garantir sua estabilidade de expressão em cada sistema experimental para obter resultados precisos e confiáveis (LEE *et al.*, 2002 ; HONG *et al.*, 2008 ). Além disso, o número ótimo de genes de referência deve ser determinado, uma vez que se espera que a maioria das análises de expressão de genes exija múltiplos genes de referência (VANDESOMPELE *et al.*, 2002 ).

A análise dos genes candidatos de referência foi realizada utilizando os algoritmos matemáticos geNorm, Normfinder, BestKeeper e RefFinder. Foram observadas diferenças nos principais genes classificados entre os resultados gerados com cada algoritmo, embora tenha sido observada maior consistência na exclusão dos genes candidatos menos estáveis. Tais diferenças na seleção de genes entre algoritmos parecem comuns (LI *et al.*, 2016) e provavelmente refletem como cada algoritmo analisa os dados. O geNorm avalia a estabilidade da expressão calculando um valor médio-M, que é definido como a variação Pairwise de um gene contra todos os outros genes. Os genes que apresentam os valores M mais baixos têm a expressão mais estável. O programa também calcula um valor V, uma variação em dois níveis entre cada gene de referência para determinar o número ótimo de genes necessários para a normalização. No caso da NormFinder, a variação entre grupos de genes tanto no nível intra e intergrupo é calculada com ANOVA e usada para gerar um valor de estabilidade (SV) para cada gene de referência. Os genes mais estáveis apresentaram um menor valor de SV. Como tal, esse método pode ser mais apropriado para fornecer estimativas de variação de expressão de subconjuntos de diferentes tipos de amostra (ANDERSEN *et al.*, 2004). O BestKeeper é uma ferramenta baseada em Excel que calcula a média geométrica dos valores Cq. Os genes mais estáveis são indicados por altos coeficientes de correlação e baixos desvios padrão. Os valores Raw Cq (sem considerar eficiências) são usados para calcular a média geométrica e classificar os genes de referência de acordo com os valores de estabilidade mais baixos. O RefFinder permite a integração de dados gerados com todos os algoritmos, com o (GeNorm, Normfinder, BestKeeper e delta Ct), a fim de fornecer uma reclassificação abrangente de estabilidade em genes candidatos de referência. Ao atribuir um peso a cada gene individual, pode-se calcular um peso médio geométrico dos genes candidatos, que pode então ser usado para classificar a estabilidade de cada gene individual.

Para as análises da estabilidade dos oito potenciais genes de referência, foram utilizados dois genótipos de *M. acuminata*, contrastante em resistência ao patógeno foliar *P. musae*. A estabilidade dos candidatos a genes de referência foi avaliada usando os algoritmos já citados anteriormente.

Alguns estudos relataram pequenas diferenças no ranking da estabilidade gênica gerada pelos algoritmos (CRUZ *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010), e outros encontraram grandes diferenças (PAOLACCI *et al.*, 2009; LAI., 2010). Nesse estudo houve diferenças entre os genótipos e entre os três algoritmos utilizados. Para o genótipo Calcutta 4 inoculado e não inoculado, as análises do GeNorm demonstraram que as combinações APT/UBIQ 2 e UBIQ 1 respectivamente, permitem uma normalização confiável. As análises do NormFinder

resultaram em combinações UBIQ 2/GAPDH e EF são ideais para normalização de amostras de folhas. As análises do BestKeeper evidenciaram resultados semelhantes ao do NormFinder e indicaram as combinações RAN/APT e UBIQ 2, que foram similares aos resultados do RefFinder, o qual indicou as combinações de APT/UBIQ 2 e RAN. Já em outro genótipo, Cavendish foi observado que as análises utilizando GeNorm demonstraram que as combinações RAN/GAPDH e TUBa respectivamente permitem uma normalização mais confiável. As análises utilizando NormFinder apresentaram as mesmas combinações daquelas apresentadas em GeNorm, RAN/GAPDH e TUBa. Já as análises usando BestKeeper apresentaram resultados diferentes com as seguintes combinações: TUBa/ACTINpp2 e APT. Porém TUBa apresentou-se comum a GeNorm, NormFinder e BestKeeper. Para a análise em RefFinder, foram indicadas as combinações TUBa/RAN e UBIQ2 respectivamente. De acordo com a amostra global baseada no RefFinder, que engloba os dois genótipos Cavendish e Calcutta 4, os três genes que se apresentaram mais estáveis fora respectivamente: UBIQ2/EF e RAN. Em posse desses três genes mais estáveis, foi feita uma análise utilizando o GeNorm para selecionar a melhor combinação para seguir com a PCR em tempo real. Desses três genes mais estáveis o programa determinou que, para o caso do grupo global, a combinação dos genes UBIQ2 e RAN mostrou maior estabilidade dentre os oito genes avaliados.

Numerosos estudos de expressão de genes de referência utilizaram o GeNorm e o NormFinder (CHEN *et al.*, 2011 ; Cruz *et al.*, 2009 ; Exposito-Rodriguez *et al.*, 2008 ; Hong *et al.*, 2008 ; Hu *et al.* 2009 ; LEE *et al.* 2010 ; MAROUFI *et al.* 2010 ; PAOLACCI *et al.* 2009) e relataram variação limitada na estabilidade no ranking por estas ferramentas de software, enquanto outros estudos têm relatado resultados significativamente diferentes, dependendo do software (LIN E LAI 2010 ; PAOLACCI *et al.*, 2009) essas variações decorrem de diferenças entre GeNorm e NormFinder nas abordagens matemáticas utilizadas para calcular a estabilidade da expressão. Uma das desvantagens do GeNorm é a sua sensibilidade à co-regulação (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), razão pela qual é importante usar genes de referência envolvidos em diferentes processos biológicos. Além disso, GeNorm identifica o número apropriado de genes de referência para uma normalização precisa, ao passo que o NormFinder seleciona dois genes com uma variação mínima combinada de expressão inter e intragrupos para levar em consideração diferenças sistemáticas entre subgrupos de amostra.

