

MARCO AURÉLIO NINÔMIA PASSOS

**A CARACTERIZAÇÃO DE GENES E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MOLECULARES NA INTERAÇÃO ENTRE *Musa acuminata* E *Mycosphaerella
fijiensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia, da Universidade Católica de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Brasília

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

P289c

Passos, Marco Aurélio Ninômia.

A caracterização de genes e desenvolvimento de marcadores moleculares na interação entre *Musa acuminata* e *Mycosphaerella fijiensis* / Marco Aurélio Ninômia Passos. – 2009.

114 f. : il. ; 30 cm.

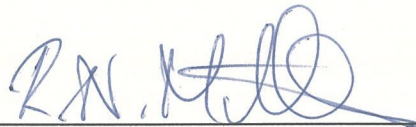
Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2009.

Orientação: Robert Neil Gerard Miller.

1. Banana – Doenças e pragas. 2. Banana – Marcadores genéticos. 3. Polimorfismo.(Genética). I. Miller, Robert Neil Gerard, orient. II. Título.

CDU 632.9

Dissertação de autoria de Marco Aurélio Ninômia Passos, intitulada “A caracterização de genes e desenvolvimento de marcadores moleculares na interação entre *Musa acuminata* e *Mycosphaerella fijiensis*”, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, defendida e aprovada, em 18 de Fevereiro de 2009, pela banca examinadora abaixo assinada:



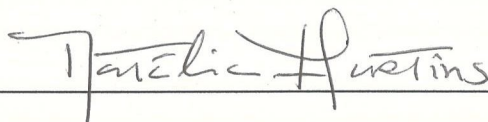
Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Orientador



Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Examinador Interno



Profa. Dra. Natalia Florencio Martins

Examinadora Externa



Profa. Dra. Ana Yamaguishi Ciampi

Examinadora Externa

Brasília

2009

À minha mãe Quiyomí, meu pai Wilson, minha irmã Thaís e minha tia-mãe Irene, que são os principais responsáveis pela pessoa que sou hoje, e que muitas vezes se sacrificaram para que meus sonhos se realizassem.

AGRADECIMENTO

Ao orientador Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller pela orientação, confiança, incentivo, compreensão, paciência e pela grande contribuição com meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Octávio Luiz Franco, pelo apoio com a Modelagem Molecular e pela contribuição na correção deste documento.

A Dra. Natalia Florencio Martins, pelo acompanhamento, incentivo e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Ana Yamaguishi Ciampi, pelo grande apoio, incentivo e grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Georgios Joannis Pappas Júnior pela orientação, ensinamentos e sugestões durante a realização deste trabalho.

A colega Simone Neto, pela grande colaboração nos trabalhos de Modelagem Molecular.

A colega Natália Menezes, pela ajuda nos trabalhos com os marcadores moleculares.

A amiga Flávia Leonel, pelo carinho, incentivo, companheirismo, paciência e por estar sempre ao meu lado, mesmo em pensamentos, todas as vezes que precisei.

Aos amigos do Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, Suelen Rabelo, Gláucia Emy, Aline Nunes, Cristiane Teixeira, Camila Louly e Ciro de Sousa.

Ao CNPq, FINEP, IAEA, EMBRAPA e UCB pelo apoio técnico e financeiro.

A todos aqueles que me ajudaram de maneira direta ou indireta no desenvolvimento desse trabalho.

E a minha família, pelo apoio e amor em toda minha vida.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

Referência: PASSOS, MAN. **A caracterização de genes e desenvolvimento de marcadores moleculares na interação entre *Musa acuminata* e *Mycosphaerella fijiensis***. 2009. 114p. Ciências Genômicas e Biotecnologia-Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

O cultivo da banana é muito amplo, já que esta pode ser cultivada em vários ambientes, além de ser considerada fonte barata de energia. O cultivo da bananeira no Brasil é afetado por diversos problemas causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos. Os fungos são, indiscutivelmente, os agentes infecciosos de maior importância para a bananicultura brasileira e causam diversas doenças de pré e pós-colheita. Uma das estratégias para a solução dos problemas mencionados é a criação de novas variedades com resistência a doenças e a pragas e mais tolerantes às adversidades. Isto se dá mediante o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, baseados em técnicas convencionais ou biotecnológicas, que possibilitam a obtenção de genótipos superiores. Objetivando a disponibilização de *primers* para programas de mapeamento genético da bananeira, marcadores moleculares microssatélites (SSRs) vêm sendo investigados, com a utilização de sequências de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) e BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) de *Musa acuminata*. Nesse contexto, *primers* flanqueando os microssatélites foram desenhados, otimizados e testados para polimorfismo entre indivíduos diplóides de *M. acuminata* contrastando em resistência e susceptibilidade às Sigatokas negra e amarela. Marcadores polimórficos podem ser aplicados para a saturação de mapas genéticos derivados de cruzamentos entre parentais contrastando em resistência às Sigatokas. A identificação de genes diferencialmente expressos durante a interação entre cultivares resistentes e suscetíveis de *Musa acuminata* e *Mycosphaerella fijiensis*, organismo causador da Sigatoka Negra, foi conduzida através de uma análise de bioinformática *in silico*. A expressão gênica foi caracterizada em *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavensish Grande Naine contrastantes em resistência à Sigatoka Negra (BLS) em fases diferentes durante a infecção pelo patógeno. O genótipo diplóide selvagem *M. acuminata* Calcutta 4 foi escolhido como um modelo, dado o seu potencial como doador de R-gene no melhoramento de *Musa*. Em

contrapartida, *M. acuminata* Cavensish Grande Naine representou um cultivar comercial suscetível à Sigatoka Negra (BLS). Neste trabalho, vários genes candidatos diferencialmente expressos envolvidos na defesa e nas respostas a estresses foram observados.

Palavras-chave: *Musa acuminata*, *Expressed sequence tags* (ESTs), *simple sequence repeats* (SSRs), polimorfismo, estresse biótico, Sigatoka Negra

ABSTRACT

Cultivation of bananas is widespread worldwide, as it can be easily cultivated in many environments, and is considered to be a cheap source of energy. Banana production in Brazil is affected by various problems caused by fungi, bacteria, viruses, nematodes and insects. Fungal pathogens are, without doubt, the most important infectious agents in Brazil, causing various pre-and post-harvest diseases. One strategy to solve such problems is the development of new varieties resistance to diseases and pests and more tolerant to adverse conditions. This can be conducted through genetic improvement programmes based on conventional or biotechnological techniques, which enable development of superior genotypes. With the broad intention of developing resources for banana genetic improvement, novel microsatellites molecular markers (SSRs) for *Musa* were developed from ESTs (Expressed Sequence Tags) and BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) in *Musa acuminata*. In this context, primers flanking the microsatellites were designed, optimized and tested for polymorphism across individual of *M. acuminata* diploids contrasting in resistance and susceptibility to black and yellow Sigatoka diseases. Polymorphic markers can be applied for saturation of genetic maps derived from crossings between parents contrasting in resistance to Sigatoka. The identification of genes differentially expressed during the interaction between resistant and susceptible cultivars of *M. acuminata* and *M. fijiensis*, the causal organism of black Sigatoka, was conducted by an *in silico* bioinformatics analysis. Gene expression was characterized in *M. acuminata* Calcutta 4 and *M. acuminata* Cavendish Grande Naine contrasting in resistance to Black Sigatoka, (BLS) at different stages during infection by the pathogen. The wild diploid genotype *M. acuminata* Calcutta 4 was chosen as a model, given its potential as a donor of R-genes for breeding in *Musa*. In contrast, *M. acuminata* Cavendish Grande Naine was chosen as a commercial cultivar susceptible to black Sigatoka. In this study, numerous differentially expressed candidate genes involved in defense and stress responses were observed.

KEYWORDS: *Musa acuminata*, Expressed sequence tags (ESTs), simple sequence repeats (SSRs), polymorphism, biotic stress, Black Sigatoka.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Etapas envolvidas no processo de obtenção de modelos protéicos de proteínas-alvo através da utilização da estratégia de modelagem molecular por homologia estrutural (pág.34)

Figura 2 - Gel de Agarose 1% - Análise do RNA de Banana (CAV) (pág.63)

Figura 3 - Figuras representativas dos modelos estruturais das proteínas seq5 (a), seq7 (b), seq11 (c), seq12 (d) (pág.67)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxonomia do gênero *Musa* (pág.17).

Tabela 2 - Condições gerais adotadas para o desenho dos *primers* (pág.42).

Tabela 3 - Relação entre as amostras de *Musa* e sua resistência ou suscetibilidade às Sigatokas (pág.46).

Tabela 4 - Resumo das estatísticas dos ESTs das bibliotecas *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande naine (pág.48).

Tabela 5 - ESTs diferencialmente expressos gerados, após análise "in silico", em comum entre as bibliotecas infectadas de folhas de Calcutta 4 e Cavendish. (pág.49).

Tabela 6 - ESTs diferencialmente expressos nas bibliotecas de folhas infectadas de *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish. (pág.54).

Tabela 7 - ESTs diferencialmente expressos das bibliotecas de folhas infectadas de Calcutta 4 e Cavendish, associados a alguma resposta de defesa. (pág.59).

Tabela 8 - Lista de *primers* desenhados para a validação dos genes diferencialmente expressos através da técnica de q-PCR. (pág.61).

Tabela 9 - Modelos de coordenadas atômicas escolhidas para a modelagem por homologia. Tal seleção se baseou na pontuação (score) obtida pelos algoritmos FFAS03 e/ou 3D-Jury. (pág.66).

Tabela 10 - Distribuição dos SSRs derivados dos ESTs (Calcutta 4 e Cavendish) e dos BACs (pág.69).

Tabela 11 - Características dos locos microssatélites polimórficos originados de *M. acuminata* Calcutta 4 e testados em 20 indivíduos de *M. acuminata*, contrastantes em resistência à Sigatoka Negra e Sigatoka Amarela (pág.72).

Tabela 12 - Características dos *primers* otimizados, derivados dos BACs (pág.76).

Tabela 13 - Relação de *primers* de *Musa* otimizados em ordem crescente de nomenclatura – obtidos de sequências de ESTs (pág.78).

LISTA DE SIGLAS

- arp* - *Auxin – repressed protein like* (proteína reprimida por auxina)
- BAC - *Bacterial Artificial Chromosome* (cromossomo artificial de bactéria)
- BLSD - *Black Leaf Streak Disease* (Sigatoka Negra)
- cDNA - *Complementary DNA* (DNA complementar)
- DDD - *Digital Differential Display*
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
- EAOs - Espécies ativas de oxigênio
- EST - *Expressed Sequence Tags* (seqüências expressas)
- GLP - *Germin-like protein*
- GST - *Glutathione S-transferase*
- HR - Reações de hipersensibilidade
- LRR - *Leucine Rich Repeat* (repetições ricas de leucina)
- MA4 – *Musa acuminata* Calcutta 4
- MACV – *Musa acuminata* Cavendish
- MT - Metalotioneína
- NBS - *Nucleotide-binding site* (sítios de ligação a nucleotídeos)
- PCD - Morte celular programada
- PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- PRPs - *Pathogenesis-Related Proteins* (proteínas relacionadas à patogenicidade)
- q-PCR – *Quantitative PCR* (PCR quantitativo)
- QTL - *Quantitative trait loci* (locos de caracteres quantitativos)
- RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA* (amplificação randômica de DNA polimórfico)
- RGA - *Resistance Gene Analogs* (genes análogos de resistência)

RNA - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rRNA - *Ribosomal RNA* (RNA ribossômico)

ROI - *Reactive Oxygen Intermediates* (intermediários reativos do oxigênio)

ROS - *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)

SAGE – *Serial Analysis of Genetic Expression* (análise serial da expressão gênica)

SAR - *Systemic Acquired Resistance* (resistência sistêmica adquirida)

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismos nucleotídicos simples)

SSR - *Simple Sequence Repeat* (seqüências simples repetitivas)

TCTP - *Translationally - Controlled Tumor Protein homolog* (proteína de tumor controlada traducionalmente)

tRNA – *Transfer RNA* (RNA transportador)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Importância social e econômica da banana	15
1.2 Resistência e defesa em plantas	20
1.3 Melhoramento genético.....	22
1.4 Utilização de marcadores moleculares	24
1.5 Genômica	25
1.6 Modelagem de proteínas	32
1.6.1 Modelagem molecular por homologia estrutural	32
OBJETIVOS	35
Objetivo Geral	35
Objetivos específicos.....	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Sequenciamento do cDNA de <i>M. acuminata</i> Calcutta 4 e <i>M. acuminata</i> Cavendish Grande Naine	37
2.2 Análise bioinformática de sequências de ESTs.....	38
2.2.1 Processamento de sequências.....	38
2.2.2 Identificação de um <i>Unigene Set</i>	38
2.2.3 Identificação <i>in silico</i> de genes diferencialmente expressos	39
2.2.4 Identificação de marcadores gênicos do tipo SSR em <i>Musa</i> para utilização em mapeamento genético	39
2.3 Modelagem protéica por homologia estrutural	40
2.4 Validação da expressão diferencial via qRT-PCR	41
2.4.1 Desenho de <i>primers</i> q-PCR para validação dos genes diferencialmente expressos <i>in silico</i>	41
2.4.2 Otimização da extração do RNA total para validação da expressão gênica via qRT-PCR..	42
2.5 Validação de marcadores microssatélites derivados de sequências de ESTs e BACs de <i>M. acuminata</i>	44
2.5.1 Otimização dos <i>primers</i> SSR originados de sequências ESTs e BACs	44
2.5.2 Caracterização e validação de marcadores microssatélites polimórficos derivados de sequências de ESTs e BACs de <i>M. acuminata</i>	45
2.5.3 PCR eletrônico	47
3 RESULTADOS.....	48
3.1 Sequenciamento do cDNA de <i>M. acuminata</i> Calcutta 4 e <i>M. acuminata</i> Cavendish Grande Naine	48
3.2 Identificação <i>in silico</i> de genes diferencialmente expressos	49

3.3 Validação da expressão diferencial via q RT-PCR	60
3.3.1 Desenho de <i>primers</i> q-PCR para validação dos genes diferencialmente expressos <i>in silico</i>	60
3.3.2 Otimização da extração do RNA total para validação da expressão gênica via qRT-PCR..	63
3.4 Modelagem protéica	64
3.5 Identificação dos marcadores microssatélites	68
3.6 Caracterização dos marcadores microssatélites derivados das sequências BAC de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>burmannicoides</i> , var. Calcutta 4.....	71
3.7 Otimização e validação dos <i>primers</i> SSR originados de sequências dos ESTs e BACs.....	76
3.8 PCR eletrônico	82
4 DISCUSSÃO.....	83
4.1 Análise <i>in silico</i> da expressão diferencial	84
4.2 Marcadores microssatélites	90
4.3 Modelagem Protéica.....	91
CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	95
APÊNDICE	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância social e econômica da banana

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta pertencente à classe *Liliopsida*, subclasse *Zingiberidae*, superordem *Liliana*, ordem *Zingiberales*, família *Musaceae* (CRONQUIST, 1981; BELALCÁZAR CARVAJAL, 1991). A família *Musaceae* é dividida em três subfamílias: *Heliconoideae*, *Strelitzoideae* e *Musoideae*. Dentro da subfamília *Musoideae* encontram-se os gêneros *Ensete* e *Musa*. As bananeiras com frutos comestíveis pertencem ao gênero *Musa*. Frequentemente, o gênero *Musa* está subdividido nas seções *Rhodoclamys* e *EuMusa* com número de cromossomos $x = 11$, *AustraliMusa* com $x = 10$ e *CalliMusa* que pode apresentar $x = 10$ ou $x = 9$ (SIMMONDS & WETHERUP, 1990; DOLEZEL & BARTOS, 2005). Além disso, existem três espécies para as quais a seção ainda tem que ser determinada: *Musa ingens* ($2n = 14$), *Musa lasiocarpa* ($2n = ?$) e *Musa boman* ($2n = ?$) (HORRY et al., 1997). A maioria das bananas cultivadas surgiu de espécies do grupo *EuMusa*. A maior dispersão geográfica também é notada nesta seção que conta com cerca de 11 espécies (HORRY et al., 1997), incluindo espécies como a *Musa balbisiana* (Colla) e a *M. acuminata* (Colla) (TEZENAS du MONTCELL, 1988). A maioria dos cultivares é obtida a partir de duas espécies, *M. acuminata* (genoma A) e *M. balbisiana* (genoma B), sendo que a *M. acuminata* é a mais frequente das espécies de *EuMusa*. Mudanças cromossômicas estruturais que têm ocorrido espontaneamente, ou como um resultado de eventos de recombinação, resultaram no desenvolvimento de barreiras reprodutivas naturais no âmbito das espécies, causando divergência de subespécies e diversidade genética na espécie como um todo. Nove subespécies têm sido reconhecidas (HORRY et al., 1997) (Tabela 1).

A comestibilidade de frutos maduros de diplóides de *M. acuminata* (AA) surgiu como resultado da esterilidade feminina e da partenocarpia. Esses tipos comestíveis, provavelmente, foram selecionados e mantidos pelos seres humanos. Triplóides AAA surgiram a partir desses cultivares diplóides, talvez do cruzamento entre diplóides comestíveis e subespécies selvagens de *M. acuminata*, dando origem a uma ampla gama de genótipos AAA. Os cultivares diplóides e triplóides de *M. acuminata* foram levados por seres humanos para as áreas onde a

espécie *M. balbisiana* é nativa (Índia, Myanmar, Tailândia, Filipinas) e hibridações naturais resultaram na formação de uma progênie híbrida com os genomas AB, AAB, ABB (Tabela 1). A *M. balbisiana* é considerada mais resistente à seca e às doenças do que a *M. acuminata*, e essas características são frequentemente encontradas em cultivares contendo o genoma B. Eventos de hibridação teriam dado origem a uma vasta gama de tipos comestíveis da banana, alguns dos quais teriam sobrevivido e sido multiplicados sob domesticação. Pensa-se que a subsequente dispersão das bananas comestíveis para fora da Ásia foi provocada unicamente por seres humanos (SIMMONDS, 1962) e a história da cultura das bananas estaria, portanto, intimamente ligada ao início do movimento das populações humanas. Essa precoce dispersão de cultivares de banana resultou no desenvolvimento de distintas variedades, em diferentes localizações geográficas. Mutações somáticas podem ter sido responsáveis pela diversificação de subgrupos de bananas cultivadas. Mutações afetando características de interesse econômico ou agrícola foram selecionadas pelos agricultores ao longo dos anos e multiplicadas por propagação vegetativa para produzir morfotipos.

Na seção *AustraliMusa* existe um grupo de tipos partenocárpicos comestíveis coletivamente conhecidos como Fe'i. Estes podem ser distinguidos de outras bananas cultivadas pelos seus cachos eretos, frutas vermelhas e, geralmente, presença de seiva. Além de fornecerem fonte de alimento, fibras para cordas e tecelagem, um corante vermelho escuro pode ser extraído dessas bananas. Pouco se sabe sobre as origens dessa cultura, embora vários autores tenham especulado sobre possíveis antepassados selvagens. Simmonds (1956) sugere que *M. maclayi* é o mais provável antepassado, enquanto Cheesman (1950) assinala a sua semelhança com *M. lolodensis*, porém novos estudos são necessários antes que esta dúvida possa ser esclarecida (CARREEL, 1994). Recentemente, os aspectos da taxonomia de *Musa* estão tornando-se cada vez mais claros devido aos estudos realizados em seu nível molecular (HESLOP & SCHWARZACHER, 2007).

Tabela 1 - Taxonomia do gênero *Musa* (tabela adaptada de DANIELLS et al., 2001)

Gênero	Secção	Espécies/ Grupos	Sub-especies/ sub-grupos
MUSA	EUMUSA (2n=22)	Espécies selvagens acuminata	banksii burmannica burmannicoides malaccensis microcarpa truncata siamea zebrina errans
		balbisiana schizocarpa basjoo itinerans flaviflora sikkimensis cheesmani nagensium halabanensis ochracea	
	RHODOCHLAMYS	Espécies selvagens laterita ornata sanguinea velutina	
	CALLIMUSA (2n=20)	Espécies selvagens coccinea violascens gracilis borneensis beccarii* salaccensis	
	AUSTRALIMUSA (2n=20)	Espécies selvagens maclayi maclayi maclayi maclayi peekelii peekelii jackeyi lolodensis textilis bukensis	maclayi var. maclayi maclayi var. namatani maclayi var. erecta ailuluai peekelii angustigemma
	Incertae sedis	Espécies selvagens ingens boman lasiocarpa	
MUSA	EUMUSA	Variedades cultivadas acuminata AA	Sucrier Pisang Jari Buaya

Gênero	Secção	Espécies/ Grupos	Sub-espécies/ sub-grupos
			Pisang lilin Inarnibal Lakatan Unknown
		AAA	Gros Michel Cavendish Red Ambon Ibota Mutika/Lujugira Orotava Rio
		AAAA	
		acuminata x balbisiana	
		AB	Ney Poovan Kamaramasenge
		AAB	Iholena Laknau Mysore Silk Pome Maia Maoli/Popoulu Pisang Nangka Pisang Raja Plantain Nendra Padaththi Pisang Kelat Nadan
		ABB	Bluggoe Pisang Awak Monthan Kalapua Klue Teparod Saba Pelipita Ney Mannan Peyan
		AAAB	
		AABB	'Laknau der'
		ABBB	
		acuminata x schizocarpa	
		AS	
	AUSTRALIMUSA	Variedades cultivadas	
		Fe'i	
	EUMUSA x	Variedades cultivadas	
		AT	
		AAT	
		ABBT	

A banana é a mais importante fruticultura em termos de produção e consumo, sendo cultivada em muitos países. Ela atua como um componente da dieta básica nos países em desenvolvimento, sendo considerada um alimento de alta energia, rico em minerais e vitaminas, com um curto prazo de validade (TRUJILLO, 2007).

O Brasil é, atualmente, o segundo maior produtor de *Musa*, contribuindo para, aproximadamente, 10% da produção mundial. *Musa* é considerada uma lavoura perene e importante para o país, fácil de ser cultivada durante todo o ano, inclusive por pequenos produtores em solos e climas diferentes, além de contribuir para manter a fertilidade do solo. A maioria da produção no Brasil é direcionada para o mercado interno, onde *Musa* também representa um componente importante da dieta de comunidades mais pobres, oferecendo uma fonte barata de vitaminas A, C, e B6, além de cálcio, potássio e enxofre. A banana é produzida em todo o país, com os principais estados produtores sendo: São Paulo (1.151.600 toneladas), Bahia (763.901 toneladas), Pará (723.694 toneladas), Santa Catarina (628.850 toneladas) e Minas Gerais (607.575 toneladas) (IBGE-SIDRA, 2004). Sua cultura tem grande importância econômica e social em todo o mundo, sendo cultivada em mais de uma centena de países, principalmente por pequenos agricultores, que utilizam a banana como fonte de alimento e fonte de renda em seu orçamento. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana, com uma produção aproximada de 6,9 milhões de toneladas (~8,5% da produção mundial), em uma área cultivada de 508 mil hectares (FAOstat, 2009).

O cultivo da bananeira no Brasil é afetado por problemas fitossanitários causados por mais de 50 patógenos fúngicos, bactérias, vírus, nematóides e insetos, com a maioria de variedades comerciais não apresentando resistência a doenças. As doenças fúngicas de maior importância para a bananicultura brasileira são o “Mal-do-Panamá” (causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), a Sigatoka Amarela (causado por *Mycosphaerella musicola*) e a Sigatoka Negra (causado por *M. fijiensis*). O Moko ou murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, raça 2 [*Pseudomonas solanacearum* (Smith)], é também um dos graves problemas que afetam a bananicultura. Destacam-se, também, como pragas danosas, o nematóide *Radopholus similis* e a broca-do-rizoma, esta causada pelo *Cosmopolites sordidus*. As pragas e as doenças são responsáveis por severas perdas na produção de banana, que, a depender dos fatores envolvidos, podem ser de até 100%, uma vez que, em muitos casos, não existe nenhuma alternativa de controle. As grandes perdas da produção mundial da banana são normalmente causadas pelos patógenos fúngicos *M. fijiensis*, causador da Sigatoka Negra

(BLSD), e *F. oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, que causa o “Mal-do-Panamá”. O controle químico da BLSD pode vir a ser inadequado tanto socioeconômico quanto ambientalmente. Tal controle necessita de estratégias que não permitam o desenvolvimento da resistência do patógeno ao fungicida (MILLER et al., 2008). Na ausência de variedades melhoradas, o uso de pesticidas é a única forma de controle (SOUZA, 2002). O elevado custo dessa forma de controle está fora do alcance da maioria dos pequenos agricultores, que acabam prejudicados com consideráveis perdas na produção.

O patógeno *M. fijiensis*, organismo causador de Sigatoka Negra, provoca na bananeira amadurecimento precoce da fruta, lesões necróticas e decomposição foliar, além de perdas na produção de até 100% em variedades suscetíveis como Cavendish (*Musa* cv. AAA) e Prata (*Musa* cv. AAB) (CORDEIRO & MATOS, 2003). O primeiro relato da Sigatoka Negra no Brasil ocorreu no Amazonas em 1998, com o patógeno subsequentemente espalhando-se nos sete estados no norte do país. Posteriormente, o patógeno foi relatado em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, e agora ameaça a região nordeste.

1.2 Resistência e defesa em plantas

O reconhecimento do patógeno pode ocorrer através da resistência raça-específica, em que um ou poucos genes de resistência (R-genes) regulam o reconhecimento do patógeno com base na teoria gene-a-gene (FLOR, 1971; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996). Vários genes análogos de resistência (RGAs) foram caracterizados em *M. acuminata* e *M. balbisiana*, e incluem cultivares tanto com genoma A e quanto com genoma B. Estes RGAs dizem respeito principalmente às classes NBS-LRR (PEI et al., 2007; MILLER et al.; HESLOP-HARRISON & AZHAR, 2008) e Ser / Thr quinases citoplasmáticas sem LRRs (PERAZA-ECHEVERRIA et al., 2007). Essas proteínas quinases apresentam domínios Ser/Thr no meio intracelular, podendo ou não apresentar *Leucine Rich Repeat*, ou seja, repetições ricas de leucina (LRR) no meio extracelular (LIU et al., 2002). A função dos LLRs está intimamente

relacionada à recepção de estímulos externos. O gene Xa21 de arroz é um dos genes (R-genes) mais descritos para as quinases com LRRs extracelulares, e ele tem fundamental participação na resistência do arroz a todas as raças de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. No caso de Kinase sem LRRs extracelulares pode-se citar a proteína codificada pelo R-gene Pto em tomate. O Pto confere resistência às estirpes de *Pseudomonas syringae pv.* (MARTIN et al., 1993). A resistência mediada pelo Pto está associada a reações de hipersensibilidade (HR) e morte celular programada (PCD).

As interações planta-patógeno podem ser classificadas em compatíveis (patógeno virulento e hospedeiro suscetível) e incompatíveis (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). Nas interações incompatíveis, o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado, conduzindo à resistência, mas é tardiamente ativado ou não ativado em interações compatíveis, condicionando a doença. A presença de um gene de resistência dominante na planta (R) e um gene de avirulência dominante no patógeno (Avr) condicionam a incompatibilidade em interações gene-a-gene.

Nos sítios de infecção das plantas, após o reconhecimento do patógeno, posteriores vias de defesa contra diversos patógenos são ativadas. Essas respostas observadas no local da infecção incluem indução de uma explosão oxidativa e da resposta hipersensibilidade (HR), que provoca morte celular programada de células infectadas. Outros eventos adicionais acontecem concomitantemente, incluindo a produção de intermediários reativos de oxigênio, conhecidos como 'Reactive Oxygen Intermediates' (ROI) ou 'Reactive Oxygen Species' (ROS), ou ainda 'Espécies Ativas de Oxigênio' (EAO's), incluindo o O₂, H₂O₂ e OH. (HEGEDUS et al., 2001). A explosão oxidativa participa de um sistema integrado e amplificado de sinalização, que envolve o ácido salicílico e cálcio (Ca²⁺) citosólico no disparo dos mecanismos de defesa (DIXON, 1997). O desenvolvimento da HR, inicialmente desencadeado pela presença de espécies ativas de oxigênio, promove o estabelecimento gradual da resistência sistêmica adquirida (SAR) (ALVAREZ et al., 1998). Além disso, ocorre também a produção de óxido nítrico (NO), o acúmulo de fenóis, o reforço dos tecidos e da parede celular, a síntese de PR proteínas, o acúmulo dos fitormônios ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (JA), que agem como moléculas sinalizadoras, bem como a formação de proteínas antimicrobianas, tais como fitoalexinas (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). Tais eventos podem, posteriormente, desencadear uma generalizada resposta duradoura, chamada de resistência sistêmica adquirida (SAR) para resistência a diversos fitopatógenos longe do sítio de invasão (DONG; MÉTRAUX, 2001).

1.3 Melhoramento genético

A produção de Cavendish hoje está ameaçada e totalmente dependente do uso de pesticidas. Considerando que mais de 50 aplicações de fungicida podem ser necessárias para o controle da doença (GASPAROTTO et al., 2001), junto com os altos custos (com estimativas de uso de agrotóxicos representando até 27% do custo de produção) (STOVER & SIMMONDS, 1987), a produção de variedades suscetíveis pode se tornar inviável. Adicionalmente, a dependência de fungicidas hoje mostra a importância de implementação de estratégias integradas para evitar a seleção de isolados do patógeno resistentes a fungicidas.

Uma das estratégias para a solução dos problemas mencionados é a criação de novas variedades com resistência a doenças e a pragas e mais tolerantes às adversidades. Isto se dá mediante o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, baseados em técnicas convencionais ou biotecnológicas, que possibilitam a obtenção de genótipos superiores. Vale ressaltar que o uso de variedades resistentes é uma das alternativas mais efetivas para o controle de doenças; uma vez que não depende da ação do produtor durante a fase de crescimento das plantas, não é prejudicial ao meio ambiente e, geralmente, é compatível com outras técnicas de manejo (SOUZA Jr., 2004).

O melhoramento genético das culturas de banana é prejudicado pela ocorrência de triploidia nos cultivares comerciais (CROUCH, 1999). Muitos avanços têm sido obtidos, o que vem possibilitando uma maior compreensão da base genética das características de importância agrícola em banana (ORTIZ, 1995). Porém, para que se consiga maiores avanços no melhoramento dessa cultura, será necessário obter progressos semelhantes na compreensão da estrutura genômica e das relações genéticas existentes entre os acessos depositados nos bancos de germoplasma (CROUCH et al., 1999). A pesquisa em biologia molecular tem possibilitado um maior entendimento do genoma de uma planta quando esta é submetida a diferentes cenários, tais como: infecção por patógeno, estresses abióticos, florescimento, frutificação, etc.

A maioria dos cultivares comerciais de bananas são estéreis com genoma A e B, contendo diplóides ou triplóides, com desenvolvimento tanto de frutas sem sementes quanto de frutos com sementes não viáveis, ocorrendo através de partenocarpia. A evolução

conduzida assexuadamente via micropropagação vegetativa resultou numa base genética estreita, com a falta de culturas com resistência a pragas e a doenças. Por isso, há um grande número de pragas assolando as culturas de banana.

O melhoramento genético da banana em comparação com outras grandes culturas alimentares tem sido limitado. A pouca variação genética da banana tem gerado uma cultura com pouca resistência a pragas e a doenças, por isso cultivares suscetíveis como Gros Michel e Grande Naine estão particularmente em risco. A deficiência de reprodutores convencionais em bananas diplóides e triplóides é resultado de um baixo número ou ausência total de sementes, causado por uma falta de pólen viável ou ineficientes polinizações por insetos. Como consequência, cultivares Cavendish não produzem sementes quando polinizadas por resistentes diplóides. O desenvolvimento de cultivares tetraplóides pode ser usado como um método para incorporar novas características em suscetíveis triplóides, através da fertilização entre pólen de machos haplóides com um gameta feminino triplóide, fazendo com que o pólen contribua com 25% para o novo genótipo (SILVA et al., 2002). A reprodução da banana baseia-se no desenvolvimento de híbridos tetraplóides selecionados a partir de cruzamentos entre alguns cultivares triplóides semi-férteis e selvagens ou diplóides melhorados, sendo esta a fonte da resistência a fatores bióticos e abióticos (CRESTE et al., 2006). Estratégias alternativas para reprodutores de *Musa*, portanto, têm sido adotadas, incluindo mutação, hibridação somática e duplicação nos cromossomos diplóides (GANRY, 1993).

As atuais abordagens na genômica de *Musa* nos levam a crer na melhoria da sua produção. Variedades vegetais e seus criadores enfrentam desafios semelhantes em todas as espécies: a necessidade de maior qualidade e produtividade, em face da evolução das pressões bióticas e abióticas. Em *Musa*, os desafios são identificar e caracterizar os genes e a diversidade genética, e em seguida, utilizar essa variação em uma grande parte das culturas estéreis propagadas por cultura de tecidos. Os cultivares selvagens diplóides de *M. acuminata* Calcutta 4 têm sido amplamente utilizados em programas de melhoramento, o que representa uma importante fonte de resistências a nematóides e fungos patogênicos. Ademais, são utilizados, também, como um modelo para a genômica comparativa (CHEUNG & TOWN, 2007; LESCOT et al., 2008), genômica funcional (por exemplo, SANTOS et al., 2005) e candidatos para descoberta de resistência genética (por exemplo, MILLER et al., 2008). Recursos genômicos, como bibliotecas BAC (VILARINHOS et al., 2003), estão disponíveis

para este cultivar, por meio do Global Musa Genomics Consortium (GMGC) (www.musagenomics.org).

A biotecnologia e a engenharia genética, em conjunto com os métodos convencionais, podem ajudar a superar os problemas no desenvolvimento de novos cultivares de banana (HESLOP & SCHWARZACHER, 2007).

1.4 Utilização de marcadores moleculares

O desenvolvimento e a aplicação de tecnologias baseadas no uso de marcadores moleculares fornecem ferramentas únicas, capazes de revelar polimorfismos ao nível de sequências de DNA, suficientes para discriminar a variação genética existente entre indivíduos e dentro de populações. Dentre os marcadores existentes utilizados para a identificação e a caracterização de genótipos, destacam-se aqueles baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Marcadores SSR são úteis para uma variedade de aplicações em genética e melhoramento de plantas devido à sua reprodutibilidade, natureza multialélica, herança codominante, abundância relativa e boa cobertura do genoma (POWELL et al., 1996). Eles consistem de trechos de DNA de unidades mono-, di-, tri-, tetra- ou penta-nucleotídica repetidas ao acaso, dispersas por todo o genoma (HAMADA et al., 1982)

Esses marcadores moleculares geram alto conteúdo informacional e confiabilidade em seus dados, possibilitando a análise da diversidade genética, do fluxo gênico, da paternidade e da estrutura genética de populações. Os marcadores microssatélites podem ser utilizados no auxílio à caracterização de cultivares triplóides e tetraplóides (CRESTE et al., 2003).

Todos os tipos de marcadores moleculares possuem vantagens e desvantagens em aplicações específicas. É importante para programas de melhoramento molecular desenvolver capacidades em vários ensaios, de modo que o sistema mais adequado possa ser escolhido e

aplicado rapidamente para qualquer aplicativo específico. Além disso, diferentes marcadores moleculares podem detectar diferentes tipos de variação genética (CROUCH et al., 1998).

Os marcadores microssatélites são considerados ideais para a identificação e caracterização de locos que controlam alguma característica de interesse. Além disso, são muito utilizados para a construção de mapas genéticos (DEVEY et al., 1996) e na seleção assistida por marcadores (CROUCH et al., 1998).

Vários marcadores moleculares estão sendo desenvolvidos em *Musa*. Sua utilidade já foi demonstrada para preparação de mapas genéticos, diagnóstico de doenças, seleção assistida por marcadores (MAS), genotipagem, identificação de variação genética e conservação de germoplasma (GUPTA & VARSHNEY, 2000). Para que isso ocorra com sucesso em *Musa*, as técnicas de biotecnologia devem estar integradas com outras abordagens disponíveis nos atuais programas de melhoramento de *Musa* (CROUCH et al., 1998).

Portanto, marcadores microssatélites são um instrumento valioso para a genética de plantas e reprodutores. Claramente, a mais significativa aplicação dos EST-SSRs é para o mapeamento comparativo, com bons exemplos em espécies gramíneas e leguminosas. A longo prazo, o desenvolvimento de marcadores alelo-específicos para genes que controlam características agrônômicas será importante para o avanço no melhoramento de plantas (VARSHNEY, 2005).

1.5 Genômica

Vários trabalhos em *Musa* têm buscado o melhoramento da produtividade dessa cultura com foco na busca de mecanismos de resistência a patógenos que afetam sua produção. Para isso, várias estratégias diferentes são traçadas, todas elas objetivando a busca de genes de resistência, contribuindo, assim, para que se consiga, o mais breve possível, gerar genótipos resistentes.

Nos últimos anos, inúmeros projetos de sequenciamento de genoma surgiram, independentemente do tamanho do genoma. Além disso, é comum também nos depararmos com a descoberta de novos genes através de banco de dados de ESTs. A análise de praticamente todos os genes tornou-se possível com esse avanço da genômica, embora algumas técnicas laboratoriais sejam ainda de difícil acesso devido à complexidade técnica e ao alto custo financeiro. Os grandes avanços conquistados nos últimos anos se devem a otimizações em metodologias específicas que possibilitam a quantificação da expressão gênica. Dentre elas pode-se citar macro e microarranjos, além de uma tecnologia chamada SAGE (VELCULESCU et al., 1995). A análise serial da expressão gênica (SAGE) baseia-se na contagem em alta escala de regiões específicas (*tags*) constituídas por 9-10 bases, obtidas de uma população de transcritos. Essa técnica vem sendo empregada agora em espécies vegetais com o objetivo de identificar genes expressos diferencialmente. Técnicas como o Northern blot e o RT-PCR podem ser utilizadas para validar experimentalmente as variações de expressão gênica detectadas via SAGE. De forma complementar às outras técnicas para análise transcricional em escala genômica, a SAGE tem grandes contribuições a dar nas etapas iniciais do complexo panorama da genômica funcional.

Em relação aos estudos de genômica em *Musa*, vários avanços têm sido alcançados. Estudos da citogenética molecular, identificação de marcadores moleculares, construção de mapas físico e genético, elucidação sobre os genes e sua expressão, bancos de dados de ESTs, análise de BACs e RGAs vêm contribuindo para o entendimento do genoma da banana.

A citogenética molecular tem contribuído significativamente para a compreensão do conteúdo do DNA e dos níveis de ploidia existentes nas espécies de *Musa*. Ela continuará sendo o método utilizado para estudar a estrutura do cromossomo e suas alterações e contribuirá para o sequenciamento do genoma da banana (KAHL, 2004).

Marcadores moleculares têm sido encontrados em *Musa*, sendo a maioria deles baseada em PCR. Os marcadores SSR vêm mostrando ser muito promissores. Por meio destes, pode-se estabelecer mapas genéticos, bem como possibilitar uma seleção assistida por marcadores. Com isso, é possível gerar uma resistência a patógenos e, conseqüentemente, aumentar a produtividade da cultura da bananeira. Por outro lado, SNPs têm de ser acrescentados a esse repertório de marcadores, especialmente quando aparecem em regiões codificantes, pois assim pode-se esperar que eles tenham um impacto sobre a função das proteínas.

O mapeamento tem como objetivo identificar marcadores moleculares genética (mapas genéticos) ou fisicamente (mapas físicos) ligados a genes que contribuem para a manifestação de uma característica em particular ou continuamente variável de caracteres (por exemplo, um QTL). Dessa forma, os marcadores podem ser explorados para isolar um gene de interesse. Esses genes isolados podem ser utilizados para melhorar genótipos selecionados. O mapeamento genético de *Musa* não está muito avançado, mas já existem vários grupos com projetos de mapeamento do genoma da banana. Além disso, várias bibliotecas de BACs já foram construídas. Isso possibilitará o mapeamento físico do genoma da banana. O mapeamento físico visa definir a localização de um determinado gene. Pode-se, também, determinar distâncias genéticas (cM) entre dois (ou mais) marcadores para distâncias físicas (kb). Assim, é possível alinhar regiões de dois ou mais genomas. A partir disso, torna-se possível identificar um gene-alvo e isolá-lo. Portanto, é necessário acelerar o mapeamento físico de *Musa*, que é o caminho para que se consiga isolar genes de interesse, principalmente agrônômicos (KAHL, 2004). Através do uso de marcadores, aliado à evolução tecnológica da biologia molecular, inúmeros mapas genéticos de diversas culturas têm sido construídos, dentre eles o do café (PEARL et al., 2004), o do milho (BRUNELLI et al., 2002) e o da cevada (HORI et al., 2003).

Como descrito em Miller et al. (2008), RGAs (Resistance Gene Analogs) também foram inclusos no mapa genético de *Musa* que está em desenvolvimento, assim como os marcadores SSR. Tal projeto de mapeamento poderá servir como base para o desenvolvimento de vários outros marcadores que podem ser utilizados em futuros projetos de mapeamento em banana. Assim, marcadores RFLP-RGA podem contribuir para o melhoramento genético da banana sendo aplicados na seleção assistida por marcadores para definir características, como a resistência a patógenos.

Expressed Sequence Tags (ESTs) são porções que representam parte das regiões transcritas do genoma em determinadas condições. Em *Musa*, uma série de estudos tem relatado expressão gênica durante a interação patógeno-hospedeiro (por exemplo, VAN DEN BERG et al., 2002; LIM et al., 2004). Atualmente, porém, um total de apenas 14.523 ESTs em *M. acuminata* e 5.289 em *M. balbisiana* estão publicamente disponíveis no GenBank. A análise de bibliotecas de cDNA através do sequenciamento dos ESTs correspondentes (*Expressed Sequence Tags*) é uma ótima ferramenta utilizada para selecionar apenas os genes que estão sendo expressos em determinado organismo ou em determinada condição fisiológica. Esse método permite a identificação de genes de interesse (como genes

envolvidos na resistência no caso de interação planta-patógeno) e tem sido usado como uma importante abordagem experimental para elucidar não somente a função gênica, mas também para compreender como os mecanismos moleculares estão relacionados com processos biológicos (VEDOY et al., 1999). ESTs podem também ser utilizados como fontes de polimorfismo, sendo que este será de fato procurado em regiões codantes e expressas, aumentando o número de genes candidatos para estudo de QTL's (HATEY et al., 1998).

Vários ESTs, importantes para a análise da expressão genética, foram publicados (SANTOS et al., 2005) e muitas dezenas de milhares estão cada vez mais disponíveis. Comparações entre bibliotecas ESTs serão muito valiosas para a identificação de genes que são diferencialmente expressos sob condições de estresse (SANTOS et al., 2005). O SuperSAGE é uma alternativa que também se mostra muito útil para a identificação de genes expressos diferencialmente sob estresse biótico e abiótico (COEMANS et al., 2005). Outra possibilidade é a utilização do DDD (*Digital Differential Display*), que é uma ferramenta para comparação de perfis de expressão de ESTs entre diferentes bibliotecas ou grupos de bibliotecas. Essas comparações permitem a identificação dos genes que diferem entre bibliotecas de diferentes tecidos, o que torna possível determinar quais genes podem estar contribuindo para uma célula de característica única, como, por exemplo, aqueles que fazem uma célula muscular diferente de uma célula da pele ou do fígado. Na mesma linha, o DDD permite indicar quais genes possuem uma expressão diferencial após uma interação planta-patógeno. O DDD utiliza o teste Exato de Fisher, além dos testes de Stekel (STEKEL et al., 2000) e Audic-Claverie (CLAVERIE, 1999), para restringir a produção de diferenças estatisticamente significativas. Se não houver um grande número de sequências em cada agrupamento, as frequências dos genes não são, geralmente, consideradas como estatisticamente significativas.

Os bancos de dados de ESTs também podem representar uma fonte para o descobrimento de novos marcadores moleculares (BRONDANI et al., 1998). O sequenciamento completo do genoma da banana também é uma alternativa que pode vir a gerar uma enorme quantidade de dados que poderá revelar aspectos até então desconhecidos do genoma.

Outra ferramenta que vem sendo utilizada na genômica é o PCR quantitativo (q-PCR), que é um procedimento no qual o número absoluto de cópias da molécula do RNA-alvo é determinado, requerendo medidas precisas de uma curva de calibração externa para o gene.

Ele determina a expressão de um gene-alvo em relação a um gene expresso de maneira constitutiva (BURLEIGH, 2001). A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real, ou *real-time* RT-PCR, consiste em uma técnica de alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e ampla faixa de detecção e quantificação de mRNA. Heid et al. (1996) modificaram o método utilizando não o brometo de etídio, mas sim uma sonda duplamente marcada com fluoróforos capaz de se ligar especificamente ao DNA recém-sintetizado, método conhecido como *TaqMan*. Posteriormente, introduziu-se a utilização do *SYBR Green I*, um novo corante com maior seletividade pela ligação a duplas fitas de DNA (MORRISON et al., 1998), constituindo-se numa alternativa ao *TaqMan*, mais simples e genérica. Nessa reação em cadeia da polimerase em tempo real, a quantificação da expressão do gene-alvo é medida tomando-se, como referência, um gene endógeno, o qual deve ser expresso em quantidades equivalentes ao longo de todo o período de amostragem experimental. O uso de um gene conhecido como constitutivo procura minimizar as diferenças nas quantidades de RNA utilizadas na transcrição reversa, as quais podem variar por influência do tratamento experimental ou por diferentes eficiências de extração, bem como as variações que possam ocorrer durante cada reação e em cada tubo de reação (SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000). Genes constitutivos (*Housekeeping genes*) são genes expressos continuamente sob todas as circunstâncias por uma célula ou organismo, independentemente de influências do ambiente. Eles expressam componentes essenciais em quase todas as células, como proteínas ribossomais, tRNA, rRNA e componentes da RNA polimerase. Um grupo restrito de genes constitutivos vem sendo utilizado para normalização da expressão de outros genes. Esse grupo inclui os genes da β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), tubulina, ciclofilina, ubiquitina e o RNA ribossomal 18S. Todavia, nada garante que o tratamento experimental não vá afetar a expressão de um potencial gene constitutivo, sendo necessário que se faça um estudo individual para cada candidato a controle interno ao longo do modelo experimental (BUSTIN, 2000; 2002).