## 2. Validação de genes candidatos de resistência

A proteína PR tanto em Calcutta 4 quanto em Cavendish para os dois pontos de coleta estudados apresentaram diminuição da expressão entre as amostras inoculadas e não inoculadas. Dados anteriores da interação *M. acuminata* Calcutta 4 x *P. fijiensis* (CICY) mostraram, *in silico*, que essa mesma proteína PR teve uma superexpressão em todos os pontos de coletas após a inoculação. As PRs são proteínas relacionadas à patogênese, essas proteínas estão localizadas intra e extracelularmente, e se acumulam em tecidos vegetais intactos, além de em cultura de células após o tratamento com elicitores ou em resposta ao ataque de patógenos. Algumas dessas proteínas PRs de plantas podem apresentar expressão constitutiva mesmo que em baixos níveis (FERNANDES *et al.*, 2009). Entretanto, seus níveis podem ser aumentados quando as plantas são submetidas a condições de estresses. O aumento da expressão de genes relacionados à patogênese está associado a biossíntese de ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), juntamente com a produção de metabolitos antimicrobianos secundários. Em *Arabidopsis* a infecção por fungos aumenta a produção de ROS, de peroxidases e proteínas PRs, levando à ativação de várias vias de defesa (PUCCIARIELLO *et al.*, 2012). As proteínas relacionadas à patogênese-1 (PR-1) foram associadas com maior resistência contra os oomicetos e são frequentemente utilizadas como marcadores de vias de defesa dependentes do ácido salicílico em plantas (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

A peroxidase em Calcutta 4 apresentou uma redução significativa da expressão gênica em 3 DAI e, em 12 DAI, houve um aumento significativo. Em Cavendish não houve diferença significativa em 3DAI, já em 12 DAI, houve uma redução significativa da expressão. Em relação aos dois genótipos pode-se observar que houve uma tendência do gene ser mais expresso em Calcutta 4 do que em Cavendish. Nos dados *in silico* não publicados pelo grupo do CICY, a expressão do gene da peroxidase em Calcutta 4 foi reduzida em 3 DAI, aumentou em 6 DAI e aos 9 DAI houve um aumento expressivo da expressão desse gene, de maneira semelhante ao que foi observado para o presente trabalho. Esses resultados podem indicar que tal característica é compartilhada em resposta à infecção com ambos os patógenos. De acordo (CAVALCANTE *et al.*, 2011) a produção de peróxido de hidrogênio é uma das principais características do metabolismo celular, notadamente sob condições adversas, como nos casos de estresses bióticos ou abióticos. Neste cenário, cabe às Ascorbato Peroxidases (APX) o papel de degradar este composto tóxico, utilizando como substrato da reação o ascorbato, constituindo-se em um dos mais importantes mecanismos oxidativos das plantas (FERNANDES *et al.*, 2013). Esta característica oxidativa faz com que estas enzimas



estejam associadas ao mecanismo de defesa das plantas, tanto em situação de estresse biótico como abiótico. Diversos estudos têm demonstrado a participação destas enzimas no processo de defesa em diferentes patossistemas (CAVALCANTE *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2014). Passos *et al.*, (2013) evidenciou uma alta abundância de transcritos para genes envolvidos na desintoxicação de ROS e Reação de hipersensibilidade (RH) durante a interação de *M. acuminata* com *P. musae*. Foi observado também que houve abundância de transcritos de peróxido de hidrogênio e atividade de peroxidases em Calcutta 4 até 10 após inoculação com *P. fijiensis* (CAVALCANTE *et al.*, 2011).

Uma série de famílias distintas de genes de resistência (R) a doenças de plantas é reconhecida como envolvida em ETI e PTI, com base em domínios protéicos e função celular. A maioria dos genes R codifica proteínas que contêm um domínio de ligação a nucleotídeos (NBS) e outro de repetições ricas em leucina (LRRs) (DEYOUNG; INNES, 2006). Existem aproximadamente 150 genes que codificam proteínas NBS-LRR em *Arabidopsis thaliana*, 400 em *Oryza sativa* e 89 identificados em *M. acuminata* DH-Pahang (MEYERS *et al.*, 2003; MONOSI *et al.*, 2004; D'HONT *et al.*, 2012). Alguns genes R são induzidos por uma variedade de estímulos, alguns exibem respostas muito específicas e outros parecem não ser responsivos ao patógeno. MOHR *et al.*, (2010) evidenciou que de 124 genes NBS-LRR de *Arabidopsis*, 49 não foram induzidos. Em um exame global de genes NBS-LRR de *Arabidopsis* usando dados de microarranjo, TAN *et al.*, (2007) relatou que a expressão de dois genes NBS-LRR (At1g65400 e At1g56510) foi regulada negativamente, enquanto que dois outros genes (At1g72940 e At1g72920) foram induzidos após inóculo com *Pseudomonas syringae*. PASSOS *et al.*, (2013) evidenciou que 14 genes NBS-LRR expressos foram identificados através da análise de Blast de ambos os tecidos foliares, infectados e não infectados, para Calcutta 4 e 25 para Cavendish Grande Naine.