O sequenciamento de DNA é uma ferramenta extremamente importante quando se trata de genômica. Trata-se de uma série de métodos bioquímicos que tem como finalidade determinar a ordem das bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) da molécula de DNA. O método tradicional de sequenciamento de DNA foi proposto por Frederick Sanger na década de 70 e consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxirribonucleotídeos, que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela DNA polimerase após sua adição. Esse método ainda tem sido largamente

utilizado por vários centros de pesquisa. Embora o sequenciamento do genoma tornou-se progressivamente mais eficiente ao longo da última década, o sequenciamento de genomas complexos continua caro. O sequenciamento de *Expressed Sequence Tags* (EST) determina uma alternativa atraente para o sequenciamento de um genoma completo. Mesmo assim, como os genes são diferencialmente expressos, múltiplos tecidos devem ser amostrados, e, quando se utiliza o método tradicional (Sanger), estes projetos exigem investimentos na construção e no sequenciamento de bibliotecas de ESTs. Recentemente, o 454 *Life Sciences* desenvolveu um sistema de sequenciamento de DNA que é 100 vezes mais rápido do que os métodos normais de sequenciamento capazes de sequenciar mais de 200.000 fragmentos em 4 horas de corrida. (MARGULIES et al. 2005). O 454 utiliza o método de pirosequenciamento que consiste em uma nova abordagem molecular do sequenciamento e se beneficia de uma técnica capaz de captar a emissão de luz causada pela adição de uma luciferase, acoplada à polimerização do DNA previamente fragmentado e aderido a microesferas, com o uso de sequências adaptadoras. Em média, o 454 lê, aproximadamente, 100 pb de comprimento. Assim, a montagem de sequências de amostras que contêm grandes quantidades de DNA repetitivo, como genomas eucarióticos, podem apresentar problemas com programas de montagem convencionais. Em contrapartida, essa limitação do comprimento da leitura é menos preocupante para o sequenciamento e análise do transcriptoma. Isso porque os transcritos são menores e normalmente contêm menos sequências repetitivas de DNA (EMRICH et al., 2009). WICKER et al. (2006) demonstraram que o pirosequenciamento via 454 permite um sequenciamento rápido, resultando em grandes porções de um genoma complexo. Vários estudos utilizando essa nova tecnologia têm sido descritos, envolvendo sequenciamento de ESTs para caracterização e análise do transcriptoma (CHEUNG et al., 2006; VERA et al.; CHEUNG et al., 2008; EMRICH et al., 2009). Além disso, o 454 foi utilizado na genômica comparativa de ervilha com os genomas da soja e da espécie *Mendicago trunculata* (MACAS et al., 2007) e na descoberta de SNPs em *Eucalyptus grandis* (NOVAES et al., 2008).

Outra técnica promissora é a tecnologia Solexa/Illumina (BENNETT, 2004). O método lê cada base em um homopolímero correndo em uma etapa separada e, por consequência, não produz tantos “indels” como o 454 (HUTCHISON, 2007). Devido a elevada densidade de *clusters* que podem ser analisados, a máquina pode produzir 1 bilhão bases (1 Gb) de 30-40 bases cada em uma única corrida. O processamento e a análise estatística dos dados gerados resultam em novos desafios: atualmente um percentual dos *tags*

são rotineiramente descartados devido a uma incapacidade para corresponder-lhes uma sequência de referência, reduzindo, assim, a efetiva capacidade da tecnologia (ROUGEMONT et al., 2008). Uma das mais recentes tecnologias de sequenciamento é a Applied Biosystems SOLID. Essa plataforma gera mais dados de sequências do que as anteriormente descritas (ONDOV et al., 2008). Seis ou mais Gb por corrida, com 25-35 bases cada *read*. Um dos desafios dessas ferramentas é que o alinhamento feito pelo SOLID, como qualquer outro feito a partir dessas novas tecnologias com sistema de leitura de curtas sequências, tem uma taxa de erro que é significativamente superior à do sequenciamento tradicional realizado pelo método Sanger. Mesmo com alguns desafios a serem superados por essas novas tecnologias, a sua aplicação está cada vez mais comum em trabalhos com ressequenciamento de genomas, metagenômica, análise de transcritos, sequenciamento de DNA, descoberta de marcadores e genômica comparativa, parecendo ser, esta, uma nova tendência quando se trata de sequenciamento.

Até o momento nenhuma análise de larga escala da sequência de *Musa* foi realizada. Lescot et al. (2008) comparam a sequência genômica de duas espécies de *Musa* com regiões ortólogas do genoma do arroz a partir de 13 clones de BACs de sequências de *Musa*, juntamente com 4 BACs previamente sequenciados. Os resultados apontam para a utilidade de análises comparativas entre espécies de monocotiledôneas, tais como o arroz e a banana, para melhorar nossa compreensão a respeito da evolução do genoma dessas espécies. Com isso, seria necessário o sequenciamento do genoma de *M. acuminata*, o que proporcionaria uma base forte para a genômica comparativa. Além disso, contribuiria na investigação que visa à localização e à clonagem dos genes que controlam características agrônômicas importantes.

1.6 Modelagem de proteínas

1.6.1 Modelagem molecular por homologia estrutural

O mecanismo evolutivo da duplicação gênica, que está associado a mutações, leva a certas divergências ao longo do tempo e, conseqüentemente, à formação de famílias de proteínas correlacionadas, que apresentam algumas diferenças com relação às suas seqüências de aminoácidos, mas conservam alto grau de similaridade estrutural. As proteínas que evoluem a partir de um ancestral comum são conhecidas como homólogas. Duas seqüências homólogas podem ser praticamente idênticas, similares em vários aspectos ou até muito diferentes devido a várias mutações. Outro ponto importante é a similaridade sequencial que é, normalmente, menos preservada que a similaridade estrutural (HÖLTJE, et al., 2003). As estruturas tridimensionais de proteínas homólogas são conservadas durante o processo de evolução, principalmente os resíduos funcionais, pois a conservação da estrutura é imprescindível para a manutenção e o desempenho das funções específicas. As maiores divergências entre proteínas homólogas ocorrem com mais frequência em regiões próximas da superfície, ou seja, nos *loops*, sem estrutura secundária definida. Nessas regiões, até mesmo as propriedades físico-químicas dos resíduos que sofreram mutações são muito diferentes dos resíduos anteriores ao processo de mutação. Em geral, os resíduos localizados no interior das proteínas variam com menor frequência e, quando o fazem, ocorrem, normalmente, com menor distinção de propriedades físico-químicas. Habitualmente, certo conjunto de resíduos de aminoácidos que compreendem o núcleo da proteína e os principais elementos de estrutura secundária permanece mais conservado dentro de uma família de proteínas homólogas (HÖLTJE et al., 2003).

A execução da estratégia de modelagem por homologia é um processo bem documentado na literatura. A estratégia baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua seqüência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na seqüência, em geral, resultam em, apenas, sutis modificações na estrutura tridimensional (NAYEEM et al., 2006). Se pelo menos uma seqüência homóloga para a qual a estrutura tridimensional resolvida esteja disponível é encontrada, o método de escolha para predição da estrutura tridimensional de uma proteína-

alvo é a própria modelagem comparativa ou por homologia (HÖLTJE et al., 2003). Geralmente, o processo de obtenção de um modelo protéico virtual através da execução da estratégia da modelagem molecular por homologia estrutural envolve quatro etapas principais (Figura 1), a saber: busca de proteínas homólogas, alinhamento das sequências, construção e otimização dos modelos e validação dos mesmos (HILLISCH et al., 2004). A etapa de busca de proteínas homólogas tem como objetivo promover a identificação de proteínas com estruturas tridimensionais resolvidas que se correlacionam com a proteína-alvo e que possam funcionar como molde (proteínas-molde) para a modelagem dessa proteína com estrutura tridimensional desconhecida (HILLISCH et al., 2004).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Identificação e caracterização de componentes genéticos de resistência e defesa ao patógeno *M. fijiensis* em *Musa* spp.

Objetivos específicos

- Sequenciamento em larga escala de clones de duas bibliotecas de cDNA de folhas de bananeira infectadas *in vitro* com o patógeno *M. fijiensis*: 1- MA4LIMFES, representando uma fase inicial do processo de infecção, utilizando a variedade resistente *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* var. Calcutta 4; e 2 - MACVLIMFLS, representando uma fase avançada da infecção, utilizando o cultivar suscetível Grand Naine (Cavendish group).
- Análise de bioinformática de sequências de ESTs de duas bibliotecas de cDNA de folhas de bananeira infectadas *in vitro* com o patógeno *M. fijiensis*: 1- MA4LIMFES e 2 - MACVLIMFLS
- Descoberta de genes via identificação de sequências homólogas em bancos de dados de nucleotídeos e proteínas.
- Identificação de um conjunto de unigenes.

- Anotação e análise *in silico* da expressão diferencial de genes gerados a partir das bibliotecas de cDNA *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* var. Calcutta (resistente) e *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* var. Cavendish Grande Naine (susceptível) de folhas infectadas *in vitro* com *M. fijiensis*.
- Análise da expressão diferencial de genes na interação *Musa* x *M. fijiensis*.
- Identificação de marcadores gênicos do tipo SSR de *Musa* para uso em mapeamento genético a serem utilizados em programas de melhoramento de *Musa*
- Caracterização e validação de marcadores microssatélites polimórficos derivados de sequências de ESTs e BACs de *M. acuminata*.
- Análise estrutural de proteínas diferencialmente expressas por meio da modelagem molecular por homologia estrutural.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Sequenciamento do cDNA de *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine

Duas bibliotecas de cDNA foram previamente construídas a partir de folhas de duas variedades de *M. acuminata* spp. *burmannicoides* infectados *in vitro* com *M. fijiensis*, agente causador da Sigatoka Negra. Este trabalho foi realizado no CIRAD pelos pesquisadores Pietro Piffanelli e Ana Yamaguishi Ciampi. A biblioteca de Calcutta 4 (MA4_LEAVES_INF_MF_ES), uma variedade resistente da banana, foi construída usando um RNA extraído durante as primeiras fases do processo da infecção, enquanto a biblioteca de Cavendish Grande Naine (MACV_LEAVES_INF_MF_LS), cultivar suscetível, foi construída a partir do RNA extraído durante os estágios avançados da infecção. Ambas as bibliotecas de ESTs foram preparadas usando o Clontech Creator SMART cDNA library Construction kit (kit para a construção de bibliotecas de cDNA). Os cDNAs com alta qualidade foram sintetizados via PCR. Depois disso, esses cDNAs com alta qualidade foram eluídos do gel de agarose, digeridos com a enzima de restrição Sfl e ligados no vetor pDRN-LIB. Após uma eletroporação, os transformantes foram reproduzidos em meios sólidos. Através da extração do DNA plasmidial (miniprep), os tamanhos dos insertos foram estimados através de amplificação por PCR dos insertos de DNA. Um total de 27.648 clones foram produzidos e conservados em cultura com glicerol. Foi realizado, então, o sequenciamento de 15.456 clones selecionados aleatoriamente utilizando o *primer* M13 (forward) (5'- TGTAACGACGGCCAGT - 3'). Esse sequenciamento foi conduzido em sequenciadores automáticos (ABI 377) da plataforma de sequenciamento da Universidade Católica de Brasília (UCB), utilizando o *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing chemistry* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Todos os cromatogramas foram submetidos ao sistema de análise de Genoma SisGen (PAPPAS JR, et al., 2008) (<http://www.genoma.embrapa.br>) para complementar os bancos de dados de ESTs já existentes gerados em outros projetos de pesquisa.

2.2 Análise bioinformática de sequências de ESTs

2.2.1 Processamento de sequências

Dados brutos oriundos do sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) foram processados computacionalmente com o objetivo de nomeação e verificação da qualidade das bases utilizando o programa PHPH (TOGAWA, 2003); remoção de vetor, adaptador e cauda poli-A usando o programa Lucy (CHOU & HOLMES, 2001); o mascaramento do vetor foi realizado pelo programa *Cross match* (B. EWING, *unpublished*); e, finalmente, a montagem com o programa *tgicl* (PERTEA et al., 2003). Consensos de sequências resultantes desse processamento foram submetidos à análise de similaridade usando o programa BlastX versão 2.2.10 (ALTSCHUL et al., 1997) contra diferentes bancos de dados (GenBank, SwissProt, MIPS-Arabidopsis, NCBI [dados de sequências não redundantes], MIPS-Arabidopsis, Gene Ontology (GO), KOG [Grupos ortólogos de eucarióticos, com proteínas ortólogas de 7 genomas eucarióticos] e KEGG), para a definição de um conjunto de unigenes. Uma pontuação superior a 60 bits e um comprimento mínimo do alinhamento de, no mínimo, 70 aminoácidos foram definidos como o limite a considerar um *hit* do BLAST *hit* significativo. Todas as etapas de pré-processamento até a anotação final foram executadas, analisadas e consolidadas automaticamente por programas escritos em linguagem Java.

2.2.2 Identificação de um *Unigene Set*

Após o seqüenciamento, realizado na plataforma da UCB, de clones das bibliotecas infectadas MA4_LEAVES_INF_MF_ES e MACV_LEAVES_INF_MF_LS, todos os

cromatogramas foram submetidos ao sistema de análise de Genoma SisGen para complementar os bancos de dados de ESTs já existentes gerados em outros projetos de pesquisa. Após submetidas, as bibliotecas foram analisadas para identificação de um *Unigene Set*. Foram examinados os dados referentes ao número de placas sequenciadas, número de clones aceitos, porcentagem de clones aceitos, número de *contigs*, número de *singletons*, porcentagem de novidade e porcentagem de sequências redundantes. Esse procedimento foi feito para cada biblioteca de forma separada.

2.2.3 Identificação *in silico* de genes diferencialmente expressos

A expressão diferencial em *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish foi identificada via análise *in silico* de níveis de expressão, usando o sistema de análise *Digital Differential Display* (AUDIC & CLAVERIE, 1997) disponível no programa SisGen (PAPPAS JR, et al., 2008) (<http://www.genoma.embrapa.br>). Três testes estatísticos foram empregados para determinar a significância das diferenças nas contagens das duas bibliotecas. São eles, Stekel (STEKEL, et al., 2000), teste exato de Fisher e teste Audic-Claverie (CLAVERIE, 1999). Estes testes fornecem valores de p para a hipótese nula que não há expressão diferencial, e, nesse estudo, um valor menor que 0,001 era indicativo de expressão diferencial.

2.2.4 Identificação de marcadores gênicos do tipo SSR em *Musa* para utilização em mapeamento genético

Uma pesquisa computacional para localizar *simple sequence repeats* (SSRs) foi realizada em bancos de ESTs usando o programa mreps (<http://bioinfo.lifl.fr/mreps/>). Essa

identificação de SSR's também foi obtida a partir de dados genômicos (clones de BAC sequenciados de bibliotecas BACs de *M. acuminata* Calcutta 4) (VILARINHOS et al., 2003; LESCOT et al., 2008) A detecção dos microssatélites foi realizada exigindo-se a presença de, pelo menos, duas unidades de repetição (por exemplo, GC) com mais de 10 bases. Foram desenhados *primers* a partir de 2 bibliotecas de cDNA originadas de *M. acuminata spp. burmannicoides* Calcutta 4 (cultivar resistente) e Cavendish Grande Naine (cultivar susceptível), infectadas *in vitro* com *M. fijiensis* flanqueando os SSR's utilizando o programa *PRIMER3* (ROZEN & SKALETSKY 2000). Além desses, também foram desenhados *primers* flanqueando os microssatélites originados das sequências das bibliotecas BAC.

2.3 Modelagem protéica por homologia estrutural

Após a submissão das sequências para análise de similaridade usando o programa BlastX (ALTSCHUL et al., 1997) contra diferentes bancos de dados (GenBank, SwissProt, MIPS-Arabidopsis e KOG), um total de 12 (doze) sequências expressas diferencialmente não apresentaram homologia com outro gene. Essas sequências são denominadas *No hits* e foram escolhidas para análise molecular computacional de estrutura e função As sequências nucleotídicas desses *No hits* foram traduzidas em sequências protéicas (moldes) e depois submetidas ao servidor BioInfoBank Metaserver (GINALSKI et al., 2003) visando obter um modelo de coordenada atômica ideal para predição da estrutura terciária de cada proteína. Esse servidor alinha a sequência molde com outras sequências, fazendo um dobramento prévio e comparando a estrutura secundária das proteínas comparadas. Depois de submetidas, analisou-se os *scores* resultantes para cada sequência. Os *scores* ideais são equivalentes a 40% de similaridade: FFAS03 (ffas *score* < -20.0) ou 3D-Jury (3djury *score* > 25.0). Entretanto, até 30% de similaridade foi aceitável. Abaixo disso, o modelo precisaria ser muito bem refinado e, se possível, depender de mais de um *template* para modelagem. Dos doze *No hits*, foram escolhidos quatro, que foram chamados de seq_marco_5 (referente à sequência do CL16Contig7), seq_marco_7 (referente à sequência do CL88Contig1), seq_marco_11 (referente à sequência do CL5Contig2) e seq_marco_12

(referente à sequência do CL16Contig4). Os modelos com melhor identidade obtida através dos algoritmos FFAS03 e/ou 3D-Jury foram selecionados, bem como seus alinhamentos. Os arquivos PDB utilizados como *template* podem ser vistos na Tabela 9. A partir do alinhamento da sequência a ser modelada com a de estruturas conhecidas, modelos contendo todos os átomos não-hidrogênios foram automaticamente calculados utilizando o programa Modeller 9v5 (SALI et al., 1993). A modelagem dos loops na estrutura protéica, bem como a otimização dos modelos, foi realizada com o auxílio dos programas Modeller 9v5 e Swiss-PdbViewer 4.01 (GUEX & PEITSCH, 1997), utilizando-se protocolos de minimização de energia. A validação dos modelos foi realizada pelo VADAR web server, versão 1.6 (<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar/>) (WILLARD, 2003). Para a visualização e sobreposição dos modelos, utilizou-se o programa Pymol (DELANO, 2002). Todos os modelos sofreram entre 10-100.000 etapas de minimização descendente de acordo com suas deficiências apontadas pelo VADAR, recebendo nova análise a cada nova série de minimização.

2.4 Validação da expressão diferencial via qRT-PCR

2.4.1 Desenho de *primers* q-PCR para validação dos genes diferencialmente expressos *in silico*

Após a análise *in silico* dos níveis de expressão em *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish, usando o sistema de análise ‘Digital Differential Display’ disponível no programa Sistema Genoma da UCB, foi realizado o desenho de *primers* para a validação de genes expressos diferencialmente *in silico* via *PCR quantitativo* em tempo real (real-time *qPCR*), analisando-se a expressão diferencial dos unigenes com a utilização do o cDNA extraído dos dois cultivares infectados com *M. fijiensis*.

Foram selecionados genes potencialmente envolvidos em resistência e que foram diferencialmente expressos e estatisticamente significantes em, pelo menos, um dos testes estatísticos realizados. São eles: teste exato de Fisher, de Stekel e Audic-Claverie. A ORF de cada sequência de interesse foi identificada utilizando-se o software ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). A partir disso, foi desenhado *primers* para essas ORFs com o uso do programa PRIMER3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). As condições adotadas podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições gerais adotadas para o desenho dos *primers*.

	Mínimo	Ótimo	Máximo
Tamanho do Produto (pb)	150		200
Tamanho do <i>Primers</i>	19	20	22
Temperatura de Anelamento	59	60	61
%GC	40	45	55

Além desses parâmetros, foi selecionada uma opção especial denominada *qPCR option*. Para estudo da expressão relativa dos genes diferencialmente expressos nas folhas infectadas de Calcutta 4 e Cavendish, foram escolhidos, para normalização, os genes da β -actina de banana (número de acesso AF246288) e o gene da Ubiquitina.

2.4.2 Otimização da extração do RNA total para validação da expressão gênica via qRT-PCR

A extração do RNA total de tecidos não infectados de *M. acuminata* Cavendish e *M. acuminata* Calcutta 4 foi conduzida para a análise do transcriptoma por pirosequenciamento e para o seu uso subsequente na validação da expressão gênica via qRT-PCR. Cultivares de *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine [*Musa* Germplasm Information System (MGIS), número de acesso ITC0249 e ITC0180, respectivamente]

(DANIELS et al., 2001) foram propagadas *in vitro* e mantidas em casa de vegetação a 30□ C. O material jovem de folhas e raízes foram coletadas com 2 meses de idade e rapidamente maceradas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA. A extração foi realizada utilizando-se os métodos do Trizol (Invitrogen), do CTAB e pelos Kits Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen) e RNeasy minikit (Qiagen). A análise da qualidade e a quantificação do RNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% *RNase free* (Figura 2).

2.5 Validação de marcadores microsatélites derivados de sequências de ESTs e BACs de *M. acuminata*

2.5.1 Otimização dos *primers* SSR originados de sequências ESTs e BACs

Reações em cadeia da polimerase – PCR (*Polymerase Chain Reaction*), feitas em termocicladores MJ (*PTC-100TM Programmable Thermal Controller*), foram utilizadas para a otimização de todos os *primers* SSR gerados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) e BACs (Bacterial Artificial Chromosome) que flanqueiam os SSRs, buscando melhores temperaturas de anelamento para amplificação de fragmentos esperados de acordo com os programas de desenho de *primers*. Foram utilizados pares de *primers* denominados MABN (obtidos a partir das sequências dos BACs) e MASR (obtidos a partir das sequências dos ESTs).

Todas as reações de amplificação feitas para otimizações dos *primers* e os posteriores testes com os indivíduos de banana foram realizados com volume de 13 µl por reação contendo: 3 µl de DNA genômico (1 ng/ul), 4 µl de *primers* (0,9 mM), 1,45 µl de H₂O MilliQ (água deionizada), 1,3 µl de tampão 10x (Tris-HCl a 200mM; pH 8,4; KCl a 500mM; Invitrogen®), 1,3 µl de albumina de soro bovino (BSA) (2,5ng/ul), 1,3 µl de dNTP (2,5mM), 0,39 µl de MgCl₂ (50mM) e 0,26 µl de enzima Taq polimerase (5 U/ul; Invitrogen®). O programa utilizado para amplificação por PCR nos termocicladores foi o DUPONT, que consiste em: um ciclo a 94°C por 5min para desnaturar o DNA molde (*template*); 29 ciclos contendo: 94°C, 1min; temperatura de anelamento específica do iniciador, 1min e 72°C, 1min; acrescido de uma etapa final a 72°C por 7min para a extensão final de todos os fragmentos amplificados.

Os produtos de PCR foram detectados em gel de agarose 3,5% corados com brometo de etídio. Para cada par de *primer* foram utilizados três indivíduos escolhidos aleatoriamente. Nesse teste, foram utilizados 3 µl da reação de PCR, 2 µl de tampão de carregamento sacarose 40% e 4µl de H₂O MilliQ para evitar a evaporação e aplicado no gel de agarose 3,5%. O marcador usado foi o Ladder 1kb. Os produtos de PCR foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em equipamento *EagleEyeTM* (Stratagene).

Foram realizadas reações de PCR com o objetivo de detectar presença/ausência de fragmentos entre os *Bulks*. Para os locos onde foi detectado polimorfismo, novas reações foram realizadas com os *Bulks* abertos, ou seja, para cada indivíduo, de modo a confirmar a presença da banda em todos os componentes do *Bulk*. Essa verificação de polimorfismo foi realizada em eletroforese com gel de poliacrilamida 6% em resolução em nitrato de prata. O marcador utilizado foi o ladder 10pb. Para a coloração, o procedimento foi: Solução de fixação, 10 min; lavagem (H₂O destilada), 1 min; Solução de oxidação, 3 min; lavagem, 1 min; Solução de Prata (escuro), 20 min; 2 lavagens de 30 seg; Solução de Revelação (agitando) até que as bandas adquiram a intensidade desejada; Solução Stop, 5 min; lavagem, 1 min; deixar secar à temperatura ambiente. Depois de secas, as placas foram escoreadas, marcando os principais indivíduos, e foram escaneadas para posteriores análises. A quantidade de polimorfismo por loco foi calculada com base no software GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001). Para o cálculo dos valores de heterozigosidade foram usados os softwares GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001) e FSTAT (GOUDET, 2001). O desequilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado com $P < 0,05$, utilizando o teste exato de Fisher. O desequilíbrio de ligação entre as combinações de pares de locos foi testado através do FSTAT (FSTAT $P < 0.01$ com correção do teste de Bonferroni) (Passos *et al.*, em submissão) (Apêndice A).