Foi observado que o gene NBS-LRR (At1g58602) em Calcutta 4 teve uma redução negativa significativa em 3 DAI e, em 12 DAI, houve um aumento significativo na expressão do mesmo. Em Cavendish foi observado em 3 DAI um aumento significativo e aos 12 DAI houve uma redução negativa. Em dados anteriores de sequenciamento, a mesma tendência de expressão do gene foi observada. No caso dos dados da Embrapa-CNPMPF, que avaliaram a interação entre *M. acuminata* Caipira x *P. musae*, houve um aumento significativo da expressão do gene em um *pool* contendo amostras coletadas em 5, 10 e 15 DAI. Nos dados do CICY em Calcutta 4 foi observado que o mesmo gene em 3 DAI não houve diferença significativa da expressão e aos 6 DAI e 9 DAI houve uma regulação positiva. Para o gene NBS-LRR RGA1 em Calcutta 4, pode-se observar em nossos dados que em 12 DAI houve

uma redução significativa da expressão comparada com o controle não inoculado. Nos demais tratamentos não houve diferença significativa da expressão. Em contraste, os dados *in silico* da CNPMF que mostraram uma regulação positiva para esse gene.

Para o gene RPS2 houve uma redução negativa significativa na expressão gênica em todos os tratamentos estudados. Nos dados anteriores da CNPMF, houve um aumento significativo na expressão desse gene no *pool* analisado (5,10 e 15 DAI).

Para o gene RPP13 houve uma redução negativa significativa para todos os tratamentos estudados. Em dados da CNPMF, houve um aumento significativo da expressão gênica no *pool* estudado.

As diferenças na expressão diferencial, observadas entre as análises do presente trabalho e os dados *in silico*, provavelmente podem ser causadas pelas diferenças entre os experimentos. No caso do trabalho da EMBRAPA, foi utilizada uma variedade de *M. acuminata* diferente, além de diferentes pontos de coleta que foram analisados em *pools*. O uso desses *pools* contendo diferentes pontos de coleta pode mascarar o real comportamento dos genes em resposta à infecção, pois o ponto onde houve maior expressão vai acabar elevando o valor total, mesmo que outras amostras do mesmo *pool* tenham apresentado baixa expressão. No trabalho do CICY, foram utilizados diferentes pontos de coleta para plantas de Calcutta 4 infectadas com outra espécie de patógeno. Os pontos de coleta escolhidos no presente trabalho estão de acordo com o trabalho realizado por (CAVALCANTE *et al.*, 2011) que mostrou a evolução da infecção de *P. fijiensis* em Calcutta 4 e em Cavendish. Dessa maneira, a comparação entre esses trabalhos serve apenas como um guia para determinar o padrão de respostas dos genes.

### 3. miRNAs em *P. musae*

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA dupla-fita e endógenos com aproximadamente 22 nucleotídeos de tamanho, cuja principal função é regular a nível pós-transcricional RNAs mensageiros-alvos (mRNA) por meio do pareamento de bases específico, resultando na clivagem do mRNA ou na inibição de sua tradução. Dada a importância emergente dos miRNAs na regulação da expressão gênica e dos processos biológicos observados em numerosas espécies vegetais e animais, as abordagens de sequenciamento de nova geração para a caracterização de miRNAs nos fungos também começaram recentemente a ser conduzidas.

Desde a descoberta do primeiro miRNA *lin-4* em *Caenorhabditis elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993) os miRNAs foram identificados em diversos organismos, incluindo animais, plantas e eucariotos unicelulares, como algas (MOLNÁR *et al.*, 2007), *Giardia lamblia* (ZHANG *et al.*, 2009) e *Trichomonas vaginalis* (LIN *et al.*, 2009). A presença de miRNAs nos organismos unicelulares sugeriu que a via de miRNAs é um antigo mecanismo de regulação de genes (ZHAO *et al.*, 2007). Os fungos filamentosos são um importante grupo de eucariotos multicelulares com mais de um bilhão de anos de evolução (LI *et al.*, 2007). Uma variedade de pequenos RNAs (sRNAs) e RNA de interferência (RNAi) foram evidenciados em fungos filamentosos (DANG *et al.*, 2011; FULCI; MACINO., 2007). Recentemente, vários grupos relataram que os (sRNAs) semelhantes a miRNA (miRNAs) também existem nos fungos filamentosos, incluindo *Neurospora crassa* (LEE *et al.*, 2010), *Sclerotinia sclerotiorum* (ZHOU; FU; XIE, 2012) e *Metarhizium anisopliae* (ZHOU *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas a aplicação crescente de utilização de sequenciamento de nova geração (NGS) tem se provado extremamente útil na descoberta de miRNAs em várias espécies, assim como a identificação de alvos em plantas nas mais diversas condições fisiológicas tais como, por exemplo, estresse biótico e abiótico (PELÁEZ *et al.*, 2012). Porém o estudo de pequenos RNAs ainda é escasso, principalmente em estudos de interação planta patógeno.

Os miRNAs em fungos foram relatados como derivados de TFs, genes de codificação de proteínas e de regiões intergênicas. Em fungos eles foram relatados como resultando no controle da expressão gênica através do silenciamento mediado por microRNA canônico, resultando na regulação de diversos processos celulares biológicos e fisiológicos envolvidos no crescimento micelial, formação de conidiósporos, dimorfismo e interação com fatores

externos (JIANG *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2013; LAU *et al.*, 2013; WEIBERG *et al.*, 2013).

Em fungos fitopatogênicos, identificou-se um único miRNA nos conjuntos de dados de sRNAs em *Zymoseptoria tritici*, com 85 genes-alvos identificados *em silico* no fungo e 287 no genoma do trigo, planta hospedeira para esse importante patógeno (YANG *et al.*, 2015). A classificação funcional revelou que os genes alvos dos fungos estão envolvidos principalmente no metabolismo, transcrição, estrutura celular, transporte, processo protéico e sinalização. A classificação funcional revelou que os genes alvos da planta hospedeira estão envolvidos principalmente no metabolismo, seguidos pelo processo protéico, transcrição, defesa e estresse, sinalização e transporte. Tais alvos foram relatados como sendo regulados negativamente durante as interações compatíveis neste patossistema (YANG *et al.*, 2013).

No caso do fungo patogênico *Botrytis cinerea*, WEIBERG *et al.*, (2013) também forneceram evidências para o envolvimento de miRNAs do fungo no controle da expressão do gene do hospedeiro, vinculando-se à proteína Argonauta 1 (AGO1) das plantas e direcionando o silenciamento de genes do hospedeiro. Os sRNAs são conhecidos por resultar em silenciamento de genes através da ligação às proteínas Argonauta (AGO) e posterior direção do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) a genes com sequências alvo complementares. Weiberg concluiu que estes miRNA de *B. cinerea* estavam atuando efetivamente como efetores patogênicos, com genes relacionados à imunidade da planta mostrando ser alvos dos miRNAs fúngico. Resultados similares foram observados no patógeno fúngico *Verticillium dahliae* (ELLENDORFF *et al.*, 2009), tal entrega de sRNA de patógenos em plantas hospedeiras para a supressão de respostas imunes parece indicar um mecanismo adicional envolvido na patogênese.

LI *et al.*, (2016) utilizaram recentemente Illumina miRNAseq para a caracterização de miRNAs no patógeno fúngico *Rhizoctonia solani* que causa a doença queima da bainha do arroz. Um total de 177 miRNAs foram identificados, sendo que 15 miRNAs fúngico mostraram níveis de expressão significativamente aumentados durante a infecção, sugerindo seu envolvimento na patogênese.

RADWAN *et al.*, (2011) descreveram análises de hibridização de microarranjos de DNA medindo a abundância de transcritos em raízes de soja resistente e suscetíveis ao patógeno fúngico *Fusarium viguliformes*. Neste estudo, além dos genes codificadores de proteínas, 42 miRNAs foram identificados, destes 29 miRNAs aumentaram e 10 diminuíram em abundância comparando ao tecido infectado com o controle, um destes miRNAs é

pertencente à família conservada miR 397 que foi induzido durante a doença (RADWAN; LIU; CLOUGH, 2011).

Nesse presente trabalho foram identificados 101 miRNAs *in silico* no genoma de *P. musae*, onde 381 genes alvos foram identificados, foi observado que alguns desses miRNAs tem como alvos genes em *Musa* importantes envolvidos em resistência, tais como, NBS-LRR, fatores de transcrição da superfamília WRKY, genes análogos em resistência (RGAs) tais como, RGA1e RGA3, citocromo P450 e quinases. A predição dos genes alvos dos miRNAs de *P. musae* será realizada em breve, pois ainda há escassez de dados de anotação do genoma do fungo. Nosso trabalho também evidenciou que esses miRNAs de *P. musae* podem ter múltiplos mRNA alvos em *Musa*, assim como foi visto por CUI *et al.*, (2014) que identificou 128 miRNAs e validou dois miRNAs em *Phytophthora infestans*, um oomiceto patogênico que causa doenças em batata. Os alvos de genes no fungo foram preditos usando o programa Miranda, onde foi observado miRNAs pleiotrópico de múltiplos mRNAs e provavelmente tem um efeito significativo nos processos celulares.

Assim como os estudos anteriores de Weiberg *et al.*, (2013) ELLENDORFF *et al* (2009) também sugeriram que certos miRNA de patógenos fúngicos podem atuar como efetores de patógenos, silenciando a expressão gênica envolvida nas respostas imunes do hospedeiro, uma caracterização global de miRNAs em *P. musae* é primordial para melhorar nossa compreensão do patossistema *Musa acuminata*- *P. musae*. A caracterização adicional de miRNAs previstos em *P. musae* é justificada, incluindo uma predição de alvos de genes de patógenos e análise de expressão de genes alvo tanto no patógeno como na planta hospedeira.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

O primeiro aspecto imprescindível quando se trabalha com expressão de genes é o conhecimento de bons normalizadores, desta forma o presente trabalho buscou a identificação de quais seriam os melhores normalizadores a serem utilizados em RT-qPCR em *Musa*. As análises dos genes candidatos de referência foi realizada utilizando os programas geNorm, NormFinder e BestKeeper e mostrou que os genes mais estáveis para este estudo foram UBIQ2 e RAN.

As análises baseadas em PCR em tempo real da expressão de seis genes envolvidos na resposta de defesa e resistência mostraram especificidade nas reações de PCR em tempo real. A maioria dos nossos resultados de expressão gênica não foram semelhantes aqueles observados nos trabalhos da EMBRAPA e nem do CICY, com exceção do gene da peroxidase que houve uma redução da expressão gênica em Calcutta 4 em 3 DAI, e em 12 DAI houve um aumento significativo da expressão desse gene, e em dados da CICY em 3 DAI houve uma redução da expressão gênica, e em 6 DAI e 12 DAI houve um aumento significativo da expressão desse gene, esses resultados indicam que tal característica é compartilhada em resposta a infecção com ambos os patógenos *P. musae* e *P. fijiensis*.

O uso do sequenciamento de alto desempenho (Illumina) foi eficiente para permitir a identificação de 101 miRNAs no genoma de *P. musae*. Também foram identificados *in silico* 381 genes potenciais alvos em *Musa acuminata*, onde foi observado que alguns desses miRNAs tem como alvos genes envolvidos na resistência.