2.5.2 Caracterização e validação de marcadores microssatélites polimórficos derivados de sequências de ESTs e BACs de *M. acuminata*

O polimorfismo nos marcadores SSRs foi avaliado utilizando 20 cultivares diplóides (AA) de *M. acuminata* pertencentes à coleção do programa de melhoramento da Embrapa CNPMF, contrastantes em resistência às Sigatokas, sendo estes cultivares, potenciais parentais para a construção de um mapa genético. Os cultivares resistentes à Sigatoka Negra são: Calcutta 4, Lidi, 0323-03, SH32-63, 1304-06 e 0116-01; cultivares susceptíveis à Sigatoka Negra: Pisang Berlin e Niyarma Yik; cultivares resistentes à Sigatoka Amarela: Calcutta 4, Burmanica, Microcarpa, Lidi, 0323-03, 1304-06, 1741-01, 9179-03, 0116-01,

1318-01 e 4279-06; e os cultivares susceptíveis à Sigatoka Amarela: Raja Uter, Tjau Lagada, F2P2, Khai Nai On, Pisang Berlin, Niyarma Yik, Sowmuk, Jaribuaya e SH32-63. (Tabela 3)

Tabela 3 - Relação entre as amostras de *Musa* e sua resistência ou suscetibilidade às Sigatokas.

Diplóides (AA)	Resistência à Sigatoka-negra	Suscetibilidade à Sigatoka-negra	Resistência à Sigatoka-amarela	Suscetibilidade à Sigatoka-amarela
Calcutta	X		X	
Burmanica			X	
Microcarpa			X	
Raja Uter				X
Tjau Lagada				X
F2P2				X
Khai Nai On				X
Psang Berlin		X		X
Nyarma Ink		X		X
Sowmuk				X
Lidi	X		X	
Jaribuaya				X
0323-03	X		X	
SH32-63	X			X
1304-06	X		X	
1741-01			X	
9179-03			X	
0116-01	X		X	
1318-01			X	
427906			X	

Foram formados 4 agrupamentos (*Bulks*) da seguinte maneira: **Bulk 1**, com DNA de 6 indivíduos resistentes à Sigatoka Negra (Calcutta, Lidi, 0323-03, SH32-63, 1304-06 e 0116-01); **Bulk 2**, com DNA de 2 indivíduos suscetíveis à Sigatoka Negra (Pisang Berlin e Nyarma Yik); **Bulk 3**, com DNA de 11 indivíduos resistentes à Sigatoka Amarela (Calcutta, Burmanica, Microcarpa, Lidi, 0323-03, 1304-06, 1741-01, 9179-03, 0116-01, 1318-01 e 4279-06); e **Bulk 4**, com DNA de 9 indivíduos suscetíveis à Sigatoka Amarela (Raja Uter, Tjau Lagada, F2P2, Khai Nai On, Pisang Berlin, Nyarma Yik, Sowmuk, Jaribuaya e SH32-63).

2.5.3 PCR eletrônico

No presente estudo, para verificar se os locos SSR's identificados são realmente novos em *Musa*, foi realizado um PCR eletrônico utilizando-se *primers* SSR's contra todas as sequências de *M. acuminata* disponíveis em bancos de dados, através do software emboss GUI (bioinfo.hku.hk/emboss/). Foi permitido um percentual de 15% de *mismatch*. Então, como os iniciadores têm um tamanho de 20 bases, foi permitido um desencontro de até 3 bases por e-PCR realizada.

3 RESULTADOS

3.1 Sequenciamento do cDNA de *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine

Dos 15.456 clones selecionados aleatoriamente para serem sequenciados, um total de 7.776 clones sequenciados foram da biblioteca de cDNA de *M. acuminata* Calcutta 4 e, após o processamento e análises de qualidade dessas sequências, resultou em 5.507 *reads* de alta qualidade. No caso da biblioteca de cDNA de *M. acuminata* Cavendish Grande Naine, 7.680 clones iniciais resultaram em 5.214 *reads* de alta qualidade.

Em *M. acuminata* Calcutta 4 foram montados 2.614 *clusters*, compostos de 491 *contigs* e 2.123 *singletons*. Em *M. acuminata* Cavendish Grande Naine, os dados revelaram uma montagem de 2.904 *clusters*, contendo 541 *contigs* e 2.363 *singletons*. As proporções de novidade foram 47,5% e 55,7% para *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine, respectivamente. As estatísticas desses ESTs estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 4 - Resumo das estatísticas dos ESTs das bibliotecas *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine

Descrição	MA4_LEAVES_INF_MF_ES	MACV_LEAVES_INF_MF_LS
Número de placas sequenciadas	81	80
Número de clones aceitos	5.507	5214
Porcentagem de clones aceitos	72,02%	68,40%
Número de <i>contigs</i> (NC)	491	541
Número de <i>singletons</i> (NS)	2123	2363
Porcentagem de novidade	47,50%	55,70%
Porcentagem de sequências redundantes	61,45%	54,68%

3.2 Identificação *in silico* de genes diferencialmente expressos

A análise da expressão gênica diferencial entre *M. acuminata* Calcutta 4 e *M. acuminata* Cavendish Grande Naine foi conduzida com a tentativa de diferenciar a expressão do cultivar resistente durante as fases precoces da interação patógeno-hospedeiro, com a expressão do cultivar susceptível durante as fases posteriores da interação patógeno-hospedeiro. Os dados da expressão diferencial entre as duas bibliotecas, analisados através de três testes estatísticos, são mostrados na tabela 5. Após as análises *in silico* realizadas, foram identificados 220 genes diferencialmente expressos em comum entre as bibliotecas infectadas, sendo que, destes, 80 genes apresentaram uma expressão diferencial significativa em pelo menos um dos testes estatísticos realizados (Tabela 6), entre eles, genes envolvidos em respostas de plantas contra ataque de patógenos e doze genes *No hits*.

Tabela 5 - ESTs diferencialmente expressos, gerados, após análise *in silico*, em comum entre as bibliotecas infectadas de folhas de Calcutta 4 e Cavendish. Foram identificados, no total, 220 genes. (Clusters em ordem

Cluster	Blastx
CL1Contig4	metallothionein-like protein type 3 - MT3 (3A) (<i>Musa acuminata</i>)
CL3Contig1	chloroplast photosystem II - light inducible protein - chloroplast precursor
CL1Contig9	metallothionein-like protein type 3 (3A) MT3 (<i>Musa acuminata</i>)
CL1Contig14	metallothionein-like protein type 3 (3A) MT3 (<i>Musa acuminata</i>)
CL3Contig2	chloroplast photosystem II - light inducible protein - chloroplast precursor
CL1Contig13	metallothionein-like protein type 3 (3A) MT3 ou tipo 1 (<i>Musa acuminata</i>)
CL1Contig16	metallothionein-like protein type 3 (3A) MT3 (<i>Musa acuminata</i>)
CL11Contig3	germin - like protein
CL41Contig1	No hit
CL1Contig10	metallothionein-like protein type 3 (3A) MT3 (<i>Musa acuminata</i>)
CL24Contig2	No hit
CL15Contig1	No hit
CL70Contig1	No hit
CL16Contig7	No hit
CL11Contig2	germin - like protein
CL1Contig17	metallothionein-like protein type 3 (3A) MT3 ou tipo 1 (<i>Musa acuminata</i>)
CL15Contig2	No hit
CL1Contig3	ribulose 1,5 - biphosphate carboxylase/oxygenase
CL109Contig1	ferredoxin - thioredoxin reductase catalytic chain
CL2Contig4	ribulose 1,5 - biphosphate carboxylase/oxygenase

Cluster	Blastx
CL88Contig1	No hit
CL25Contig3	Structure of Banana Lectin-Methyl-Alpha-Mannose Complex
CL40Contig1	aldehyde dehydrogenase (<i>Medicago truncatula</i>) / Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL6Contig2	Hypotetical protein (<i>Oenothera elata</i> subsp. <i>hookeri</i>) Hypotetical protein (<i>Vitis vinifera</i>) / Cytochrome b6f complex subunit, putative (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL66Contig2	
CL8Contig1	Abscisic stress ripening protein - like protein (<i>Musa acuminata</i>)
CL34Contig2	Glutaredoxin
CL25Contig1	Structure of Banana Lectin-Methyl-Alpha-Mannose Complex
CL16Contig3	No hit
CL220Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL80Contig1	Putative glutathione S-transferase (<i>Oryza sativa</i>)
CL273Contig1	Peptidyl - prolyl cis-trans isomerase-related - like protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL446Contig1	No hit
CL407Contig1	No hit
CL475Contig1	No hit
CL39Contig2	Actin depolymerizing factor, putative (<i>Oryza sativa</i>)
CL194Contig1	Hypotetical protein (<i>Medicago truncatula</i>)
CL19Contig2	Carbonic Anhydrase
CL108Contig1	Translationally - controled tumor protein homolog (TCTP)
CL2Contig5	ribulose 1,5 - bisphosphate carboxylase/oxygenase
CL41Contig2	No hit
CL294Contig1	No hit
CL21Contig2	No hit
CL374Contig1	Beta-cyanoalanine synthase
CL6Contig3	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL235Contig1	Probable mannitol dehydrogenase (NAD - dependent mannitol dehydrogenase)
CL174Contig1	60S ribosomal protein L30 (<i>Oryza sativa</i>)
CL420Contig1	No hit
CL26Contig1	Cysteine protease inhibitor (<i>Populus tremula</i>)
CL133Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL125Contig1	PR10 protein (<i>Pinus monticola</i>)
CL9Contig3	Rubisco activase
CL102Contig2	Thioredoxin
CL196Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL43Contig3	Histone
CL6Contig5	Hypotetical protein(<i>Magnetospirillum gryphiswaldense/vitis vinifera/pinus koraiensis</i>)
CL22Contig3	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL35Contig2	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL126Contig1	Photosytem II reaction center
CL92Contig1	Calcium ion binding (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL255Contig1	Hypotetical protein (<i>Musa acuminata</i>)
CL54Contig1	60S ribosomal protein
CL27Contig1	HMG - like nucleosome/chromatin assembly factor D (<i>Zea mays</i>)
CL188Contig1	Protein disulfide isomerase (<i>Oryza sativa</i>)
CL27Contig3	HMG transcription factor
CL47Contig1	Glycolase oxidase
CL321Contig1	Unknown protein
CL249Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL61Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL128Contig1	Alpha chain of nascent polypeptide associated complex
CL232Contig1	Putative RNA-binding protein (<i>Oryza sativa</i>)

Cluster	Blastx
CL183Contig1	Unknown protein
CL112Contig1	Ubiquitin - like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL265Contig1	Putative ethylene - responsive small GTP - binding protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL269Contig1	No hit
CL393Contig1	Protein Kinase domain containing protein, expressed (<i>Oryza sativa</i>)
CL1Contig5	Tropinone reductase, putative tropine dehydrogenase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL149Contig2	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL304Contig1	Beta-cyanoalanine synthase (<i>Oryza sativa</i>)
CL5Contig2	No hit
CL137Contig1	Putative cytosolic CuZn - superoxide dismutase
CL50Contig2	40S ribosomal protein S-30 like (<i>Oryza sativa</i>)
CL6Contig4	Hypotetical protein (<i>Medicago trunculata</i>)
CL445Contig1	Putative 60S ribosomal protein L10 A (<i>Oryza sativa</i>)
CL243Contig1	Putative stress enhanced protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL330Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL16Contig4	No hit
CL238Contig1	Putative hydroxyproline - rich glycoprotein 1 (<i>Oryza sativa</i>)
CL363Contig1	Cell division cycle protein 48, putative, expressed (<i>Oryza sativa</i>)
CL251Contig1	Profilin (<i>Musa acuminata</i>)
CL240Contig1	Putative 60S ribosomal protein L39 (<i>Oryza sativa</i>)
CL262Contig1	Putative 60S ribosomal protein L37 (<i>Oryza sativa</i>)
CL227Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL86Contig1	Translation elongation factor 1A-9 (<i>Gossypium hirsutum</i>)
CL18Contig2	Calmodulin
CL190Contig2	Alanine transferase
CL197Contig1	Putative Ntdin (<i>Oryza sativa</i>)
CL200Contig1	Auxin - repressed protein - like protein ARP1 (<i>Manihot esculenta</i>)
CL143Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL113Contig1	Ozone-responsive stress-related protein-like (<i>Oryza sativa</i>)
CL276Contig1	Unknown protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL195Contig2	Putative 60S ribosomal protein L23A (<i>Oryza sativa</i>)
CL308Contig1	mRNA binding protein, putative (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL98Contig2	Serine - glyoxylate aminotransferase (<i>Spirodela polyrriza</i>)
CL383Contig1	Squalene monooxygenase 2 (<i>Medicago trunculata</i>)
CL268Contig1	Ubiquitin - conjugation enzyme (<i>O.sativa</i>)
CL98Contig1	Aminotransferase (<i>O.sativa</i>)
CL206Contig1	Alanine aminotransferase (<i>O.sativa</i>)
CL73Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL222Contig1	Sec 14 like protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL260Contig1	Ribulose - phosphate 3-epimerase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL274Contig1	40 S ribosomal protein S29 (<i>Oryza sativa</i>)
CL72Contig2	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL93Contig1	No hit
CL83Contig1	Cysteine synthase (<i>Triticum aestivum</i>)
CL141Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL209Contig1	Zinc - binding protein (<i>Zea mays</i>)
CL56Contig2	Aci-reductone dioxygenase-like protein
CL160Contig2	Putative tropinone reductase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL156Contig1	Putative Peroxisomal membrane protein PEX11-1
CL55Contig1	SUI 1 protein (<i>Coffea arabica</i>)
CL180Contig1	Putative small nuclear ribonucleoprotein E
CL22Contig4	ADP-ribosylation factor (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

Cluster	Blastx
CL163Contig1	Cysteine Proteinase (<i>Elaeis guineensis</i>)
CL385Contig1	40 S ribosomal protein S25 (<i>Oryza sativa</i>)
CL139Contig1	Cytochrome c oxidase subunit 5C
CL104Contig2	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL48Contig1	Peroxiredoxin Q, chlroplast precursor
CL162Contig1	One helix protein (OHP) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL147Contig1	60 S ribosomal protein L5
CL18Contig3	Calmodulin (<i>Oryza sativa</i>)
CL10Contig3	Light - regulated protein precursor (<i>Lolium perenne</i>)
CL154Contig1	60 S ribosomal protein L36 (<i>Oryza sativa</i>)
CL86Contig2	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha) (<i>Lilium longiflorum</i>)
CL224Contig1	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL33Contig1	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL306Contig1	Cytosolic monodehydroascorbate reductase (<i>Oryza sativa</i>)
CL122Contig1	Elongation factor 1-beta A1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL46Contig1	Glycine-rich RNA-binding protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL213Contig1	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL76Contig1	Ribosomal protein S21e (<i>Medicago trunculata</i>)
CL129Contig1	Cytosolic Triose Phosphate isomerase (<i>A.thaliana</i>)
CL18Contig1	Calmodulin (<i>A.thaliana</i>)
CL175Contig1	Calmodulin (<i>A.thaliana</i>)
CL124Contig1	Translationally - controled tumor protein homolog (TCTP)
CL17Contig2	Glycine cleavage system H protein mitochondria precursor (<i>Oryza sativa</i>)
CL19Contig1	Carbonic Anhydrase
CL145Contig2	Eukariotic traslation initiation factor 5A isoform VII (<i>Hevea brasiliensis</i>)
CL346Contig1	Shikimate Kinase, Chloroplast precursor (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL84Contig3	Ubiquitin - conjugation enzyme (<i>Medicago trunculata</i>)
CL31Contig2	Photosytem I-N subunit (<i>Medicago trunculata</i>)
CL82Contig2	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL349Contig1	No hit
CL210Contig1	Magnesium - Protoporphyrum IX monomethyl ester cyclase
CL14Contig2	Ubiquitin
CL44Contig2	PR10 protein (<i>Pinus monticola</i>)
CL189Contig1	Protein traslation factor SUI homolog (<i>Oryza sativa</i>)
CL474Contig1	40 S ribosomal protein S19 (<i>Oryza sativa</i>)
CL416Contig1	Putative seed specific protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL335Contig1	60 S ribosomal protein L23 (<i>Oryza sativa</i>)
CL106Contig1	Salt-tolerance protein (<i>Glycine max</i>)
CL116Contig2	putative p23 co-chaperone (<i>Oryza sativa</i>)
CL381Contig1	nuclear movement family protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL237Contig1	Hypotetical protein (<i>Medicago trunculata</i>)
CL1Contig8	metallothionein-like protein type 3 - MT3
CL28Contig3	Fructose-bisphosphate aldolase (<i>Oryza sativa</i>)
CL242Contig1	Ribossomal protein S24e (<i>Medicago trunculata</i>)
CL60Contig2	Ribosomal protein L23 (<i>Oryza sativa</i>)
CL2Contig3	Chloroplast ribulose 1,5 - bisphosphate carboxylase/oxygenase - small subunit (<i>Musa acuminata</i>)
CL193Contig1	40 S ribosomal protein S18 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL62Contig1	No hit
CL153Contig1	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)
CL50Contig1	40 S ribosomal protein S-30 like (<i>Oryza sativa</i>)
CL47Contig3	Glycolate oxidase

Cluster	Blastx
CL32Contig2	Catalase 2 (<i>Zantedeschia aethiopica</i>)
CL91Contig1	40 S ribosomal protein S29 (<i>Oryza sativa</i>)
CL14Contig3	Ubiquitin (<i>Hevea brasiliensis</i>)
CL340Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL245Contig1	BTF 3b-like transcription factor (<i>Musa acuminata</i>)
CL394Contig1	Chloroplast oxygen-envolving enhancer protein (<i>Manihot esculeta</i>)
CL116Contig1	putative p23 co-chaperone (<i>Oryza sativa</i>)
CL267Contig1	Unknown protein (<i>Medicago trunculata</i>)
CL1Contig18	metallothionein-like protein type 3 - MT3 (<i>Nelumbo nucifera</i>)
CL389Contig1	Catalase (<i>Prunus persica</i>)
CL377Contig1	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL352Contig1	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL322Contig1	Oxidoreductase, 20G-Fe oxygenase family protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL370Contig1	NHP2-like protein 1 (<i>Oryza sativa</i>)
CL184Contig1	Ubiquitin- protein ligase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL263Contig1	70KDa heat shock protein (<i>Sandersonia aurantiaca</i>)
CL303Contig1	Phosphate translocator (<i>Nicotiana tabacum</i>)
CL121Contig2	Proteasome subunit alpha type 5 (<i>Glycine max</i>)
CL479Contig1	Ethylene receptor-like protein (<i>Musa acuminata</i>)
CL359Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL9Contig2	Chloroplast ribulose 1,5 - bisphosphate carboxylase/oxygenase
CL298Contig1	Methyltransferase 2 (<i>Helianthus annuus</i>)
CL203Contig1	Acyl carrier protein (<i>Olea europaea</i>)
CL39Contig1	Actin depolymerizing factor 11 (ADF-11) (<i>Oryza sativa</i>)
CL168Contig1	Putative 60S ribosomal protein L44 (<i>Oryza sativa</i>)
CL115Contig1	Glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase (<i>Musa acuminata</i>)
CL111Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL71Contig1	60 S ribosomal protein L10 (<i>Euphorbia esula</i>)
CL9Contig1	Chloroplast ribulose 1,5 - bisphosphate carboxylase/oxygenase - (<i>Larrea tridentata</i>)
CL45Contig1	Thioredoxin peroxidase (<i>Nicotiana tabacum</i>)
CL59Contig1	Cytochrome b6f complex iron - sulfur subunit (<i>Oryza sativa</i>)
CL167Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL134Contig1	Hypotetical protein (<i>Vitis vinifera</i>)
CL22Contig2	ADP-ribosylation factor (<i>Oryza sativa</i>)
CL68Contig1	Glutathione S - transferase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL140Contig1	Unknown protein (<i>Solanum tuberosum</i>)
CL181Contig1	Putative translatin factor (<i>Pinus pinaster</i>)
CL319Contig1	ABCF - type protein (<i>Zea mays</i>)
CL236Contig1	SKP1 family protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL226Contig1	Hypotetical protein (<i>Vitis vinifera</i>)
CL60Contig1	Putative ribosomal protein L32(<i>Oryza sativa</i>)
CL131Contig1	CBS- domain containing protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL378Contig1	40 S ribosomal protein S15 (<i>Elaeis oleifera</i>)
CL312Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)
CL146Contig2	Ubiquitin- protein ligase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CL216Contig1	ferredoxin - NADP reductase, leaf isozyme (FNR) (<i>Pisum sativum</i>)

Tabela 6 - ESTs diferencialmente expressos nas bibliotecas de folhas infectadas de *M. acuminata* Calcutta 4 e *M acuminata* Cavendish.

Cluster	Blastx	Calcutta-4 (5507 reads)	Cavendish (5214 reads)	Stekel	Audic-Claverie	Fisher
CL1Contig4	metallothionein-like protein – type 3	371.0	4.0	22.789.673.293.466.9 00	1,09E-100	7,04E-98
CL3Contig1	chloroplast photosystem II - light inducible protein - chloroplast precursor	354.0	10.0	1.972.308.078.593.41 0	1,52E-87	5,23E-85
CL1Contig9	metallothionein-like protein – type 3	359.0	12.0	1.948.311.458.989.02 0	1,56E-86	7,13E-84
CL1Contig14	metallothionein-like protein – type 3	6.0	189.0	11.344.493.084.884.0 00	4,55E-51	4,80E-50
CL3Contig2	chloroplast photosystem II - light inducible protein - chloroplast precursor	3.0	147.0	9.325.868.282.815.19 0	3,61E-42	2,04E-41
CL1Contig13	metallothionein-like protein – type 3	5.0	143.0	8.456.004.536.409.63 0	1,75E-38	9,34E-38
CL1Contig16	metallothionein-like protein – type 3	6.0	117.0	6.436.362.098.890.77 0	9,85E-30	3,88E-29
CL11Contig3	germin - like protein	57.0	2.0	30.679.733.877.821.6 00	7,19E-15	2,45E-14
CL41Contig1	No hit	25.0	0.0	-1.0 12.723.077.476.509.9 00	3,00E-08	7,38E-08
CL1Contig10	metallothionein-like protein – type 3	6.0	36.0	10.792.091.880.327.2 00	3,42E-07	1,10E-06
CL24Contig2	No hit	4.0	28.0	10.024.219.890.125.8 00	2,70E-06	7,43E-06
CL15Contig1	No hit	20.0	1.0	9.408.056.319.726.74 00	9,42E-06	2,37E-05
CL70Contig1	No hit	19.0	1.0	9.047.517.094.760.13 0	1,75E-05	4,47E-05
CL16Contig7	No hit	2.0	20.0	8.794.527.800.019.03 0	1,94E-05	4,61E-05
CL11Contig2	germin - like protein	18.0	1.0	7.547.268.427.111.42 0	3,26E-05	8,41E-05
CL1Contig17	metallothionein-like protein – type 3	221.0	138.0	0	5,29E-05	1,64E-04
CL15Contig2	No hit	22.0	3.0	764.550.391.733.332	7,58E-05	1,77E-04
CL1Contig3	Rubisco Large sub-unit	10.0	0.0	-1.0	6,57E-04	0.0020151014834008 63
CL109Contig1	ferredoxin - thioredoxin reductase catalytic chain	10.0	0.0	-1.0	6,57E-04	0.0020151014834008 63
CL2Contig4	Rubisco Small sub-unit	196.0	248.0	4.639.409.360.538.34 0	0.00116791530883883 17	0.0030942174775505 627
CL88Contig1	No hit	14.0	2.0	4.739.973.602.935.21 0	0.00167725217864778 4	0.0043826181293379 12