## **9. PERSPECTIVAS**

---

- Validar o padrão de expressão dos miRNAs e seus genes alvo nos tratamentos realizados por PCR quantitativa em tempo real;
- Realizar a predição dos genes alvos dos miRNAs obtidos em *P. musae*;
- Sequenciar os miRNAs de *M. acuminata* envolvidos na interação com *P. musae* e identificar os alvos gênicos em ambas as espécies;
- Caracterizar a função biológica dos miRNAs da planta por super expressão e/ou *knock-out* de genes precursores dos miRNAs candidatos em bananeiras transgênicas obtidas por transformação genética via *Agrobacterium*.

## **10. REFERÊNCIAS**

---

- ARTICO, S. et al. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC plant biology**, v. 10, n. 1, p. 49, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- AN, J. et al. MiRDeep\*: An integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 2, p. 727–737, 2013.
- ANDERSEN, C. L. et al. Normalization of Real-Time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245–5250, 2004.
- AUKERMAN, M. J.; SAKAI, H. Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes The Plant Cell. **The Plant Cell**, v. 15, n. November, p. 2730–2741, 2003.
- AXTELL, M. J. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. **Annual Review of Plant Biology**, 2013.
- ASIF, M. H., LAKHWANI, D., PATHAK, S., GUPTA, P., BAG, S. K., NATH, P., TRIVEDI, P. K. (2014). Transcriptome analysis of ripe and unripe fruit tissue of banana identifies major metabolic networks involved in fruit ripening process. **BMC Plant Biol.** 14:316.
- BA LJ, SHAN W, XIAO YY, CHEN JY, LU WJ, KUANG JF. A ripening-induced transcription factor MaBSD1 interacts with promoters of MaEXP1/2 from banana fruit. *Plant Cell Rep.* 2014 Nov;33(11):1913-20. doi: 10.1007/s00299-014-1668-6. Epub 2014 Aug 6. PubMed PMID: 25097074.
- BAI TT, XIE WB, ZHOU PP, WU ZL, XIAO WC, ZHOU L, ET AL. (2013) Transcriptome and Expression Profile Analysis of Highly Resistant and Susceptible Banana Roots Challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4. **PLoS ONE** 8(9): e73945.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BALDRICH, P.; SAN SEGUNDO, B. MicroRNAs in Rice Innate Immunity. **Rice**, p. 2–9, 2016.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function. **cell**, v. 116, p. 281–297, 2004.



- BARTEL, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2013.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 379–406, 2009.
- BOONRUANGROD, R.; FLUCH, S.; BURG, K. Elucidation of origin of the present day hybrid banana cultivars using the 5'ETS rDNA sequence information. **Molecular Breeding**, v. 24, n. 1, p. 77–91, 2009.
- BORGES, A. L.; MATOS, A. P. DE. Banana: Instruções Práticas de Cultivo. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, v. 1, p. 29, 2006.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. DA S. **O cultivo da bananeira**. 1º edição ed. Cruz das Almas-BA: 2004, 2004.
- BUAH S, MLALAZI B, KHANNA H, DALE JL, MORTIMER CL. The Quest for Golden Bananas: Investigating Carotenoid Regulation in a Fe'i Group Musa Cultivar. **J Agric Food Chem**. 2016 Apr 27;64(16):3176-85. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05740
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–655, 2009.
- CAVALCANTE, M. DE J. B. et al. Reactive Oxygen Species and Cellular Interactions Between *Mycosphaerella fijiensis* and Banana. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 2, p. 134–143, 2011.
- CARBONE, I.; M.KOHN, L. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes, 1999.
- CASTAÑEDA NEN, ALVES GSC, ALMEIDA RM, AMORIM EP, FORTES FERREIRA C, TOGAWA RC, COSTA MMDC, GRYNBERG P, SANTOS JRP, CARES JE, MILLER RNG. (2017). Gene expression analysis in *Musa acuminata* during compatible interactions with *Meloidogyne incognita*. **Ann Bot**. 119: 915-930.
- CHEN, X. et al. SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: Star players for plant growth and development. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 11, p. 946–951, 2010.
- CHEN, L. et al. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta**, v. 234, n. 2, p. 377–390, 2011.
- CHEN, R. et al. Exploring MicroRNA-Like Small RNAs in the Filamentous Fungus *Fusarium oxysporum*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

CHEN, X. et al. Constructing lncRNA functional similarity network based on lncRNA-disease associations and disease semantic similarity. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11338, 2015.

CHISHOLM, S. T. et al. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803–814, 2006.

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

CORDEIRO, Z. J. M. **BANANA Produção, aspectos Técnicos**. Brasília: [s.n.].

CUI, J. et al. Prediction and validation of potential pathogenic microRNAs involved in *Phytophthora infestans* infection. **Molecular Biology Reports**, 2014.

CUI, J.; YOU, C.; CHEN, X. The evolution of microRNAs in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 2017.

CRUZ, F. et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 4, p. 607–616, 2009.

D’HONT, A. et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 213–217, 2012.

DAI, X.; ZHAO, P. X. PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. 155–159, 2011.

DANG, Y. et al. RNA Interference in Fungi: Pathways, Functions, and Applications. **EUKARYOTIC CELL**, v. 10, n. 9, p. 1148–1155, 2011.