Cluster	Blastx	Calcutta-4 (5507 reads)	Cavendish (5214 reads)	Stekel	Audic-Claverie	Fisher
CL40Contig1	aldehyde dehydrogenase (<i>Medicago truncatula</i>)	23.0	7.0	40.700.581.610.889.6 00	0.0026667228594968 0.00294196919305295	0.0057043184851746 755 0.0071400893131828
CL6Contig2	Hypotetical protein (<i>Oenothera elata</i> subsp. <i>hookeri</i>)	36.0	15.0	38.998.236.078.296.8 00	25 0.00454243268089242	4 0.0098539012926650
CL66Contig2	Hypotetical protein (<i>Vitis vinifera</i>) / Cytochrome b6f complex subunit, putative (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	1.0	9.0	39.030.687.649.444.0 00	3 0.00499943097740351	43 0.0133619767138529
CL16Contig3	No hit	12.0	2.0	36.942.988.778.129.5 00	7 0.00855831648416934	59 0.0185029302980639
CL80Contig1	Putative glutathione S-transferase (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	8.0	32.935.525.169.088.1 00	2 0.01338626565163595	6 0.0396436804320413
CL194Contig1	Hypotetical protein (<i>Medicago truncatula</i>)	8.0	1.0	29.108.436.535.255.7 00	7 0.01338626565163595	5 0.0396436804320413
CL19Contig2	Carbonic Anhydrase	8.0	1.0	29.108.436.535.255.7 00	7 0.01528429443135860	5 0.0341381452693941
CL108Contig1	Translationally - controled tumor protein homolog (TCTP)	2.0	9.0	26.045.504.798.164.4 00	5 0.01528429443135860	5 0.0341381452693941
CL2Contig5	ribulose 1,5 - biphosphate carboxylase/oxygenase	2.0	9.0	26.045.504.798.164.4 00	5 2.698.022.970.081.81	5 0.0344503173299097
CL41Contig2	No hit	1.0	7.0	2.698.022.970.081.81 0	0.01599001215532988 0.02049407219682178	26 0.0503603160537617
CL26Contig1	Cysteine protease inhibitor (<i>Populus tremula</i>)	13.0	4.0	22.687.182.396.938.9 00	7 23.699.868.014.676.0	06 0.0710601911655277
CL133Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)	7.0	1.0	23.699.868.014.676.0 00	0.02370323677155176 2.095.201.568.707.97	1 0.0591119935600058
CL125Contig1	PR10 protein (<i>Pinus monticola</i>)	2.0	8.0	2.095.201.568.707.97 0	0.02662979359893519 19.123.099.866.068.8	2 0.0699554887845199
CL9Contig3	Rubisco activase	8.0	17.0	19.123.099.866.068.8 00	0.02763675485271998 2.120.512.912.751.65	2 0.0634834690312355
CL102Contig2	Thioredoxin	1.0	6.0	2.120.512.912.751.65 0	7 0.02957313610205466	4 0.0634834690312355
CL196Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	6.0	2.120.512.912.751.65 0	7 1.871.820.177.543.77	4 0.0722207231041574
CL43Contig3	Histone	6.0	14.0	1.871.820.177.543.77 0	0.02967162538667162 16.904.481.841.047.4	6 0.0770278730866933
CL6Contig5	Hypotetical protein(<i>Magnetospirillum gryphiswaldense/Vitis vinifera/Pinus koraiensis</i>)	70.0	47.0	16.904.481.841.047.4 00	0.03391686406281648 17.382.456.126.207.0	3 0.0847688830975028
CL22Contig3	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)	3.0	9.0	17.382.456.126.207.0 00	0.037355158216409 15.830.611.906.095.6	3 0.1040360053648124
CL35Contig2	Unknown protein (<i>Oryza sativa</i>)	11.0	20.0	15.830.611.906.095.6 00	0.03986315006536584 18.471.494.389.064.7	2 0.1258904711219474
CL126Contig1	Photosytem II reaction center	6.0	1.0	18.471.494.389.064.7 00	0.04155659470010371 18.471.494.389.064.7	3 0.1258904711219474
CL92Contig1	Calcium ion binding (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	6.0	1.0	18.471.494.389.064.7 00	0.04155659470010371 18.471.494.389.064.7	3 0.1258904711219474
CL255Contig1	Hypotetical protein (<i>Musa acuminata</i>)	6.0	1.0	18.471.494.389.064.7 00	0.04155659470010371	3 0.1258904711219474

Cluster	Blastx	Calcutta-4 (5507 reads)	Cavendish (5214 reads)	Stekel	Audic-Claverie	Fisher
					00	3
CL54Contig1	60S ribosomal protein	6.0	13.0	15.188.069.574.847.9	0.04481569032204025	0.1076842696384307
					00	8
CL27Contig1	HMG - like nucleosome/chromatin assembly factor D (<i>Zea mays</i>)	2.0	7.0	16.110.128.932.081.7	0.04571679483999776	0.1008209536950959
					00	6
CL188Contig1	Protein disulfide isomerase (<i>Oryza sativa</i>)	2.0	7.0	16.110.128.932.081.7	0.04571679483999776	0.1008209536950959
					00	6
CL27Contig3	HMG transcription factor	4.0	10.0	1.497.534.651.809.35		0.1101528274916089
					0	2
CL47Contig1	Glycolase oxidase	11.0	4.0	15.127.295.767.109.9	0.04770388157614185	0.1203599103177119
					00	4
CL321Contig1	Unknown protein	1.0	5.0	15.671.027.682.098.9	0.04842399715005357	0.1154901199415204
					00	2
CL249Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	5.0	15.671.027.682.098.9	0.05401149203871037	0.1154901199415204
					00	2
CL61Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	5.0	15.671.027.682.098.9	0.05401149203871037	0.1154901199415204
					00	2
CL128Contig1	Alpha chain of nascent polypeptide associated complex	1.0	5.0	15.671.027.682.098.9	0.05401149203871037	0.1154901199415204
					00	2
CL232Contig1	Putative RNA-binding protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	5.0	15.671.027.682.098.9	0.05401149203871037	0.1154901199415204
					00	2
CL183Contig1	Unknown protein	1.0	5.0	15.671.027.682.098.9	0.05401149203871037	0.1154901199415204
					00	2
CL112Contig1	Ubiquitin - like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	1.0	5.0	15.671.027.682.098.9	0.05401149203871037	0.1154901199415204
					00	2
CL265Contig1	Putative ethylene - responsive small GTP - binding protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	5.0	15.671.027.682.098.9	0.05401149203871037	0.1154901199415204
					00	2
CL269Contig1	No hit	5.0	1.0	1.348.411.989.133.75	0.07196881897066733	0.2196969073814045
					0	4
CL393Contig1	Protein Kinase domain containing protein, expressed (<i>Oryza sativa</i>)	5.0	1.0	1.348.411.989.133.75	0.07196881897066733	0.2196969073814045
					0	4
CL1Contig5	Tropinone reductase, putative tropine dehydrogenase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	5.0	1.0	1.348.411.989.133.75	0.07196881897066733	0.2196969073814045
					0	4
CL149Contig2	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)	5.0	1.0	1.348.411.989.133.75	0.07196881897066733	0.2196969073814045
					0	4
CL304Contig1	Beta-cyanoalanine synthase (<i>Oryza sativa</i>)	5.0	1.0	1.348.411.989.133.75	0.07196881897066733	0.2196969073814045
					0	4
CL5Contig2	No hit	10.0	4.0	11.694.984.831.951.5	0.07196881897066733	0.1816503233158725
					00	8
CL137Contig1	Putative cytosolic CuZn - superoxide dismutase	2.0	6.0	11.588.304.084.138.0	0.07281832693080666	0.1688764206608721
					00	4
CL50Contig2	40S ribosomal protein S-30 like (<i>Oryza sativa</i>)	2.0	6.0	11.588.304.084.138.0	0.0771140699156218	0.1688764206608721
					00	4
CL445Contig1	Putative 60S ribosomal protein L10 A (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0.0771140699156218	0.1688764206608721
					0	8
					0.09708293935038018	0.2066781157344809

Cluster	Blastx	Calcutta-4 (5507 reads)	Cavendish (5214 reads)	Stekel	Audic-Claverie	Fisher
CL243Contig1	Putative stress enhanced protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL330Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL16Contig4	No hit	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL238Contig1	Putative hydroxyproline - rich glycoprotein 1 (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL363Contig1	Cell division cycle protein 48, putative, expressed (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL251Contig1	Profilin (<i>Musa acuminata</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL240Contig1	Putative 60S ribosomal protein L39 (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL262Contig1	Putative 60S ribosomal protein L37 (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL227Contig1	Hypotetical protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL86Contig1	Translation elongation factor 1A-9 (<i>Gossypium hirsutum</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL18Contig2	Calmodulin	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL190Contig2	Alanine transferase	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL197Contig1	Putative Ntdin (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809
CL200Contig1	Auxin - repressed protein - like protein ARP1 (<i>Manihot esculenta</i>)	1.0	4.0	1.047.600.784.353.98	0 0.09708293935038018	0.2066781157344809

* Negrito - Testes estatísticos significativos

Vinte e quatro genes diferencialmente expressos identificados após análise *in silico* dos níveis de expressão estão relacionados direta ou indiretamente com resistência ou defesa de plantas contra ataques de patógenos invasores (Tabela 7).

Dos 24 genes expressos diferencialmente relacionados com resistência ou defesa de plantas, 7 referem-se a metalotioneínas, todas do tipo 3 (MT3). Outra classe de genes diferencialmente expressos inclui germin-like protein (GLPs). Os genes referentes a ferredoxina e a glutathione S-transferase (GST) foram identificados. Os demais genes relacionados com resistência ou defesa de plantas identificados foram: translationally - controlled tumor protein homolog (TCTP), proteína inibidora da cisteína proteinase, pathogenesis-related proteins (PRPs), thioredoxin, proteína disulfide isomerase, proteína glycolate oxidase, “RNA binding protein”, calmodulina, “Protein Kinase domain containing protein”, “Putative ethylene – responsive small GTP – binding protein”, superoxide dismutase (SOD), “Putative stress enhanced protein” e “Auxin – repressed protein like (*arp*). Esses dados estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7 - ESTs diferencialmente expressos das bibliotecas de folhas infectadas de Calcutta 4 e Cavendish, associados a alguma resposta de defesa.

Cluster	Blastx	Calcutta-4 (5507 reads)	Cavendish (5214 reads)
CL1Contig4	metallothionein-like protein	371.0	4.0
CL1Contig9	metallothionein-like protein	359.0	12.0
CL1Contig14	metallothionein-like protein	6.0	189.0
CL1Contig13	metallothionein-like protein	5.0	143.0
CL1Contig16	metallothionein-like protein	6.0	117.0
CL11Contig3	germin - like protein	57.0	2.0
CL1Contig10	metallothionein-like protein	6.0	36.0
CL11Contig2	germin - like protein	18.0	1.0
CL1Contig17	metallothionein-like protein	221.0	138.0
CL109Contig1	ferredoxin - thioredoxin reductase catalytic chain	10.0	0.0
CL80Contig1	Putative glutathione S-transferase (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	8.0
CL108Contig1	Translationally - controled tumor protein homolog (TCTP)	2.0	9.0
CL26Contig1	Cysteine protease inhibitor (<i>Populus tremula</i>)	13.0	4.0
CL125Contig1	PR10 protein (<i>Pinus monticola</i>)	2.0	8.0
CL102Contig2	Thioredoxin	1.0	6.0
CL92Contig1	Calcium ion binding (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	6.0	1.0
CL188Contig1	Protein disulfide isomerase (<i>Oryza sativa</i>)	2.0	7.0
CL47Contig1	Glycolate oxidase	11.0	4.0
CL232Contig1	Putative RNA-binding protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	5.0
CL265Contig1	Putative ethylene - responsive small GTP - binding protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	5.0
CL393Contig1	Protein Kinase domain containing protein, expressed (<i>Oryza sativa</i>)	5.0	1.0
CL137Contig1	Putative cytosolic CuZn - superoxide dismutase	2.0	6.0
CL243Contig1	Putative stress enhanced protein (<i>Oryza sativa</i>)	1.0	4.0
CL18Contig2	Calmodulin	1.0	4.0
CL200Contig1	Auxin - repressed protein - like protein ARP1 (<i>Manihot esculenta</i>)	1.0	4.0

3.3 Validação da expressão diferencial via q RT-PCR

3.3.1 Desenho de *primers* q-PCR para validação dos genes diferencialmente expressos *in silico*

Um total de 31 pares de *primers* para a validação dos genes diferencialmente expressos por q-PCR foi desenhado (Tabela 8). Destes, 25 referem-se aos genes diferencialmente expressos envolvidos com processos de resistência e defesa. Outros 4 pares de *primers* amplificam *No hits* que foram usados na modelagem protéica e que podem ter uma ligação com o processo de resposta. Além disso, foi realizado o desenho de pares de *primers* que amplificam genes constitutivos (*Housekeeping genes*) para a normalização. Foram escolhidos para normalização os genes da β -actina de banana (número de acesso AF246288) e o gene da Ubiquitina.

Tabela 8 - Lista de *primers* desenhados para a validação dos genes diferencialmente expressos através da técnica de q-PCR.

Cluster	Blastx	Primers F	Primers R
CL1Contig4	metallothionein-like protein	TGCGTGAAGAAGGGAAACAG	ACATTGGCAGTCAACACAGG
CL1Contig9	metallothionein-like protein	AGAAGCTGCCGAGCATGAC	TTCTCAGTTGCCACACTTGC
CL1Contig14	metallothionein-like protein	TTCTCGTCTAACCATGTCTG	AGCTGTTTCCCTTCTTCACG
CL1Contig13	metallothionein-like protein	GCATCGACTACCCATCCAAG	AGTGCGTGAAGAAGGGAAAC
CL1Contig16	metallothionein-like protein	TTGGATGGTGTAGTCGATGC	ACATTGGCAGTCAACACAGG
CL11Contig3	germin - like protein	GCCATCGCTGATTACATTC	TTCTTGAGCGATGTCCAACC
CL1Contig10	metallothionein-like protein	TTCTCAGTTGCCACACTTGC	TTGTTGAGACCGAGAAGAGC
CL11Contig2	germin - like protein	TCACCTCCAACACGGAAAAC	CCGATGTTGAACTGGAAGTG
CL1Contig17	metallothionein-like protein	ACATTGGCAGTCAACACAGG	TTGGATGGTGTAGTCGATGC
CL109Contig1	ferredoxin - thioredoxin reductase catalytic chain	TCAGCAAGCCCCTTGATAAC	TGATTTCGTGCAGAAGTGGAG
CL80Contig1	Putative glutathione S-transferase (<i>Oryza sativa</i>)	AGCCGCTTTCAGTGAAGAAG	ATGAGCATGCACACAGTGG
CL108Contig1	Translationally - controled tumor protein homolog (TCTP)	TCCCTTCAACTTCCCACAAC	CAGGTGATGAGCTTTTGTCTG
CL26Contig1	Cysteine protease inhibitor (<i>Populus tremula</i>)	CTTGCTCCTTCACCTTCACC	CTCCAAAACAGCTCTGAGG
CL125Contig1	PR10 protein (<i>Pinus monticola</i>)	TACTTGTGCTCGATGGTGTG	TGAAGCCACTGATCTTCGTG
CL102Contig2	Thioredoxin	GAACGAAACCATCGATCCTC	TGCCACCTTTGTACTGATG
CL92Contig1	Calcium ion binding (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AGCTCACCGACGATCAAATC	GAACGCATCACAGTTCCAAG
CL188Contig1	Protein disulfide isomerase (<i>Oryza sativa</i>)	AGCGACAACCGGAATACTTG	GGCTGTTTAAGCCTTTTGATG
CL47Contig1	Glycolase oxidase	TGGTCATGTCAATCCTGGAG	AGTTGCCCAAGATGGTGTTC
CL232Contig1	Putative RNA-binding protein (<i>Oryza sativa</i>)	TGACCAAGGTCTTCAACTGC	TCTTGCATCACCTTCTGACG
CL265Contig1	Putative ethylene - responsive small GTP - binding protein (<i>Oryza sativa</i>)	ATCCATGTCGGCCTTGTTAC	GAGGCGCTATGGGTATTTTG
CL393Contig1	Protein Kinase domain containing protein, expressed (<i>Oryza sativa</i>)	ATCCTCCAATCATCCACAGG	ATATGCCCTTCTCGTTGTC
CL137Contig1	Putative cytosolic CuZn - superoxide dismutase	AACATGGAAGCCGTGAAGTC	TTGTTCTTGGTGGCAGTGAG
CL243Contig1	Putative stress enhanced protein (<i>Oryza sativa</i>)	ACCCAACCACACATCCAATC	CCCGTCTTTTGGGTAACATC
CL18Contig2	Calmodulin	CAATGAGGTTGATGCAGACG	GCGGAGATGAAACCATTCTG
CL200Contig1	Auxin - repressed protein - like protein ARP1 (<i>Manihot esculenta</i>)	CCAATTTCCACTCCTCACAG	AGTGCGGAAACAAAGAGCAC

Cluster	Blastx	Primers F	Primers R
CL16Contig7	No hit	GTTTCTTTGACCTGCCATGC	AATCTCCATCGAGGGTAAGG
CL88Contig1	No hit	AGCCGCTTTCAGTGAAGAAG	ATGAGCATGCACACAGTGG
CL5Contig2	No hit	AGAAGTCCGCTGATTTGGAC	GATCCACACTTGCAACCTTC
CL16Contig4	No hit	ACCGTGCAAGAAATCTGGAG	GCATGGCAGGTCAAAGAAAC
CL112Contig1	Ubiquitin - like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	CATGGCATCGATCTCATCAC	TCTTGTTTGATGGCCGTAGG
AF246288	Actin - <i>Musa</i> Housekeeping	TGACGACATTCAGCCTCTTG	AGCATCATCTCCAGCAAAGC

3.3.2 Otimização da extração do RNA total para validação da expressão gênica via qRT-PCR

Após extração realizada utilizando os métodos do Trizol (Invitrogen) e do CTAB e os Kits *Concert Plant RNA Reagent* (Invitrogen) e *RNeasy mini Kit* (Qiagen), pôde-se verificar a integridade e a pureza do RNA por meio da eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 2). Nas extrações de RNA de folhas de *M. acuminata* Cavendish, obteve-se produto com todos os protocolos: Trizol (8ng/μL), CTAB (10ng/μL), CONCERT (8ng/μL), sendo este produto com boa integridade e pureza. As bandas originadas a partir da extração realizada utilizando esses protocolos apresentaram-se bem definidas, mostrando uma boa integridade do RNA extraído. Além disso, o gel não revelou nenhum tipo de impureza, já que não apresentou nenhum “rastros” nas extrações em que se obteve sucesso. No caso das extrações realizadas de raízes *M. acuminata* Cavendish, nenhum protocolo obteve sucesso. As extrações de RNA de raízes ainda precisam ser otimizadas para a obtenção de um produto viável para a validação da expressão gênica.

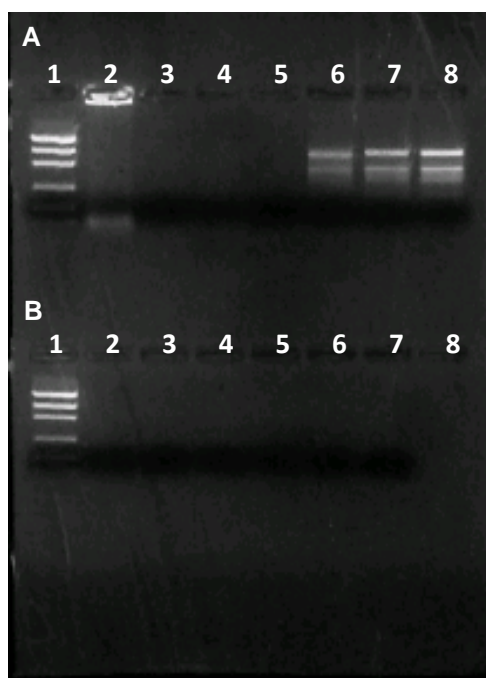


Figura 2 - Gel de Agarose 1% - Análise do RNA de Banana (CAV). A) Pente 1 - (Extração da folha); B) Pente 2 - (Extração da raiz) – Poços: 1) Marcador Molecular DNA Low Mass; 2) RNA fungo degradado – controle (+) RATO; 3) Kit Qiagen RNeasy mini Kit (Pouca quantidade de macerado) – 5 μL; 4) Kit Qiagen RNeasy mini Kit (Maior quantidade de macerado) – 5 μL; 5) Trizol (eppendorf) - 5 μL; 6) CTAB - 5 μL; 7) Concert – 5 μL; 8) Concert – 10 μL.

3.4 Modelagem protéica

A identificação de genes diferencialmente expressos durante a interação entre o cultivar resistente e suscetível de *Musa* com o fungo *M. fijiensis* foi conduzida através da análise *in silico*. Dessa forma, os modelos estruturais das proteínas expressas por tais genes foram calculados automaticamente pelo programa Modeller (figura 3). Para tanto, para cada sequência protéica a ser modelada foi selecionada uma ou mais proteínas com estrutura conhecida e depositada no banco de dados PDB como modelo de coordenadas atômicas. Tal seleção baseou-se na pontuação obtida pelos algoritmos FFAS03 e/ou 3D-Jury, conforme apresentados na tabela 9. Todos os modelos finais foram analisados pelo servidor VADAR, o qual consiste na compilação de mais de 15 algoritmos e programas capazes de analisar o volume, área e ângulos de estruturas de proteínas a partir de suas coordenadas atômicas. Essa análise mostrou-se satisfatória para todos os modelos, atingindo valores próximos aos esperados. Em relação ao seq5, modelo baseado no *template* 1sbq_A mostrou melhor avaliação no VADAR que o modelo obtido a partir do *template* 1sou_A. Os alinhamentos, bem como os modelos gerados a partir dos *templates* 1oed_C e 1i3q_C, referentes a seq7, não apresentaram cobertura satisfatória, resultando em modelos com grande parte da sequência sem coordenadas atômicas. Entretanto, como cada um dos *templates* apresentou similaridade com regiões distintas da proteína, um novo modelo foi produzido a partir do alinhamento múltiplo de ambos os *templates* citados. O modelo múltiplo (seq7_1i3q_1oed.pdb) apresentou melhor avaliação entre todos analisados e poderá ser utilizado para um futuro estudo de função. A sequência protéica seq11 apresentou maior similaridade com proteínas com múltiplos domínios 1jro e 1sij, representando apenas uma pequena porção das mesmas. Ao analisar os modelos, é possível observar que as coordenadas atômicas assumidas por seq11 apresentam, em sua maioria, forma de coil. Ainda assim, entre os dois modelos gerados, o que apresentou melhor avaliação no VADAR foi o gerado a partir do *template* 1jro. Todas as tentativas de otimização dos modelos por minimização de energia não alcançaram os resultados desejados. Os alinhamentos, bem como os modelos gerados a partir dos *templates* 2b71_A e 2poe_A (referentes à seq12) não apresentaram cobertura total, resultando em modelos com parte da sequência sem coordenadas atômicas. Um novo modelo foi produzido a partir do alinhamento múltiplo de ambos os *templates* citados. O modelo múltiplo

(seq12_2b71_2poe.pdb) apresentou melhor avaliação entre todos analisados e poderá servir de base para um futuro estudo de função da mesma sequência.

Tabela 9 - Modelos de coordenadas atômicas escolhidas para a modelagem por homologia. Tal seleção baseou-se na pontuação (*score*) obtida pelos algoritmos FFAS03 e/ou 3D-Jury. Estão descritos também o código PDB dos modelos, bem como a função protéica descrita.

SEQUÊNCIA	3D-Jury			FFAS03		
	Score	Código PDB	Função descrita	Score	Código PDB	Função descrita
seq_5	-6,4	1sou_A	Ligase (CORT et al., <i>unpublished</i>)	-7,5	1sbq_A	Ligase (CHEN et al., 2004)
seq_7	-6,3	1oed_C	Ion Channel/receptor (MIYAZAWA et al., 2003)	-6,6	1i3q_C	Transcription (CRAMER et al., 2004)
seq_11	-6,3	1sij_A	Oxidoreductase (BOER et al., 2002)	-7,1	1jro_A	Oxidoreductase (TRUGLIO et al., 2002)
seq_12	-5,9	2b7_A	Isomerase (VEDADI et al., 2007)	-6,2	2poe_A	Isomerase (WERNIMONT et al., <i>unpublished</i>)

Figura 1(a)

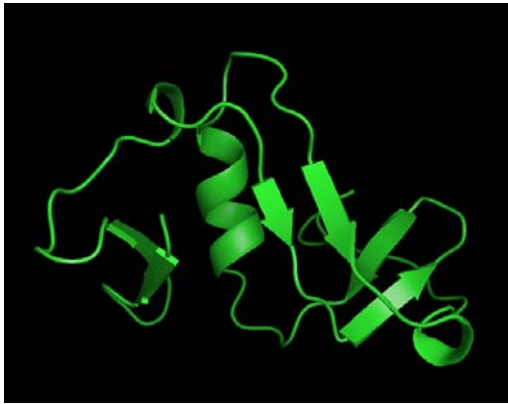


Figura 1(b)

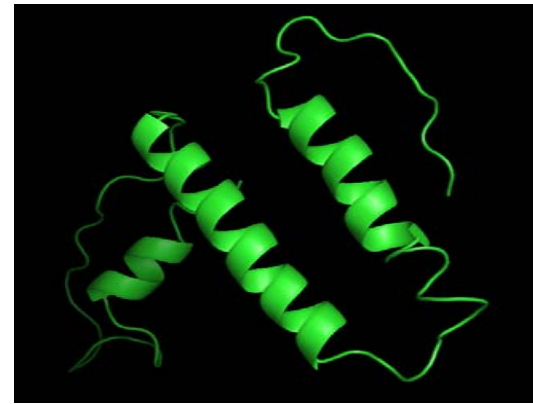


Figura 1(c)

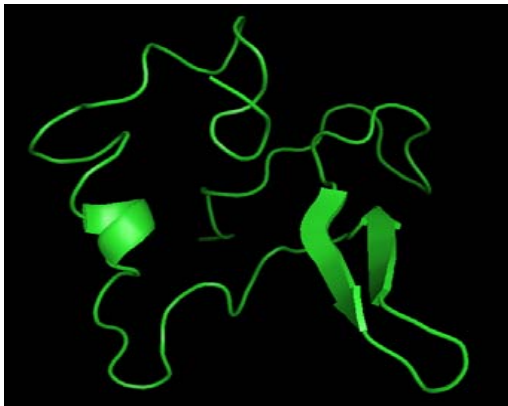


Figura 1(d)

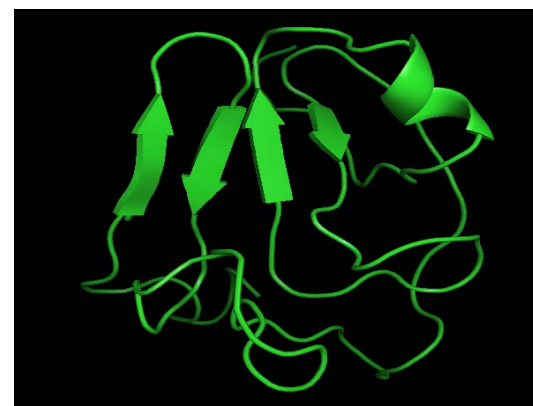


Figura 3 - Figuras representativas dos modelos estruturais das proteínas seq5 (a), seq7 (b), seq11 (c), seq12 (d). As estruturas foram construídas usando Modeller, a partir das estruturas conhecidas de proteínas depositadas no banco de dados PDB. (a) seq5 teve como modelo 1sbq (cadeia A); (b) seq7, 1oed (cadeia C) e 1i3q (cadeia C); (c) seq11, 1jro (cadeia A); e (d) seq12, 2b71 (cadeia A) e 2poe (cadeia A).

3.5 Identificação dos marcadores microssatélites

A análise dos ESTs gerados de *M. acuminata* Calcutta 4 revelou cinco classes de *repeats* de SSR. Os trinucleotídeos apresentam-se como os mais abundantes (54,1%), seguido pelos di-(31,6%), tetra-(6,7%), hexa-(5,3%) e pentanucleotídeos (2,3%). Os mais abundantes motivos trinucleotídeos foram GAA, CTC, AAG, AGA, CCT, GAC, GAG, GAT, CAC e AGG, representando 68% desse *repeat*. Dos dinucleotídeos, os motivos GA, AG, CT e CT representaram 78,5%. *Repeats* de tetranucleotídeos foram menos abundantes, com a maioria dos motivos com igual abundância (11,1% cada), e apenas o motivo GAGG foi mais frequente (22,2%). Penta e hexanucleotídeo representaram os *repeats* com menos abundância em Calcutta 4. Os motivos dos pentanucleotídeos apresentam abundância igual a 33,3% e os dos hexanucleotídeos, 14,3%. Esses dados estão resumidos na tabela 10.

Em contraste com Calcutta 4, um maior leque de *repeats* foram observados em Cavendish, apresentando *repeats* de di-a-nona nucleotídeos. Tal como no caso de Calcutta 4, os trinucleotídeos foram os mais abundantes (57,6%). Esses foram seguidos, em frequência decrescente, pelos di-(25,3%), tetra-(7,1%), penta-(3,5%), hexa-(4,7%), hepta-(0,6%), octo-(0,6%) e nonanucleotídeos (0,6%). Os trinucleotídeos CTC, AGA, TTC, AAG, GAA, GGA, e TCT representam 50,0% desse *repeat*. Os motivos GA, AG, CT, e CT, comuns em Calcutta 4, representaram 88,4% dos dinucleotídeos. Os motivos dos *repeats* tetra- estavam todos presentes em igual abundância (8,3% cada). Os motivos penta e hexa-nucleotídeo estavam igualmente presentes em cada, com igual abundância por classe, sendo 16,7% e 12,5%, respectivamente. No caso dos hepta-, nona- e octanucleotídeos, apenas um tipo de motivo por classe foi observado. Esses dados estão resumidos na tabela 10. A análise dos SSRs originados dos clones de BAC apresentou o motivo dinucleotídeo como sendo mais abundante (46,34%), seguido pelo tri-(29,26%), tetra-(12,19%), penta-(7,31%), hexa-(2,43%) e nonanucleotídeo (2,43%). Os *repeats* mais abundantes foram os dinucleotídeos AG, TA, CT, e AT (7,31% cada). Em contrapartida, todos os motivos trinucleotídeos foram iguais em abundância (7,31% cada). Os dados resumidos referentes ao padrão dos *repeats* dos SSRs originados dos BACs podem ser vistos na tabela 10.

Tabela 10 - Distribuição dos SSRs derivados dos ESTs (Calcutta 4 e Cavendish) e dos BACs

Repeats - Calcutta 4	Total	Repeats - Cavendish	Total	Repeats - BACS	Total
GA	9	GA	17	AG	3
AG	8	TC	8	TA	3
TC	8	AG	7	AT	3
CT	8	CT	6	CT	3
AT	3	AT	3	GA	2
TA	3	CA	1	TC	2
AC	1	TG	1	TG	1
CA	1	CTC	10	CA	1
GT	1	AGA	8	AC	1
GAA	8	TTC	7	ATA	1
CTC	7	AAG	6	CAT	1
AAG	6	GAA	6	AAT	1
AGA	5	GGA	4	TAC	1
CCT	4	CCT	4	TCT	1
CAG	4	TCT	4	TTA	1
GAG	4	CAG	3	TAT	1
GAT	4	CGC	3	GAA	1
CAC	4	GCG	3	GAT	1
AGG	3	TTA	3	AAC	1
CTT	2	CCG	2	CTT	1
TTC	2	TCC	2	ATG	1
CCG	2	AGG	2	ATAC	1
TCT	2	TCA	2	ATTT	1
CCA	1	GAG	2	GAAA	1
CGG	1	AGC	2	AATG	2
GCC	1	TGA	2	ATTTT	2
GTG	1	TGC	2	TTTAT	1
GCA	1	TGG	2	GAAAAA	1
CGC	1	CAT	2	TGTTTCATCA	1
ATG	1	CCA	2		
GGA	1	CGG	1		
TGG	1	CTT	1		
TCG	1	GTA	1		
ACC	1	CTA	1		
AGC	1	GGT	1		
GAC	1	GCC	1		
CAT	1	GAT	1		
TGA	1	GTG	1		
GAGG	2	GCT	1		
TCTT	1	TAA	1		
TAAT	1	GAC	1		
GAAA	1	CTG	1		
TTTC	1	AGT	1		

AAGA	1	TCG	1
TTCG	1	GCA	1
CCGC	1	GAAA	1
TTGGG	1	AGAA	1
GAGAG	1	GAGG	1
CACTC	1	TAAT	1
GGACGA	1	CGAT	1
CCCTTC	1	TTCC	1
TCTCCA	1	GAGC	1
CCTCTT	1	CTTC	1
AATGGC	1	TATT	1
GAAGAG	1	CCGC	1
CTCCGC	1	CTGC	1
		AAAT	1
		TCATT	1
		ACTTG	1
		CTCTC	1
		CTACA	1
		TTCCC	1
		ATCTG	1
		GATCCC	1
		AGGCGA	1
		CTCCGC	1
		TTTTTA	1
		ATGCTC	1
		CGAAGC	1
		GACGGC	1
		GCCGCT	1
		CTCGCTG	1
		ATCTCTCC	1
		GAGGAAGAAGA	1

3.6 Caracterização dos marcadores microssatélites derivados das sequências BAC de *M. acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4

Foram desenhados 41 pares de *primers* SSR a partir de sequências BAC de *M. acuminata* subsp. *burmannicoides* var. Calcutta 4. Vinte dos 33 pares de *primers* SSR derivados do sequenciamento de clones de BACs e testados apresentaram-se polimórficos entre os 20 indivíduos contrastantes às Sigatokas Negra e Amarela (Tabela 11). O número de alelos polimórficos variou de dois a cinco. Os valores de heterozigosidade calculados pelo GDA (LEWIS & ZAYKIN 2001) e pelo FSTAT (GOUDET, 2001) variaram de 0,31 a 0,75. Treze locos (MABN 09, MABN 12, MABN 14, MABN 16, MABN 18, MABN 21, MABN 24, MABN 31, MABN 33, MABN 37, MABN 38, MABN 39, MABN 40) apresentaram-se monomórficos entre os indivíduos de *M. acuminata* testados. Doze locos desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$ – Teste exato de Fisher), possivelmente como resultado da amostragem, inversões cromossômicas ou alelos nulos. Fenômenos potencialmente responsáveis pelos alelos nulos incluem mutações pontuais, divergência na sequência nos sítios de anelamento de *primers* ou amplificação de alelo preferencial durante PCR. Nos testes para verificar o desequilíbrio de ligação (FSTAT $P < 0,01$ com correção do teste de Bonferroni), não foi detectado desequilíbrio entre as combinações dos pares de locos. (Passos *et al.*, em submissão) (Apêndice A).

Tabela 11 - Características dos locos microssatélites polimórficos originados de *M. acuminata* Calcutta 4 e testados em 20 indivíduos de *M. acuminata*, contrastantes em resistência à Sigatoka Negra e Sigatoka Amarela. T_a , temperatura de anelamento; N_a , número de alelos por loco observado; H_E , heterozigosidade esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_O , heterozigosidade observada; $H-W$, P value ($P < 0.05$) para o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg; F_{IS} , coeficiente de endogamia.

Locos	ID da sequência consenso	Nº de acesso -		Sequência do Primers (5' – 3')	Tamanho do alelo obtido (pb)	T_a (°C)	N_a	H_E	H_O	$H-W$	f
		GenBank	Repeat		(Min. e Max)						
MABN 01	MA4_BAC008L021	AC186748	(AG)12	F: CCACTGAAGCTGAAAGGAGG R: GGATTGTAGGTGACGGGAGA	500-540	56	3	0.667828	0.875000	0.021000*	-0.292639
MABN03	MA4_BAC008L021	AC186748	(TG)10	F: TGGTTGTATGTTTCTGGGA R: CAAAGTGCTGGCATGAGAAA	500-545	60	3	0.593590	0.850000	0.013500*	-0.448430
MABN 06	MA4_BAC008L021	AC186748	(ATAC)3	F: GCAACCATCAACCAAAAACC R: TTTGCAAGAAAATCGTGCTG	344-360	58	3	0.444872	0.200000	0.013500*	0.556851
MABN 07	MA4_BAC008L021	AC186748	(ATA)6	F: TTTTGATCATCATATGGGTCG R: AGAGGGAGAGCCAAAGTGGT	500-540	60	2	0.344948	0.428571	0.512000	-0.250000
MABN 08	MA4_BAC008L021	AC186748	(GA)13	F: TTACCGTAAACGGAGCCAAC R: GAAATCGAGAAAACCGACA	260-290	58	3	0.637631	1.000000	0.000000*	-0.590909

MABN 13	MA4_BAC111B014	AC186954	(CA)6	F: CCTCAACGAAGCATACAGCA R: CAGTCTGGGCTGACACAGAA	210-240	58	2	0.450980	0.647059	0.106500	-0.454545
MABN 15	MA4_BAC111B014	AC186954	(ATTTT)3	F: CCAACTTCCATTTGGCTTTT R: CGCAGGCGACTTCTTACAGT	490-520	58	2	0.315912	0.380952	1.000000	-0.212121
MABN 17	MA4_BAC111B014	AC186954	(TCT)14	F: CCCATGCAACTACAACAACG R: GGAACCACGTGTCCTGATCT	200-245	60	4	0.732804	1.000000	0.125000	-0.384030
MABN 19	MA4_BAC106O017	AC186747	(TTTAT)3	F: CTCACCGCTGCAAATTAT R: TTCATTTGATTGGAAAGTGAA	330-380	60	4	0.750794	0.944444	0.003000*	-0.267544
MABN 20	MA4_BAC106O017	AC186747	(AC)7	F: AAGAAGTGCAACAGATGGGC R: GCCAAAGGAATCATGCTGTT	344-380	56	3	0.537179	0.550000	0.727500	-0.024510
MABN 22	MA4_BAC106O017	AC186747	(AG)6	F: GTCGCAGAGATCAAGGAACC R: GGACCTCCTATGTTTGCTGC	490-510	58	2	0.507549	0.619048	0.392000	-0.226415
MABN 23	MA4_BAC106O017	AC186747	(TTA)4	F: TCGATCATTTGGCATCACAT R: CCAGGTAGCGAAGACGAGAC	350-500	60	4	0.723577	0.952381	0.015500*	-0.326700

MABN 25	MA4_BAC106O017	AC186747	(TAT)9	F: TTTCATGATTTGAGGAGCCC R: CCCACAAGTATGTTCCAC	380-410	58	2	0.462304	0.684211	0.049500*	-0.500000
MABN 26	MA4_BAC106O017	AC186747	(CT)24	F: GTGGGAACATACTTGTTTTGGG R: ACGGAAAACCACAAGCAATC	375-395	58	2	0.493612	0.047619	0.000000*	0.905660
MABN 27	MA4_BAC106O017	AC186747	(GAA)4	F: GGATGCAAAGACGGACAAAT R: TAATGGCTTTGCAACTGCTG	470-520	58	3	0.667828	0.714286	0.000000*	-0.071429
MABN 28	MA4_BAC106O017	AC186747	(GA)23	F: TGGAGGTCTCAACCAAACC R: AGATTGGCTACTGTGGGTGG	390-410	60	2	0.480769	0.550000	0.639500	-0.148352
MABN 29	MA4_BAC106O017	AC186747	(GAT)5	F: ACCAGCCACTGGAATCAAAC R: GTCTGCTGAAGAGCCCAAACC	350-385	60	3	0.600000	0.866667	0.069000	-0.467742
MABN 30	MA4_BAC106O017	AC186747	(ATTTT)3	F: CAGCCGTTGATGTTCAAATG R: CGTTACGGTGGATCGTCTTT	360-380	60	2	0.387097	1.000000	0.000500*	1.000000
MABN 34	MA4_BAC106O017	AC186747	(CT)18	F: TAGGTGAGAATGGGACGGAG R: CAGTAGCAGCAACCTGGTGA	330-355	58	3	0.661451	0.368421	0.000000*	0.449782

MABN 35	MA4_BAC106O017	AC186747	(CT)14	F: CTGTCACCAGGTTGCTGCTA	270-320	56	4	0.664103	0.450000	0.005500*	0.328094
				R: CTCCTTGGACTTTCATCG							

3.7 Otimização e validação dos *primers* SSR originados de sequências dos ESTs e BACs

Um total de 303 pares de *primers* foram desenvolvidos a partir de sequências dos ESTs, sendo 133 originados de sequências de *M. acuminata* Calcutta 4 (Apêndice D) e 170 de *M. acuminata* Cavendish Grand Naine (Apêndice E). A incidência global de SSRs nos ESTs analisados foi de 2,4% em C4 e 3,3% em CAV. Em ambos os cultivares, a maioria dos microssatélites apresentou *repeats* di e trinucleotídeos.

Através do processo de otimização dos *primers* gerados a partir dos ESTs e dos BACs, um total de 134 pares *primers* foram otimizados. Nas tabelas 12 e 13 estão indicados todos os pares de *primers* otimizados.

Tabela 12 - Características dos *primers* otimizados, derivados dos BACs.

Nome do <i>Primers</i>	Temperatura de Anelamento (°C)	Tam. obtido (pb) após PCR	Tam. esperado (pb) teórico
MABN1F/R	54	500	525
MABN5F/R	56	500	506
MABN8F/R	56	298	358
MABN20F/R	56	344	443
MABN33F/R	56	500	514
MABN35F/R	56	220	296
MABN6F/R	58	344	363
MABN11F/R	58	396	470
MABN12F/R	58	200	457
MABN13F/R	58	220	222
MABN14F/R	58	200	232

MABN15F/R	58	500	547
MABN16F/R	58	344	547
MABN21F/R	58	500	488
MABN22F/R	58	500	507
MABN24F/R	58	396	527
MABN25F/R	58	396	378
MABN26F/R	58	396	425
MABN27F/R	58	500	389
MABN31F/R	58	500	545
MABN34F/R	58	344	471
MABN38F/R	58	500	487
MABN3F/R	60	500	503
MABN7F/R	60	500	475
MABN9F/R	60	500	546
MABN17F/R	60	220	261
MABN18F/R	60	500	543
MABN19F/R	60	344	536
MABN23F/R	60	500	504
MABN28F/R	60	396	487
MABN29F/R	60	396	533
MABN30F/R	60	396	411
MABN37F/R	60	220	295
MABN39F/R	60	500	539
MABN40F/R	64	396	421

(Os *primers* de *Musa* – MABN foram obtidos a partir de sequências de BACs de *M. acuminata* Calcutta 4. Os *primers* MASR foram obtidos a partir de sequências de ESTs de *M. acuminata* Calcutta 4. As temperaturas de anelamento estão organizadas em ordem crescente, com tamanho de fragmentos (em pares de bases) esperados e obtido durante as ampliações).

Vinte *primers* derivados de seqüências de ESTs apresentaram-se polimórficos, evidenciando 3,65 alelos/loco, e 31 apresentaram amplificação de um fragmento, evidenciando monomorfismo (Tabela 13).

Tabela 13 - Relação de *primers* de *Musa* otimizados em ordem crescente de nomenclatura – obtidos de seqüências de ESTs. Relacionando as respectivas temperaturas de anelamento (TA) e tamanhos dos fragmentos em pares de base (pb) obtido e esperado, observados durante as amplificações da otimização e certificados com os fragmentos obtidos no desenho dos *primers*. Os 20 *primers* em negrito apresentaram-se polimórficos evidenciando 3,65 alelos/loco, e 31 apresentaram amplificação de um fragmento, evidenciando monomorfismo.

Iniciador	T. A. (°C)	Tam. Obtido (pb)	Tam. Esperado (pb)
MASR2F/R	58	<200	86
MASR14F/R	56	298	335
MASR17F/R	60	200	123
MASR22F/R	60	220	190
MASR41F/R	60	<298	269
MASR45F/R	58	200	190
MASR55F/R	60	<298	270
MASR57F/R	58	344	342
MASR67F/R	58	200	107
MASR89F/R	58	396	347
MASR98F/R	58	344	309
MASR109F/R	58	298	308
MASR125F/R	60	200	207
MASR 196 F/R	56	390	331
MASR 197 F/R	56	75	93
MASR 198 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	312
MASR 199 F/R	56	130	122
MASR 200 F/R	56	140	144
MASR 201 F/R	56	142	147

MASR 202 F/R	56	220	214
MASR 203 F/R	58	80	188
MASR 204 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	274
MASR 205 F/R	56	200	129
MASR 206 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	204
MASR 207 F/R	56	-	290
MASR 208 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	243
MASR 209 F/R	56	550	298
MASR 210 F/R	58	500	253
MASR 211 F/R	54	252	193
MASR 212 F/R	56	340	218
MASR 213 F/R	56	270	161
MASR 214 F/R	56	150	121
MASR 215 F/R	56	150	125
MASR 216 F/R	56	270	221
MASR 217 F/R	56	220	165
MASR 218 F/R	56	225	81
MASR 219 F/R	56	390	312
MASR 220 F/R	56	-	255
MASR 221 F/R	56	220	188
MASR 222 F/R	56	230	175
MASR 223 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	350
MASR 224 F/R	56	200	86
MASR 225 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	178
MASR 226 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	215
MASR 227 F/R	58	250	140
MASR 228 F/R	56	170	160
MASR 229 F/R	56	330	274

MASR 230 F/R	58	100	290
MASR 231 F/R	56	250	279
MASR 232 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	136
MASR 233 F/R	56	205	160
MASR 234 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	120
MASR 235 F/R	56	250	208
MASR 236 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	144
MASR 237 F/R	56	200	145
MASR 238 F/R	56	200	175
MASR 239 F/R	56	395	219
MASR 240 F/R	56	150	126
MASR 241 F/R	58	100	159
MASR 242 F/R	56	300	211
MASR 243 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	214
MASR 244 F/R	56	768	276
MASR 245 F/R	56	200	174
MASR 246 F/R	56	390	268
MASR 247 F/R	56	270	262
MASR 248 F/R	60	100	244
MASR 249 F/R	54	170	174
MASR 250 F/R	56	154	106
MASR 251 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	307
MASR 252 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	163
MASR 253 F/R	56	350	322
MASR 254 F/R	56	210	192
MASR 255 F/R	56	196	208
MASR 256 F/R	54	80	141
MASR 257 F/R	54	75	283

MASR 258 F/R	60	150	168
MASR 259 F/R	54	170	176
MASR 260 F/R	56	201	154
MASR 261 F/R	56	210	161
MASR 262 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	287
MASR 263 F/R	54	130	116
MASR 264 F/R	54	730	252
MASR 265 F/R	56	275	216
MASR 266 F/R	56	350	316
MASR 267 F/R	56	500	292
MASR 268 F/R	56	730	152
MASR 269 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	246
MASR 270 F/R	56	250	180
MASR 271 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	309
MASR 272 F/R	Várias (40-60)	não amplificou	93
MASR 273 F/R	56	210	138
MASR 274 F/R	56	200	142
MASR 275 F/R	58	400	289
MASR 276 F/R	54	70	311
MASR 277 F/R	54	130	132
MASR 278 F/R	56	210	86
MASR 279 F/R	54	70	250
MASR 280 F/R	56	150	162
MASR 281 F/R	54	320	82
Total de iniciadores	99		

* Negrito – *Primers* polimórficos

Até o momento foram encontrados 40 locos microssatélites polimórficos, sendo 20 locos originados de sequências oriundas de BACs e 20 originados a partir de sequências de ESTs. Esses locos foram testados em 20 cultivares diplóides contrastantes para a resistência às Sigatokas negra e amarela, (tabela 1), e em 2 indivíduos da F1 gerados do cruzamento entre os cultivares “Calcutta 4” (resistentes às Sigatokas negra e amarela) e “Psang Berlin” (suscetível às Sigatokas negra e amarela).

3.8 PCR eletrônico

Essa ferramenta foi desenvolvida para proporcionar uma aplicação eficaz da presente estratégia de pesquisa baseada numa moderna análise do genoma. Com o desenvolvimento de novos marcadores para estudos de mapeamento, o e-PCR pode ser usado para testar potenciais iniciadores de várias formas antes da síntese dos oligonucleotídeos (SCHULER, 1997). Nenhum dos *primers* SSR testados com esta ferramenta anelou com as sequências de *M. acuminata* disponíveis em bancos de dados, mostrando que os locos gerados neste estudo são novos locos SSR.