DE SPIEGELAERE, W. et al. Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

DE ANDRADE LM, BRITO MD, PEIXOTO RF, MARCHIORI PER, NOBILE PM, MARTINS APB. Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods** 2017; 13:28. [72](https://doi.org/10.1186/s13007-017-0178-DENANCÉ, N. et al. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. <b>Frontiers in Plant Science</b>, v. 4, n. May, p. 1–12, 2013.</a></p><p>DEYOUNG, B. J.; INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. <b>Nature immunology</b>, v. 7, n. 12, p. 1243–1249, 2006.</p><p>DJAMI-TCHATCHOU, A. T. et al. Functional Roles of microRNAs in Agronomically Important Plants—Potential as Targets for Crop Improvement and Protection. <b>Frontiers in Plant Science</b>, v. 8, n. March, 2017.</p><p>E.E.CHEESMAN. Kew Bulletin,. <b>Classification of the Bananas: The Genus <i>Musa</i> L.</b>, v. 2, n. 2, p. 106–117, 1947.</p></div><div data-bbox=)

ELITZUR T, VREBALOV J, GIOVANNONI JJ, GOLDSCHMIDT EE, FRIEDMAN H (2010) The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. **J Exp Bot** 61(5):1523–1535

FAOSTAT, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014. FAOSTAT Agriculture Data. [Online] Available at: <http://faostat3.fao.org>

FELIX, G. et al. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **Plant Journal**, v. 18, n. 3, p. 265–276, 1999.

FEI, Q. et al. Small RNAs Add Zing to the Zig-Zag-Zig Model of Plant Defenses. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI, 2016.

FERNANDES, C. DE F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondonia**, v. 1, p. 14 p., 2009.

FERNANDES, C. DE F. et al. Estresse oxidativo e o mecanismo de defesa de plantas contra patógenos. **Documento Embrapa**, v. 3, p. 8–11, 2013.

FERREIRA, C. F. et al. O agronegócio da banana. v. 1, p. 832, 2015.

FENG X, LAI Z, LIN Y, LAI G, LIAN C. Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao (AAA group). **BMC Genomics**. 2015 Oct 20;16:823. doi: 10.1186/s12864-015-2046-7.

FIGUEIREDO, D. et al. Detecção e análise da variabilidade de seqüências do Banana streak virus ( BSV ) em Bananeiras no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 10, p. 118–123, 2006.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu.Rev.Phytopathol**, v. 9, p. 275–296, 1971.

FULCI, V.; MACINO, G. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 199–203, 2007.

GE Y, HU KD, WANG SS, HU LY, CHEN XY, LI YH, YANG Y, YANG F, ZHANG H. Hydrogen sulfide alleviates postharvest ripening and senescence of banana by antagonizing the effect of ethylene. *PLoS One*. 2017 Jun 29;12(6):e0180113. doi: 10.1371/journal.pone.0180113. eCollection 2017

GRIFFITHS-JONES, S. et al. Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. October, p. 121–124, 2017.

GLAZE BROOK, J. contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 205–227, 2005.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. **Applied and**

**environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–1330, 1995.

GOODWIN, S. B. et al. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 6, p. e1002070, 2011.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D. et al. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 162–166, 2010.

GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 609–618, 2008.

H.KIMATI et al. **Manual de Fitopatologia, Vol II**. 3. ed. São Paulo: [s.n.].

HAKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **International Association for Plant Taxonomy**, v. 62, n. 4, p. 809–813, 2013.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication , Genomics and the Future for Banana. p. 1073–1084, 2007.

HONG, S.-Y. et al. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 112, 2008.

HUANG, J.; LI, Z.; ZHAO, D. Deregulation of the Os miR160 Target Gene OsARF18 Causes Growth and Developmental Defects with an Alteration of Auxin Signaling in Rice. **Nature Publishing Group**, v. 1, n. July, p. 1–14, 2016.

HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 93, 2009.

IBGE. **LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA**, v. 30, p. 115, 2017.

JAIN, M. et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 2, p. 646–651, 2006.

JEONG, D. et al. Massive Analysis of Rice Small RNAs : Mechanistic Implications of Regulated MicroRNAs and Variants for Differential Target RNA Cleavage. **The Plant Cell**, v. 23, n. December, p. 4185–4207, 2011.

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

329, 2006.

KANG, K. et al. Identification of microRNA-Like RNAs in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* by Solexa Sequencing. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–7, 2013.

KANG, Y. et al. Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 139, 2012.

KANNAN, C.; PRAKASAM, V. Ultra structural studies on the infection process of *Mycosphaerella musicola*-causal agent of yellow sigatoka on banana. **indian phytopathology**, v. 65, n. 2, p. 192–195, 2012.

KATIYAR-AGARWAL, S.; JIN, H. Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions.

KUMARAVEL M, UMA S, BACKIYARANI S, SARASWATHI MS, VAGANAN MM, MUTHUSAMY M,SAJITH KP. Differential proteome analysis during early somatic embryogenesis in *Musa* spp. AAA cv. Grand Naine. Plant Cell Rep. 2017 Jan;36(1):163-178. doi:10.1007/s00299-016-2067-y.**Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 225–246, 2010.

LIN, Y. L.; LAI, Z. X. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree. **Plant Science**, v. 178, n. 4, p. 359–365, 2010.

LEE, H. et al. Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer-Independent Small Interfering RNAs in Fungi. **Molecular Cell**, v. 38, n. 6, p. 803–814, 2010.

LEE, J. M. et al. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **BMC Molecular Biology**, v. 11, 2010.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell Press**, v. 75, p. 843–854, 1993.

LEE, P. D. et al. Control Genes and Variability : Absence of Ubiquitous Reference Transcripts in Diverse Mammalian Expression Studies Control Genes and Variability : Absence of Ubiquitous Reference Transcripts in Diverse Mammalian Expression Studies. p. 292–297, 2002.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **the EMBO Journal**, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.

LEE WS, GUDIMELLA R, WONG GR, TAMMI MT, KHALID N, HARIKRISHNA JA. Transcripts and MicroRNAs Responding to Salt Stress in *Musa acuminata* Colla (AAA Group) cv. Berangan Roots. PLoS One. 2015 May 20;10(5):e0127526. doi:10.1371/journal.pone.0127526.

LIN, Y. L.; LAI, Z. X. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic

embryogenesis in longan tree. **Plant Science**, v. 178, n. 4, p. 359–365, 2010.

LI, J. et al. Genome-wide identification and characterization of long intergenic non-coding RNAs in *Ganoderma lucidum*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

LI, L. et al. Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. **Annual. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 423–452, 2007.

LIN, W. C. et al. Identification of microRNA in the protist *Trichomonas vaginalis*. **Genomics**, v. 93, n. 5, p. 487–493, 2009.

LIN Y, ZHANG C, LAN H, GAO S, LIU H, LIU J, CAO M, PAN G, RONG T, ZHANG S. Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. **PLoS ONE**. 2014;9(5):e95445

LIU, T. et al. Identification and characterisation of non-coding small RNAs in the pathogenic filamentous fungus *Trichophyton rubrum*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 931, 2013.

LO PRESTI, L. et al. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 513–545, 2015.

MARONE, D. et al. Plant Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes: Active Guardians in Host Defense Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7302–7326, 2013.

MARTIN, A. P. et al. A developing *Setaria viridis* internode: An experimental system for the study of biomass generation in a C4 model species. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

MATTICK, J. S. Non-coding RNAs : the architects of eukaryotic complexity. **EMBO reports**, v. 2, n. 11, p. 986–991, 2001.

MEYERS, B. C. et al. Genome-Wide Analysis of NBS-LRR–Encoding Genes in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 15, n. April, p. 809–834, 2003.

MEYERS, B. C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R. S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 129–134, 2005.

MBEGUIE-MBEGUIE D, HUBERT O, SABAU X, CHILLET M, FILS-LYCAON B, BAURENS FC (2007) Use of suppression subtractive hybridization approach to identify genes differentially expressed during early banana fruit development undergoing changes in ethylene responsiveness. **Plant Sci** 172(5):1025–1036.

MAROUFI, A.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 11, 2010.

MEYERS, B. C. et al. Genome-Wide Analysis of NBS-LRR–Encoding Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v. 15, n. April, p. 809–834, 2003.

MILLER, R. N. G. et al. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. **BMC Plant Biology**, v. 15, p. 1–15, 2008.

MOLNÁR, A. et al. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1126–1129, 2007.

MONOSI, B. et al. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 7, p. 1434–1447, 2004.

MOHR, T. J. et al. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP8 is induced by pathogens and salicylic acid and is regulated by W box cis elements. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, v. 23, n. 10, p. 1303–15, 2010.

MUTHUSAMY, M. et al. Computational prediction, identification, and expression profiling of microRNAs in banana (*Musa* spp.) during soil moisture deficit stress. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 208–214, 2014.

NAVARRO, L. et al. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. **SCIENCE**, v. 312, n. 5772, p. 436–439, 2006.

NAVARRO, L. Tansley review Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. **New Phytologist**, p. 394–404, 2013.

NICOT, N. et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2907–2914, 2005.

NOAR, R. D.; DAUB, M. E. Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity gene. **BMC genomics**, v. 17, p. 690, 2016.

NOZAWA, M.; MIURA, S.; NEI, M. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 230–239, 2012.

OUYANG, S. et al. MicroRNAs Suppress NB Domain Genes in Tomato That Confer Resistance to *Fusarium oxysporum*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004464, 2014.

PAOLACCI, A. R. et al. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 1–27, 2009.

PASSOS, M. A et al. Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 78, 2013.

PARK, M. Y. et al. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 10, p. 3691–3696, 2005.

PELÁEZ, P. et al. Identification and characterization of microRNAs in *Phaseolus vulgaris* by high-throughput sequencing. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2012.

PFAFFL, M. Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl. **A-Z of quantitative PCR**, p. 87–112, 2004.

PODEVIN, N. et al. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop *Musa*. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 3, p. 1237–1252, 2012.

PORTER, B. W. et al. Genome-wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 281, n. 6, p. 609–626, 2009.

PUCCIARIELLO, C. et al. Reactive Oxygen Species-Driven Transcription in *Arabidopsis* under Oxygen Deprivation. **Plant Physiology**, v. 159, n. 1, p. 184–196, 2012.

QI, Y. et al. Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis*. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 7, p. 702–708, 2011.

QIAGEN. REST 2009 Software User Guide For gene expression analysis using real-time Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. **Manual**, n. December, 2009.

QU, J. et al. Identification and Characterization of Small Noncoding RNAs in Genome Sequences of the Edible Fungus *Pleurotus ostreatus*. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 25–28, 2016.

RADWAN, O.; LIU, Y.; CLOUGH, S. J. Transcriptional analysis of soybean root response to *Fusarium virguliforme*, the causal agent of sudden death syndrome. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 24, n. 8, p. 958–972, 2011.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. Bacterial flagellins : mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Cell**, v. 12, n. 11, p. 510–517, 2004.

REINHART, B. J. et al. MicroRNAs in plants. **GENES & DEVELOPMENT**, v. 16, n. 13, p. 1616–1626, 2002.

REUBER, T. L.; AUSUBE, F. M. Isolation of *Arabidopsis* Genes That Differentiate between Resistance Responses Mediated by the RPS2 and RPM7 Disease Resistance Genes. **the Plant**



**Cell Online**, v. 8, n. 2, p. 241–249, 1996.

ROGERS, K.; CHEN, X. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. **The Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2383–2399, 2013.