4 DISCUSSÃO

O melhoramento genético da banana permanece ainda limitado em comparação com outras grandes culturas alimentares, apesar da importância desse fruto como alimento para os países em desenvolvimento. A propagação vegetativa tem sido a base da evolução dessa cultura, fazendo com que a variação genética seja reduzida, resultando na falta de uma cultura resistente a estresses bióticos. Uma maior compreensão das respostas de resistência e defesa em *Musa* torna-se necessária para proporcionar novas oportunidades para o melhoramento genético. Foi descrito, neste trabalho, a caracterização de genes expressos em cultivares de *M. acuminata* contrastantes em resistência à Sigatoka Negra (BLS) em fases diferentes durante a infecção pelo patógeno. Pelo seu potencial como doador de R-genes, o genótipo diplóide selvagem *M. acuminata* Calcutta 4 foi escolhido como um modelo. Em contrapartida, *M. acuminata* Cavensish Grande Naine representou um cultivar comercial susceptível à Sigatoka Negra. A partir deste trabalho, foram encontrados genes diferencialmente expressos envolvidos na defesa e respostas a estresse, e novos marcadores microssatélites foram desenvolvidos e caracterizados por polimorfismo. O sequenciamento de ESTs realizado gerou 5.507 *reads* de alta qualidade originados da biblioteca de cDNA de *M. acuminata* Calcutta 4. No caso da biblioteca de cDNA de *M. acuminata* Cavendish Grande Naine, de 7.680 clones iniciais, 68,40% referem-se a *reads* de alta qualidade. Foram produzidos 2.614 *clusters* a partir do sequenciamento dos ESTs de *M. acuminata* Calcutta 4, compostos de 491 *contigs* e 2.123 *singletons*, com um percentual de 47,5% de novidade. Em *M. acuminata* Cavendish Grande Naine, 2.904 *clusters* foram montados, contendo 541 *contigs* e 2.363 *singletons*, sendo que a proporção de novidade foi de 55,7%. Foram identificados 220 genes diferencialmente expressos em comum entre as bibliotecas infectadas após as análises *in silico*, sendo que, destes, 80 genes mostraram-se expressos diferencialmente entre as bibliotecas infectadas. Dentre esses genes diferencialmente expressos, vinte e quatro genes estão potencialmente envolvidos em respostas de plantas contra ataque de patógenos, além da identificação de doze genes *No hits*. Outros trabalhos têm sido publicados buscando contribuir para o melhoramento genético da banana. Van den Berg et al. (*in press*) recentemente caracterizou a expressão de genes candidatos a defesa em cultivares de *M. acuminata*

contrastantes em resistência e infectados com *F. oxysporum* f. sp. cubense raça 4. Quatro genes relacionados com defesa- catalase 2, pectina acetylesterase (PAE), PR-1 e PR-3- foram diferencialmente expressos no cultivar resistente. Em relação aos marcadores, vários microssatélites têm sido utilizados em estudos de *Musa* (CRESTE et al., 2004; CROUCH et al., 1998; CHEUNG & TOWN, 2007; e KAEMMER et al., 1997). Vários *primers* flanqueando regiões do DNA que contêm microssatélites já foram gerados e estão disponíveis para estudos com banana (LAGODA et al., 1998; CROUCH et al., 1998). Além disso, locos microssatélites já foram caracterizados e identificados a partir de bibliotecas enriquecidas de *M. acuminata* (CRESTE et al., 2006) e *M. balbisiana* (BUHARIWALLA et al., 2005).

4.1 Análise *in silico* da expressão diferencial

Dos 25 genes expressos diferencialmente relacionados com resistência ou defesa de plantas, 7 referem-se a metalotioneínas, todas do tipo 3 (MT3), como demonstrado na Tabela 7. Três genes referentes à MT3 (CL1Contig4, CL1Contig9, CL1Contig17) foram mais expressos no cultivar resistente infectado (Cavendish 4), enquanto que quatro genes referentes à MT3 (CL1Contig14, CL1Contig13, CL1Contig16, CL1Contig10) foram mais expressos no cultivar susceptível (Cavendish). Metalotioneínas (MTS) são pequenos polipeptídeos com porcentagem elevada (20-30%) de resíduo de cisteína (Cis). Essas proteínas são onipresentes em procariotos e eucariotos e acredita-se que desempenham um papel importante na desintoxicação por metal e homeostase, devido à sua capacidade de sequestro de íons metálicos, como Cu²⁺, Zn²⁺ e Cd²⁺, com a finalidade de prevenir mutações celulares (HAMER, 1986; ROBINSON et al., 1993). Em leveduras, a tolerância ao metal tem sido associada com a amplificação de genes da MT, enquanto que um mutante deficiente em MT manifesta hipersensibilidade a uma elevada concentração de cobre (HAMER et al., 1986). Plantas também aumentaram a expressão das MTs em resposta a níveis elevados de metais (ZHOU e GOLDSBROUGH, 1994; HSIEH et al., 1995). Este fenômeno tem sido considerado como parte do mecanismo de defesa contra metais. Além de metais, a abundância de transcrição dos

genes da MT pode ser induzida por outros fatores, incluindo choque térmico (HSIEH et al., 1995), abscisão foliar (COUPE et al., 1995), fermento e infecção por vírus (CHOI et al., 1996) e senescência foliar (BUCHANAN-WOLLASTON, 1994). Contudo, o papel fisiológico do MTs nestes processos não é claro. As MTs de plantas são divididas em quatro tipos (MT1, MT2, MT3 e MT4) de acordo com a distribuição dos resíduos de cisteína (ROBINSON et al., 1993). Liu et al. (2002) relataram o isolamento e a caracterização de três membros (MT2A, MT2B e MT3) da família gênica da MT da banana. Além disso, demonstraram que a expressão de MT em banana é regulada diferencialmente em resposta ao etileno e a metais. Tecidos vasculares e raízes são onde os genes da MT1 são mais expressos, enquanto que os genes da MT2 são expressos principalmente nas folhas e nos brotos (ZHOU, 2003). As do tipo 3 são expressas em folhas e em frutos maduros (LEDGER & GARDNER, 1994). Já as MTs do tipo 4 são expressas apenas em sementes (GUO et al., 2003).

Outra classe de genes diferencialmente expressos inclui *germin-like protein* (GLPs). Esses genes identificados mostraram-se mais expressos em Calcutta 4. O GLP é uma família grande e um grupo de proteínas bastante heterogêneo, com identidade de aminoácidos entre os diferentes membros da família indo desde baixa como 25% a quase 100% (BERNIER & BERNA, 2001). Esses genes já foram identificados em *Arabidopsis* (CARTER & THORNBURG, 1999; CARTER et al., 1998) em *Hordeum vulgare* (DRUKA et al., 2002, WU et al., 2000; KHURI et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2006) e em arroz (MEMBRE & BERNIER, 1998). Embora as funções de todos GLPs ainda têm de ser demonstradas, algumas foram identificadas como superóxido dismutase (por exemplo, CARTER & THORNBURG, 2000, CHRISTENSEN et al., 2004), e pode conferir proteção às células vegetais contra o patógeno quando induzida por estresse oxidativo. A produção do superóxido tem sido relatada em resposta ao ataque do patógeno (BOLWELL & WOJTASZEK, 1997). O processo de dismutação via superóxido dismutase pode então permitir acúmulo de H₂O₂. Há indícios que essa molécula desempenhe um papel importante na parede celular e exerça atividade como mensageiro para a ativação de genes de defesa, desencadeando SAR. Também relataram que essa molécula é necessária para a biossíntese de fitoalexinas, sendo que o H₂O₂ tem atividade antimicrobiana, causando oxidação dos patógenos invasores (WEI et al., 1998). Embora as funções de GLPs não são claramente compreendidas, algumas foram identificadas como superóxido dismutase em hospedeiros, como a cevada, e pode conferir proteção às células vegetais contra o patógeno, induzidas por estresse oxidativo (KHURI et al., 2001). Em

cevada, cultivares resistentes também foram relatadas expressando diferencialmente germin-like protein, quando comparados aos cultivares suscetíveis (GJETTING et al., 2004). Transcritos relacionados com defesa também podem ser suprimidos em interações compatíveis em fases posteriores da infecção, quando comparadas com interações incompatíveis (GREGERSEN et al., 1997), o que parece ser o caso em nosso estudo com *Musa*, com baixa expressão apenas em Cavendish Grande Naine. Trabalhos recentes com superexpressão e silenciamento de RNA interferente tanto com o GLP TaGLP4 do trigo quanto com o GLP HvGER4 da cevada demonstraram aumento e redução da resistência à resistência, respectivamente, contra *Blumeria graminis* (CHRISTENSEN et al., 2004). Perante tais resultados, os genes candidatos mostram-se como promessas estratégias moleculares futuras para controle do fungo patogênico.

O gene referente à ferredoxina também foi identificado como sendo mais expresso no cultivar resistente. Em tomateiro, essa ferredoxina demonstra ter um papel na resistência ao tospovírus interagindo com a proteína Sw-5. Assim, é possível que esta proteína participe do processo de alteração do potencial redox da célula, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e ativação de morte celular programada que caracterizam a resposta de hipersensibilidade mediada pelo gene Sw-5 (ALMEIDA, 2006).

A *glutathione S-transferase* (GST) foi identificada com um acúmulo maior no cultivar susceptível Cavendish. As GSTs parecem estar onipresentes nas plantas, com uma função primária de desintoxicação dos compostos endógenos e xenobióticos, tais como herbicidas (MARRS, 1996; ARMSTRONG, 1997; HAYES & MCLELLAN, 1999). Embora pouco se saiba sobre outras funções biológicas da GST, há algumas evidências de que a GST também possa ser induzida pelo ataque de patógenos e metais pesados. Essa proteína possui a capacidade de metabolizar os compostos tóxicos em muitas plantas como o milho (EDWARDS & OWEN, 1986), trigo (JABLONKAI & HATZIOS, 1991; MAUCH & DUDLER; ROMANO et al., 1993; EDWARDS & COLE; RIECHERS et al., 1996; RIECHERS et al., 1997), tabaco (DROOG et al., 1995), anão pinho (SCHRODER & RENNENBERG, 1992), soja (ULMASOV et al., 1995; ANDREWS et al., 1997), *Arabidopsis thaliana* (REINEMER et al., 1996), cevada (ROMANO et al., 1993, WOLF et al., 1996), *Setaria* spp. (WANG & DEKKER, 1995), cravo (MEYER et al., 1991), batata (HAHN & STRITTMATTER, 1994), grão de bico (HUNATTI & ALI, 1990; 1991), sorgo (GRONWALD et al., 1987; DEAN et al., 1990) e cana (SINGHAL et al., 1991). GSTs

também foram identificadas com expressão diferencial em resposta a diversos estresses bióticos e abióticos (WAGNER et al., 2002). Nossos dados mostraram um aumento da expressão diferenciada na interação compatível durante as fases posteriores da infecção. Esse tipo de regulação também tem sido relatada em *Arabidopsis* (WAGNER et al., 2002). O papel potencial do GSTs em vias de sinalização celular também tem sido sugerido, com uma GST de salsa envolvida na transdução de sinal dependente de UV (LOYALL et al., 2000).

Outro gene que se apresentou mais expresso no cultivar susceptível foi o gene da *Translationally - controled tumor protein homolog* (TCTP). É uma proteína altamente conservada, expressa abundantemente em mamíferos, bem como em outros organismos, tanto do reino animal e vegetal, participando de respostas à infecções (CHEN et al., 2007). O gene do inibidor da cisteína proteinase encontra-se mais expressa no cultivar resistente. Cisteínas proteinases surgiram como enzimas-chave na regulação da morte celular programada (PCD). Então, esse inibidor participa diretamente do processo de defesa da planta. Solomon et al. (1999) sugeriram que a PCD da planta pode ser regulada pelas atividades realizadas entre a cisteína proteinases e seus inibidores, sendo que tais inibidores desempenham um papel como moduladores da PCD em plantas.

O gene das *Pathogenesis-Related Proteins* (PRPs) apresentaram um acúmulo maior no cultivar susceptível infectado. Tais proteínas participam do fenômeno de resistência sistêmica adquirida (SAR), que está ligada ao aumento da expressão de genes que codificam essas proteínas. As PRs proteínas foram inicialmente identificadas no tabaco (van LOON et al., 1970). O seu acúmulo é altamente identificado hoje em dia, sempre relacionado a ataques de patógeno. A expressão desse gene tem conferido ou aumentado a resistência de diversas culturas como o tabaco (ALEXANDER et al., 1993), arroz (LIN et al., 1995; LIU et al., 2004), tomate (TABAEIZADEH, 1997), uva (YAMAMOTO et al., 2000) e maçã (CHAVALIER et al., 2008). Neste último caso, a PR-10 é altamente expressa após a inoculação com fungos patogênicos, demonstrando sua participação no processo de defesa dessa planta. Existem 15 classes de proteínas PR (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-6, PR-7, PR-8, PR-9, PR-10, PR-11, PR-N, PR-12, PR-13, PR-14), sendo que a PR-10 foi a identificada neste presente estudo.

A *thioredoxin* foi expressa em maior quantidade nas folhas de Cavendish inoculadas com o patógeno *M. fijiensis*. A thioredoxin possui uma atividade na regulação da resistência

às doenças em plantas, tendo sido primeiramente identificada em tomate (RIVAS et al., 2004). Em células vegetais, o cálcio é um íon envolvido em inúmeras vias de sinalização, atuando como mensageiro secundário. Variações na concentração citosólica de Ca^{2+} gera uma grande variedade de sinais e de respostas. O cálcio atua como um sinalizador no processo de resposta de defesa em plantas. *Cálcio-binding proteins* participam da geração do sinal do cálcio, contribuindo, assim, para a elaboração das respostas de defesa (LECOURIEUX et al., 2006)

Dentre os genes diferencialmente expressos, a proteína disulfide isomerase, que é conhecida como um componente da transdução de sinal, obteve um acúmulo nas folhas do cultivar suscetível inoculado com *M. fijiensis*. Ray et al. (2003) foram os primeiros a demonstrar a participação dessa proteína na resposta de defesa de uma planta ao ataque de um patógeno. A expressão dessa proteína foi induzida após a interação do trigo com o fungo patogênico *Mycosphaerella graminicola*, pertencente ao mesmo gênero da *M. fijiensis*. Portanto, esta proteína torna-se uma candidata para futuros estudos de resposta de defesa da banana ao estresse biótico.

O gene da proteína *Glycolate oxidase* apresentou um acúmulo nas folhas do cultivar resistente (Calcutta 4) inoculadas com o patógeno. Essa proteína confere resistência a melões contra o ataque do patógeno *Pseudoperonospora cubensis*, que causa uma devastação foliar nessa cultura. Essa enzima é codificada pelos chamados eR genes (genes da resistência enzimática). Meloeiros transgênicos superexpressando esses genes possuem uma notável resistência ao *P. cubensis* (TALER et al., 2004).

A expressão do gene da *RNA binding protein* foi maior na biblioteca susceptível infectada. Em estudos com tabaco infectados com o vírus do mosaico do tabaco, já foi demonstrado que essa proteína apresenta um papel sugestivo na interação planta-patógeno (NAQVI et al., 1998). A calmodulina está provavelmente envolvida na defesa contra agentes patogênicos de maneira independente da sinalização do ácido jasmônico e do etileno de acordo com estudos feitos também em tabaco (TAKABATAKE et al., 2007). Nessa presente análise *in silico*, a calmodulina apresentou-se mais expressa na biblioteca do cultivar Cavendish.

A *Protein Kinase domain containing protein*, ou seja, proteína contendo o domínio da proteína Kinase, foi outro gene diferencialmente expresso que possui envolvimento com resistência de plantas a ataques de patógenos. Houve um acúmulo dessa proteína no cultivar

resistente Calcutta 4. O gene Xa21 de arroz que codifica uma proteína contendo o domínio Kinase tem fundamental participação na resistência do arroz a todas as raças de *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*. Outro exemplo da participação dessas proteínas na resistência das plantas é a proteína Kinase sem LRRs extracelulares codificada pelo R-gene Pto em tomate. O Pto confere resistência às estirpes de *Pseudomonas syringae pv.* (MARTIN et al., 1993), sendo que essa resistência está associada com reações de hipersensibilidade (HR) e morte celular programada (PCD).

O gene *Putative ethylene – responsive small GTP – binding protein* apresentou-se mais expresso no cultivar susceptível infectado. As proteínas codificadas por esse gene desempenham papéis críticos na transdução de sinais de mamíferos e plantas. Em arroz, o citado gene está associado a um QTL para tolerância à inundação. Os aminoácidos deduzidos após o sequenciamento desse QTL levam a essa proteína que parece responder a hormônios, tal como o etileno. Então, em arroz, o referido gene pode ser utilizado como alelo marcador para seleção assistida (RUANJAICHON et al., 2004).

Com um maior acúmulo no cultivar susceptível, o gene da *superoxide dismutase* (SOD) é um gene que possui efeitos menores no mecanismo de resistência. Esse gene está envolvido nos mecanismos celulares de inibição das espécies ativas de oxigênio (EAO). Duke (1983) demonstrou o envolvimento da superoxide dismutase na resposta em batatas infectadas com *Phytophthora infestans*. Essa proteína está geralmente ligada a um metal (Cu/Zn, Mn/Fe). As plantas normalmente apresentam Cu/Zn-SOD no citosol, Cu/Zn e/ou Fe-SOD no cloroplasto e Mn-SOD na mitocôndria. O gene identificado neste estudo está representado pela forma Cu/Zn.

O gene *Putative stress enhanced protein* também mostrou-se mais presente nas folhas de Cavendish (cultivar susceptível). As proteínas codificadas por esse gene têm uma participação na defesa da planta após serem induzidas por algum stress. Uma rápida indução de defesa, por meio da ativação de uma cascata de sinais, relacionada com estresse mediada por proteínas em folhas de arroz (*Oryza sativa*), foi demonstrada (AGRAWAL et al., 2002).

Outro gene mais expresso na biblioteca de folhas do cultivar Cavendish infectadas foi o da *Auxin – repressed protein like (arp)*, ou seja, proteína reprimida por auxina. A expressão desse gene está ligada a respostas a estresse, tanto biótico quanto abiótico. No caso dos estresses abióticos, Kohler et al. (2003) demonstraram a relação da expressão desse gene com o estresse hídrico. Já em relação a estresse biótico, tem-se exemplos da ativação da expressão

desse gene causada, por exemplo, por fungos (SKIBA et al., 2005; CORAM e PANG, 2006; LUO et al., 2005).

Até o momento, apenas alguns milhares de ESTs foram publicados em trabalhos com *Musa* (por exemplo, SANTOS et al., 2005; MANRIQUE-TRUJILLO et al.; XU et al., 2007), embora muitas dezenas de milhares, provavelmente, estarão disponíveis a curto prazo. Essas abordagens permitiram uma análise da expressão diferencial sob condições de estresse biótico e abiótico. O DDD realizado foi bem sucedido na identificação de genes envolvidos nos mecanismos de defesa contra patógenos, sendo que esta coleção de EST fornece uma base para posterior caracterização de respostas de resistência e defesa de *Musa* e representa um recurso público para o uso da genômica funcional.

4.2 Marcadores microssatélites

Simple sequence repeats (SSRs) são marcadores moleculares abundantes, dispersos aleatoriamente, com natureza multialélica e herança codominante. Aplicações em *Musa* têm incluído genotipagem (por exemplo, CROUCH et al., 2001; CRESTE et al., 2003, AMORIM et al., 2008, WANG et al., 2008), taxonomia (por exemplo, LAGODA et al., 1998) e construção de mapa genético (por exemplo, HIPPOLYTE et al., 2008). SSRs podem, no entanto, oferecer, também, subsídios para seleção assistida por marcadores (MAS), para definir características em programas de melhoramento, mediante identificação de uma co-localização dos SSRs com características desejáveis. Marcadores SSRs foram recentemente desenvolvidos em *M. acuminata* e *M. balbisiana* (por exemplo, CROUCH et al., 2001; BUHARIWALLA et al., 2005; CRESTE et al., 2006).

Em nosso estudo, uma série de sequências envolvidas com o processo de resistência e defesa contra doenças foram diferencialmente expressas (por exemplo, metalotioneína e *germin-like proteins*). Marcadores para tais locos podem tornar-se valiosos instrumentos para estudos de associação doença-resistência em *Musa* sp. A incidência global de SSRs nos ESTs analisados foi de 2,4% em C4 e 3,3% em CAV. Em ambos os cultivares, a maioria dos microssatélites apresentou *repeats* di- e trinucleotídeos. O desenvolvimento de bibliotecas

genômicas enriquecidas normalmente é caro e de trabalho intensivo, o que incentiva o incremento dos bancos de ESTs. Marcadores SSR derivados de ESTs podem ser uma ferramenta atraente, uma vez que estes podem ser utilizados para enriquecer mapas genéticos em regiões gênicas. Os marcadores gerados no presente estudo mostram considerável polimorfismo entre indivíduos de *M. acuminata* contrastantes em resistência às doenças da Sigatoka, oferecendo ferramentas eficazes para um futuro mapeamento de QTLs.

Com outros *primers* que flanqueiam os microssatélites já otimizados, os tornam hábeis para serem utilizados em análises posteriores da genética de *Musa*, com os SSRs servindo para saturar mapas genéticos. Além disso, novos genótipos resistentes poderão ser desenvolvidos. É importante salientar que em cada mapa genético novo é necessário possuir muitos marcadores candidatos para que se consiga identificar marcadores polimórficos nos parentais. Os resultados destes estudos poderão contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de resistência em *Musa*, e, com o desenvolvimento de marcadores funcionais, vários outros programas de melhoramento poderão ser favorecidos.

4.3 Modelagem Protéica

O modelo final da proteína seq5 é composto de uma expressiva alfa-hélice e uma pequena porção de duas outras; e três folhas-beta de duas fitas cada, sendo duas paralelas e uma anti-paralela. A seq5 teve como modelo estrutural a cadeia A da proteína *Isbq*, uma ligase. Em estudos com a ubiquitina ligase, foi demonstrada a participação dessas proteínas como reguladoras do processo de defesa vegetal contra ataque de patógenos. (DEVOTO et al., 2003). O modelo final de seq11 apresenta uma pequena alfa-hélice, uma pequena folha-beta de duas fitas anti-paralelas e grande concentração de *coil*. Na modelagem de seq11, utilizou-se a cadeia A de *Ijro* como modelo. Entretanto, *Ijro* possui oito cadeias e seq11 representa apenas uma pequena fração de sua estrutura total, o que pode estar relacionado com a limitação de estruturas secundárias apresentadas no modelo final de seq11. O modelo da seq11 é uma oxidoreductase que, em estudos com *Arabidopsis thaliana* (SOMSSICH et al.,

1996) e com *Solanum tuberosum* (MONTESANO et al., 2003), fazem parte da estrutura de proteínas que estão relacionadas com a defesa dessas plantas. Já para a construção do modelo de seq7, foi necessária a utilização de dois modelos de coordenadas atômicas, *Ioed* (cadeia C) e *li3q* (cadeia C), de modo a alcançar uma maior porção da proteína modelada. Seq7 mostra três alfa-hélices bem definidas com *coil* entre elas. O modelo da seq7 é um receptor de canal iônico que parece estar envolvidos na cascata de sinais acionando a defesa contra patógeno em salsa (ZIMMERMANN et al., 1997). De forma semelhante, seq12 foi baseado nas coordenadas atômicas de *2b71* (cadeia A) e *2poe* (cadeia A), mostrando uma folha-beta com quatro fitas, todas anti-paralelas, e uma pequena alfa-hélice. Ainda é possível observar uma grande quantidade de *coil*. O seu modelo é uma isomerase, que foi identificada como um dos genes diferencialmente expressos em trigo, sendo considerada como um componente da transdução de sinal na resposta de defesa da planta (RAYS et al., 2003).