SHANG, J. et al. Identification of a New Rice Blast Resistance Gene, *Pid3*, by Genomewide Comparison of Paired Nucleotide-Binding Site–Leucine-Rich Repeat Genes and Their Pseudogene Alleles Between the Two Sequenced Rice Genomes. **Genetics**, v. 182, n. 4, p. 1303–1311, 2009.

SEO, J.-K. et al. Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, 2013.

SILVA, S. D. O. E. et al. Melhoramento genético da bananeira: Estratégias e tecnologias disponíveis. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal**, v. 35, p. 919–931, 2013.

SIMMONDS, N. W. Segregations in some diploid bananas. **Journal of Genetics**, v. 51, n. 3, p. 458–469, 1953.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The Botany Journal of the Linnean Society of London**, v. 55, n. 359, p. 302–312, 1955.

SIMMONDS JH. Banana Leaf Spot. Queensland: Department of Agriculture and Stock Division of Entomology and Plant Pathology. 1933.

SIMMONDS, N.W. Diseases. In: SIMMONDS, N.W. Bananas. 2<sup>nd</sup> Ed. London: Longmans, 1966. p. 366-408.

SPARKS, E.; WACHSMAN, G.; BENFEY, P. N. Spatiotemporal signalling in plant development. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 9, p. 631–644, 2013.

STOVER, R. H. Leaf spot of bananas caused by *M. musicola*: role of conidial in epidemiology. **Phytopathology**, p. 856–860, 1970.

STOVER R.H. Sigatoka Leaf Spots of Bananas and plantain. **Plant disease**, v. 64, n. 8, p. 750–756, 1980.

SU, Y. et al. Small RNA sequencing reveals a role for sugarcane miRNAs and their targets in response to *Sporisorium scitamineum* infection. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 325, 2017.

SUNKAR, R.; JAGADEESWARAN, G. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. **BMC plant biology**, v. 8, p. 37, 2008.

TAN, X. et al. Global expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, v. 7, p. 1–20, 2007.

TANG, J.; CHU, C. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. **Nature Plants**, v. 3, n. June, p. 17077, 2017.

THOMAS-HALL S, CAMPBELL PR, CARLENS K, KAWANISHI E, SWENNEN R, SAGI

L, SCHENK PM (2007) Phylogenetic and molecular analysis of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene family in banana. **J Exp Bot** 58(10):2685–2697.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 71–74, 2007.

VAN DEN BERG N, BERGER DK, HEIN I, BIRCH PRJ, WINGFIELD MJ, VILJOEN A (2007) Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. **Mol Plant Pathol** 8(3):333–341

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual review of phytopathology**, v. 44, p. 135–62, 2006.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 711, p. 34–1, 2002.

VOINNET, O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 669–687, 2009.

XU, H., BAO, J. D., DAI, J. S., LI, Y., & ZHU, Y. (2015). Genome-wide identification of new reference genes for qRT-PCR normalization under high temperature stress in rice endosperm. **PLoS ONE**, 10, e0142015

WANG, J. et al. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1688–1695, 2004.

WEI, C. et al. The I2 resistance gene homologues in *Solanum* have complex evolutionary patterns and are targeted by miRNAs. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014.

WEIBERG, A. et al. Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 495–516, 2014.

XIA, K. et al. Overexpression Leads to More Tillers , Early Flowering and Less Tolerance to Salt and Drought in Rice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.

YANG, L.; HUANG, H. Roles of small RNAs in plant disease resistance. **Journal of integrative plant biology**, v. 56, p. 962–970, 2014.

YANG, S. et al. Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 280, n. 3, p. 187–198, 2008.

YANG, L. et al. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 57, n. 12, p. 1078–1088, 2015.

YANG QS, GAO J, HE WD, DOU TX, DING LJ, WU JH, LI CY, PENG XX, ZHANG S, YI GJ. Comparative transcriptomics analysis reveals difference of key gene expression between banana and plantain in response to cold stress. **BMC Genomics**. 2015 Jun10;16:446. doi: 10.1186/s12864-015-1551-z.

- YANG, F. Genome-wide analysis of small RNAs in the wheat pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. **Fungal Biology**, v. 119, n. 7, p. 631–640, 2015.
- YU, B. et al. Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. **Science**, v. 307, n. 5711, p. 932–935, 2005.
- ZERBINI, F. M.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, E. C. DE. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **Revisão Anual de Patologias de Plantas**, v. 13, n. January, p. 191–244, 2005.
- ZHANG, J.; ZHOU, J. M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Molecular Plant**, v. 3, n. 5, p. 783–793, 2010.
- ZHANG, Y. Q. et al. Genome-wide computational identification of microRNAs and their targets in the deep-branching eukaryote *Giardia lamblia*. **Computational Biology and Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 391–396, 2009.
- ZHANG, T. et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. **Nature Plants**, v. 2, n. 10, p. 16153, 2016.
- ZHANG, L. et al. Identification and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in banana (*Musa* spp.) under *Fusarium* wilt resistance induction conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 11–12, p. 746–754, 2017.
- ZHAO, C. et al. Small RNA and Degradome Deep Sequencing Reveals Peanut MicroRNA Roles in Response to Pathogen Infection. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 4, p. 1013–1029, 11 ago. 2015.
- ZHAO, T. et al. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **GENES & DEVELOPMENT**, v. 21, p. 1190–1203, 2007.
- ZHOU, J.; FU, Y.; XIE, J. Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. **Mol Genet Genomics**, n. 287, p. 275–282, 2012.
- ZHOU, Q. et al. Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. **Fungal Biology**, v. 116, n. 11, p. 1156–1162, 2012.
- ZVEREVA, A. S.; POOGGIN, M. M. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2578–2597, 2012.