CONCLUSÃO

Esta coleção de ESTs fornece uma base para posterior caracterização das respostas de resistência e defesa em *Musa*, e representa um recurso público para os estudos da genômica funcional. Os marcadores microssatélites gerados no presente estudo mostram um número considerável de polimorfismo entre cultivares de *M. acuminata* contrastantes em resistência às doenças causadas pelo fungo patogênico *M. fijiensis*, oferecendo uma ferramenta potencialmente eficaz para um futuro mapeamento de QTL's. Além disso, a abordagem do DDD foi bem sucedida para a identificação de genes transcritos envolvidos nos mecanismos de defesa contra patógenos.

Tecnologias que trabalham com perfis de expressão gênica facilitam a elucidação de mecanismos de resistência e defesa. Dada a necessidade do desenvolvimento de resistência durável em *Musa* contra pragas e patógenos, o controle efetivo das estratégias pode proporcionar oportunidades para o melhoramento genético através da seleção assistida por marcador, do melhoramento genético e da engenharia genética.

Com relação às futuras perspectivas, umas das estratégias que poderão ser adotadas para auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos com respostas da banana contra o ataque de patógenos é o mapeamento físico (identificação de clones de BACs) com genes diferencialmente expressos potencialmente envolvidos na resposta de resistência a estresse biótico. A seleção será feita através de uso de sondas de fragmentos de genes candidatos marcados com radioatividade P^{32} e/ou via PCR e análise de 3D pools das bibliotecas de BACs. O mapeamento físico juntamente com o sequenciamento de BACs em *Musa* contribuiria para a elucidação do seu genoma, assim como a organização de genes candidatos. Com isso, proporcionariam uma base forte para a genômica comparativa, levando a um avanço nas pesquisas que buscam a localização e a clonagem dos genes de interesse da banana.

A extração do RNA total de tecidos (pseudocaule e raiz) não infectadas de *M. acuminata* Cavendish (ITC0180) e *M. acuminata* Calcutta 4 (ITC0249) será conduzida, para posterior análise da expressão gênica em tecidos por pirosequenciamento através do 454 (Roche Applied Science). Além disso, será realizado também um sequenciamento utilizando a tecnologia Solexa (Illumina), outra tecnologia inovadora de sequenciamento, a partir do RNA total extraído de folhas de cultivares contrastantes em resistência às Sigatocas (por exemplo, *M. acuminata* Calcutta e *M. acuminata* Cavendish) infectadas com o fungo *M. fijiensis*, com a finalidade de estudar essa interação patógeno-hospedeiro. Neste caso, O RNA total será extraído das folhas após 4, 24, 48 e 72 horas após a infecção *in vitro* pelo fungo, sendo que 5 plantas serão utilizadas para cada momento de infecção. O método de extração ainda será determinado após as otimizações que vem sendo realizadas. Outra aplicabilidade para o RNA total extraído é a validação da expressão diferencial dos genes candidatos a resistência e defesa contra estresse biótico identificados *in silico* através do qRT-PCR. Outra possível aplicação é a extração de proteínas para posterior análise proteômica a partir do material foliar inoculado (armazenados a -80°C).

Considerando as dificuldades para os melhoristas de *Musa*, a genômica pode ser utilizada para o descobrimento de genes de resistência para o controle de Sigatoka Negra. Genes envolvidos em resistência a *M. fijiensis* em *Musa* foram identificados neste projeto através do sequenciamento dos ESTs. Juntamente com o desenvolvimento de marcadores microssatélites ligados a resistência, eles podem ser usados, subsequentemente, em mapeamento de genes de resistência. Com isso, este projeto poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos de resistência em *Musa* e, através da geração de marcadores funcionais, potencialmente beneficiará os programas de melhoramento em *Musa* para a geração de novos genótipos resistentes.

REFERÊNCIAS

- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, et al. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Ago 1;90(15):7327-31.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997 Set 1;25(17):3389-402.
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):773-84.
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):773-84.
- Andrews CJ, Skipsey M, Townson J.K, Morris C, Jepson I, Edwards R. Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean. *Pesticide science*. 1997; 51: 213-222.
- Amorim EP, Reis RV, Santos-Serejo JA, Amorim VBO, Silva SO. Variabilidade genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2008, 43, 1045-1052.
- Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*. 1997 Jan ;10(1):2-18.
- Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*. 1997 Out ;7(10):986-95.
- Azhar M, Heslop-Harrison JS. Genomes, diversity and resistance gene analogues in *Musa* species. *Cytogenet Genome Res*. 2008 ;121(1):59-66.
- Belalcázar Carvajal, SL. El cultivo del plátano en el trópico. Cali: Impresora Feriva, 1991;367

Bennett S. Solexa Ltd. Pharmacogenomics. 2004 Jun ;5(4):433-8.

Bernier F, Berna A. Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly? Plant Physiol. Biochem. 2001;39:545-554.

Boer DR, Thapper A, Brondino CD, Romão MJ, Moura JJG. X-ray crystal structure and EPR spectra of "arsenite-inhibited" *Desulfovibrio gigas* aldehyde dehydrogenase: a member of the xanthine oxidase family. J Am Chem Soc. 2004 Jul 21;126(28):8614-5.

Bolwell GP, Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence a broad perspective. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1997 ;51:347-366.

Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R.; Grattapaglia D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. Theor. Appl. Genet., 1998. v. 97, p. 816-827.

Brunelli KR, Silva HP, Camargo LEA. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em milho. Fitopatologia Brasileira, 2002. 27:134-140.

Buchanan-Wollaston V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. Plant Physiol. 1994 Jul ;105(3):839-46.

Buhariwalla HK, Jarret RL, Jayashree B, Crouch JH, Ortiz R. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana*. Molecular Ecology Notes. 2005 ;327-330.

Burleigh S. Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas. Plant Sci. 2001 Abr ;160(5):899-904.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000 Out ;25(2):169-93.

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol. 2002 Ago ;29(1):23-39.

Canto-Canché B, Guillén-Maldonado DK, Peraza-Echeverría L, Conde-Ferrández L, James-Kay A. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of the causal agent of Black Sigatoka fungal leaf spot disease of banana and plantain, *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol Biotechnol*. 2007 Maio ;36(1):64-70.

Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Van Onckelen H, Swennen R, Panis B. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. *Proteomics*. 2007 Jan ;7(1):92-105.

Carreel F. Etude de la diversité des bananiers (genre *Musa*) à l'aide des marqueurs RFLP. Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon 1994 ;90pp.

Carter C, Thornburg RW. Germin-like proteins: Structure, phylogeny and function. *J. Plant Biol*. 1999 ;42:97-108.

Carter C, Thornburg RW. Tobacco nectarin I: Purification and characterisation as a germin-like, manganese superoxide dismutase implicated in the defense response of floral reproductive tissues. *J. Biol. Chem*. 2000 ;275:36726-36733.

Carter C, Graham RA, Thornburg RW. *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: Characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant Mol. Biol*. 1998 ;38:929-943.

Cheesman EE. Classification of the bananas. III: Critical notes on species. *Kew Bulletin*. 1950 ;5: 27-28

Chen S, Harmon AC. Advances in plant proteomics. *Proteomics*. 2006 Out ;6(20):5504-16.

Chen S, Shin D, Pufan R, Kim R, Kim S. Crystal structure of methenyltetrahydrofolate synthetase from *Mycoplasma pneumoniae* (GI: 13508087) at 2.2 Å resolution. *Proteins*. 2004 Set 1;56(4):839-43.

Chen S, Harmon AC. Advances in plant proteomics. *Proteomics*. 2006 Out ;6(20):5504-16.

Chen SH, Wu P, Chou C, Yan Y, Liu H, Weng S. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol Biol Cell*. 2007 Jul ;18(7):2525-32.

Chevalier M, Parisi L, Gueye B, Campion C, Simoneau P, Poupard P. Specific activation of PR-10 pathogenesis-related genes in apple by an incompatible race of *Venturia inaequalis* *Biologia Plantarum*. 2008 ;52:718-722.

Cheung F, Town CD. A BAC end view of the *Musa acuminata* genome. *BMC Plant Biol*. 2007 ;729.

Cheung AHK, Wong JH, Ng TB. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity [Internet]. *Phytomedicine*. 2009 Fev 3;[citado 2009 Fev 12] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19195858>

Choi D, Kim HM, Yun HK, Park JA, Kim WT, Bok SH. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*. 1996 Set ;112(1):353-9.

Choi D, Kim HM, Yun HK, Park JA, Kim WT, Bok SH. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*. 1996 Set ;112(1):353-9.

Chou HH, Holmes MH. DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics*. 2001 Dez ;17(12):1093-104.

Christensen AB, Thordal-Christensen H, Zimmermann G, Gjetting T, Lyngkjær MF, Dudler R, Schweizer P. The germin-like protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 2004 ;1:109-117.

Claverie JM. Computational methods for the identification of differential and coordinated gene expression. *Hum Mol Genet*. 1999 ;8(10):1821-32.

Coemans B, Matsumura H, Terauchi R, Remy S, Swennen R, Sági L. SuperSAGE combined with PCR walking allows global gene expression profiling of banana (*Musa acuminata*), a non-model organism. *Theor Appl Genet*. 2005 ;111:1118-26.

Coram TE, Pang ECK. Expression profiling of chickpea genes differentially regulated during a resistance response to *Ascochyta rabiei*. *Plant Biotechnol J*. 2006 Nov ;4(6):647-66.

Cordeiro ZJM, Matos AP. Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. In: Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on Mycosphaerella Leaf Spot Diseases, San Jose, Costa Rica. 2003 ;91-97.

Cort JR, Chiang Y, Acton T, Wu M, Montelione GT, Kennedy MA. NMR structure of Aquifex aeolicus 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase: Northeast Structural Genomics Consortium Target QR46. To be Published

Coupe SA, Taylor JE, Roberts JA. Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of Sambucus nigra L. leaflets. Planta. 1995 ;197(3):442-7.

Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. Science. 2001 Jun 8;292(5523):1863-76.

Creste S, Tulmann-Neto A, Silva SO, Figueira A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. Euphytica. 2003 ;132, 259–268.

Creste S, Neto AT, Vencovsky R, Silva SO, Figueira A. Genetic diversity of *Musa* diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 2004 ;51, 723– 733.

Creste S, Benatti TR, Orsi MR, Risterucci AM, Figueira, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. Molecular Ecology Notes. 2006 ;6, 303–306.

Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University, 1981;805-8.

Crouch HK, Crouch JH, Jarret RL, Cregan PB, Ortiz R. Segregation of microsatellite loci from haploid and diploid gametes in *Musa*. Crop Science. 1998 ;211–217.

Crouch JH, Crouch HK, Tenkouano A, Ortiz R. VNTR-based diversity analyses of 2_ and 4_ full-sib *Musa* hybrids. Electron. J. Biotechnol. 1999 ;15: 99–108.

Crouch JH, Ortiz R, Crouch HK, Ford-Lloyd BV, Howell EC, Newbury HJ, Jarret RL. Utilization of molecular genetic techniques in support of plantain and banana improvement. Acta Horticulturae. 2001 ;540, 185-191

Daniells J, Jenny C, Karamura C, Tomekpe K: *Musalogue: diversity in the genus Musa*, second edn. Montpellier, France: International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP); 2001

da Silva VB, Silva CHTP. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. *Revista eletrônica de Farmácia*. 2007 ;(1), 15-26.

Dean JV, Gronwald JW, Eberlein CV. Induction of Glutathione S-Transferase Isozymes in Sorghum by Herbicide Antidotes. *Plant Physiol*. 1990 Feb ;92(2):467-473.

Delano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.PyMOL.org>.

Devey ME, Bell JC, Smith DN, Neale DB, Moran GF. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theor Appl Genet*. 1996 ;92: 673– 679.

Devoto A, Muskett PR, Shirasu K. Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol*. 2003 Ago ;6(4):307-11.

Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ: Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopath*. 1994, 32:479-501.

Dolezel J, Bartos, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*. 2005 ;95: 99-110.

Dong, X. Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2001 ;4, 309–314

Droog F, Hooykaas P, Van Der Zaal BJ. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Related Chlorinated Compounds Inhibit Two Auxin-Regulated Type-III Tobacco Glutathione S-Transferases. *Plant Physiol*. 1995 Abr ;107(4):1139-1146.

Druka A, Kudrna D, Dannangara CG, von Wettstein D, Kleinhofs A. Physical and genetic mapping of barley (*Hordeum vulgare*) germin-like cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2002 ;99:850-855.

Duke N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tubers to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiology and Plant Pathology*, 1983 ;v. 23, p.345-347.

Edwards R, Owen WJ. Comparison of glutathione S transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. *Planta*. 1986 ;169: 208-215.

Edwards R, Cole DJ. Glutathione transferase in wheat (*Triticum*) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1996; 54: 96-104.

Emrich SJ, Barbazuk WB, Li L, Schnable PS. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res*. 2007 Jan ;17(1):69-73.

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998 Mar ;8(3):186-94.

Flor HH. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*. 1971 ;9:275-296.

Ganry J. Genetic Improvement of Banans for Resistance to Disease and Pest. CIRAD-

INIBAP, Montpellier. 1993 ;393p.

Gasparotto L, Pereira JCR, Costa MM, Pereira MCN. Fungicidas para o controle da Sigatoka Negra da bananeira. *Fitopatologia Brasileira*. 2001 ;26, 434 (Abstract 636).for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 2000, 113: 163–185.

Ginalski K, Elofsson A, Fischer D, Rychlewski L. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics*. 2003 Maio 22;19(8):1015-8.

Gjetting T, Carver TL, Skøt L, Lyngkjær MF. Differential gene expression in individual papilla-resistant and powdery mildew-infected barley epidermal cells. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 2004 ;17:729-738.

Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). 2001 ;Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

Gregersen PL, Thordal-Christensen H, Förster H, Collinge DB. Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1997; 51:85-97.

Grownland JW, Fuerst EP, Eberlein CV, Egli MA. Effect of herbicide antidotes on glutathione content and glutathione s-transferase activity of shorgum shoots. *Pesticide biochemistry and physiology.* 1987 ;29: 66-76.

Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997 Dez ;18(15):2714-23.

Guo J, Wang D, Guan D, Tang C. [The effect of liposome-carried metallothionein on secondary venous ischemia-reperfusion injury in a rat flap]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2003 Jul ;19(4):245-7.

Gupta PK, Varshney RK. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica.* 2000; 113: 163–185.

Hahn K, Strittmatter G. Pathogen-defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase. *Eur J Biochem.* 1994 Dez 1;226(2):619-26.

Hamer DH. Metallothionein. *Annu Rev Biochem.* 1986 ;55:913-51.

Hammond-Kosack KE, Jones JDG. Inducible plant defense mechanisms and resistance gene function. *Plant Cell.* 1996 ;8 1773–1791

Hatey F, Tosser-Klopp G, Clouscard-Martinato C, Mulsant P and Gasser F Expressed sequence tags for genes: A review. *Genet Select Evol,* 1998. 30:521-541.

Hayes JD McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999 ;31: 273–300.

Hegedüs A, Erdei S, Horváth G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* 2001 Maio; 160(6):1085-1093.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct ;6(10):986-94.

Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T. Domestication, genomics and the future for banana. *Ann Bot (Lond)*. 2007 Nov ;100(5):1073-84.

Hillisch A, Pineda LF, Hilgenfeld R. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discov Today*. 2004 Aug 1;9(15):659-69.

Hippolyte I, Seguin M, Bakry F. *Musa* Genetic Mapping. XVI International Plant and Animal genome conference (PAG), San Diego, January 2008.

Höltje HD, Sippl W, Rognan D, Folkers G. Introduction to comparative protein modeling. In *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

Hori K, Kobayashi T, Shimizu A, Sato K, Takeda K, Kawasaki S. Efficient construction of high-density linkage map and its application to QTL analysis in barley. *Theor Appl Genet*. 2003 Sep ;107(5):806-13.

Horry JP, Ortiz R, Arnaud E, Crouch JH, Ferris RSB, Jones DR, Mateo N, Picq C, Vuylsteke D. Banana and Plantain. 1997;67-81

Hsieh HM, Liu WK, Huang PC. A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol*. 1995 Jun ;28(3):381-9.

Hunatti AA, Ali BR. Glutathione s-transferase from oxadiazon treated chickpea. *Phytochemistry*. 1990 ;29(8): 2431-2435.

Hunatti AA, Ali BR. The induction of chickpea glutathione s-transferase by oxadiazon. *Phytochemistry*. 1991 ;30(7): 2131-2134.

Hutchison CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond *Nucleic Acids Research*. 2007; Vol. 35, No. 18 6227–6237

IBGE-SIDRA. 2004. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>

Jablonkai I, Hatzios KK. Role of glutathione and glutathione S-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1991 ;41; 221-231.

Kaemmer D, Fischer D, Jarret RL. Molecular breeding in the genus *Musa*: a strong case for STMS marker technology. *Euphytica*. 1997 ;96, 49–63

Kahl G. The banana genome in focus: A technical perspective. In: *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*. Science Publishers. 2004 ;Belgium.

Khuri S, Bakker FT, Dunwell JM. Phylogeny, function and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Mol. Biol. Evol.* 2001; 18:593–605.

Köhler B, Hills A, Blatt MR. Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiol.* 2003 Feb ;131(2):385-8.

Lagoda PJ, Noyer JL, Dambier D, Baurens FC, Grapin A, Lanaud C. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. *Mol Ecol.* 1998 Maio ;7(5):659-63.

Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* 2006 ;171(2):249-69.

Ledger SE, Gardner RC. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Mol Biol.* 1994 Ago ;25(5):877-86.

Ledger SE, Gardner RC. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Mol Biol.* 1994 Ago ;25(5):877-86.

Lewis PO, Zaykin D. GENETIC DATA ANALYSIS: Computer Program for the Analysis of Allelic Data, version 1.0 (d16c). 2001 ;Free program distributed by the authors over the Internet at <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

Lescot M, Piffanelli P, Ciampi AY, Ruiz M, Blanc G, Leebens-Mack J, et al. Insights into the *Musa* genome: syntenic relationships to rice and between *Musa* species. *BMC Genomics*. 2008 ;958.

Lim KJ, Tan SH, Othman YR, Suhami N, Raha AR, Gurmit S, Ho YW. Microarray analysis of gene expression using plants infected with *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense. p.31. In: 1st International Congress on Musa. Harnessing Research To Improve Livelihoods. 2004 ;6-9 July.

Lin W, Anuratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S, Datta SK. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology*. 1995 ;13: 686-691.

Liu P, Goh C, Loh C, Pua E. Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Physiol Plant*. 2002 Feb; 114(2):241-250.

Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*. 2004 Jun ;38(5):800-9.

Loyall L, Uchida K, Braun S, Furuya M, Frohnmeyer H. Glutathione and a UV light-induced glutathione Stransferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell*. 2000 ;12: 1939–1950.

Luo M, Dang P, Bausher MG, Holbrook CC, Lee RD, Lynch RE, et al. Identification of Transcripts Involved in Resistance Responses to Leaf Spot Disease Caused by *Cercosporidium personatum* in Peanut (*Arachis hypogaea*). *Phytopathology*. 2005 Abr; 95(4):381-7.

Macas J, Neumann P, Navrátilová A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*. 2007 ;8427.

Manrique-Trujillo SM, Ramírez-López AC, Ibarra-Laclette E, Gómez-Lim MA. Identification of genes differentially expressed during ripening of banana. *J Plant Physiol*. 2007 Ago ;164(8):1037-50.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005 Set 15;437(7057):376-80.

Marrs KA. The functions and regulation of glutathione S transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1996 ;47: 127–158.

- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*. 1993 Nov 26;262(5138):1432-6.
- Mauch F, Dudler R. Differential induction of distinct glutathione *S*-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol*. 1993 ;102: 1193–1201.
- Membré N, Bernier F. The rice genome expresses at least six different genes for oxalate oxidase/germin-like proteins. *Plant Physiol*. 1998 ;116:868.
- Métraux JP. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *Eur. J. Plant Pathol*. 2001 ;107, 13–18
- Meyer RC, Goldsbrough PB, Woodson WR. An ethylene-responsive flower senescence-related gene from carnation encodes a protein homologous to glutathione *S*-transferases. *Plant Mol Biol*. 1991 Ago ;17(2):277-81.
- Miller RNG, Bertoli DJ, Baurens FC, Santos CMR, Alves PC, Martins NF, et al. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biol*. 2008 ;815.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. 2003 Jun 26;423(6943):949-55.
- Montesano M, Hyytiäinen H, Wettstein R, Palva ET. A novel potato defence-related alcohol:NADP⁺ oxidoreductase induced in response to *Erwinia carotovora*. *Plant Mol Biol*. 2003 Maio ;52(1):177-89.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998 Jun ;24(6):954-8, 960, 962.
- Nayem A, Sitkoff D, Krystek S. A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Sci*. 2006 Abr ;15(4):808-24.
- Novaes E, Drost DR, Farmerie WG, Pappas GJ, Grattapaglia D, Sederoff RR, et al. High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome. *BMC Genomics*. 2008 ;9312.

Ondov BD, Varadarajan A, Passalacqua KD, Bergman NH. Efficient mapping of Applied Biosystems SOLiD sequence data to a reference genome for functional genomic applications. *Bioinformatics*. 2008 Dez 1;24(23):2776-7.

Ortiz R. Secondary polyploids, heterosis, and evolutionary crop breeding for further improvement of the plantain and banana (*Musa* spp. L.) genome. *Theor. Appl. Genet.* 1997; 94: 1113–1120.

Pappas Jr GJ, Miranda R, Martins NF, Togawa RC, Costa MM. SisGen: A CORBA Based Data Management Program for DNA Sequencing Projects. *Lecture Notes in Computer Science*, 2008. v. 5109, p. 116-123.

Pearl HM, Nagai C, Moore PH, Steiger DL, Osgood RV, Ming R. Construction of a genetic map for arabica coffee. *Theor Appl Genet.* 2004 Mar ;108(5):829-35.

Pei X, Li S, Jiang Y, Zhang Y, Wang Z, Jia S: Isolation, characterization and phylogenetic analysis of the resistance gene analogues (RGAs) in banana (*Musa* spp.). *Plant Sci.* 2007; 172: 1166-1174.

Peraza-Echeverria S, James-Kay A, Canto-Canche B, Castillo-Castro E: Structural and phylogenetic analysis of Pto-type disease resistance gene candidates in banana. *Mol Genet Genomics* 2007 ;278: 443-453.

Pertea G, Huang X, Liang F, Antonescu V, Sultana R, Karamycheva S, et al. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics*. 2003 Mar 22;19(5):651-2.

Powell W, Machray, GC, and Provan, J. Polymorphism revealed by simple sequence *repeats*. *Trends Plant Sci.* 1: 1999 ;215–222.

Rajakumar K, Thomas SB, Musa D, Almario D, Garza MA. Racial differences in parents' distrust of medicine and research. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009 Feb ;163(2):108-14.

Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB. Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol.* 2003 Nov ;53(5):701-14.

Reinemer P, Prade L, Hof P, Neuefeind T, Huber R, Zettl R, Palme K, Schell J, Koelln I, Bartunik HD, Bieseler B. Three-dimensional structure of glutathione s-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione s-transferases and a novel active site architecture. *Journal of molecular biology*. 1996 ;255: 289-309.

Ren X, Zhou Y, Zhang J, Feng W, Jiao B. Expression of metallothionein gene at different time in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *World J Gastroenterol*. 2003 Jul ;9(7):1554-8.

Riechers DE, Yang K, Irzyk GP, Jones SS, Fuerst EP.. Variability of glutathione S-transferase levels and dimethenamid tolerance in safener-treated wheat and wheat relatives. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1996 ;56: 88-101.

Riechers DE, Irzyk GP, Jones SS, Fuerst EP. Partial characterization of glutathione S-transferases from wheat (*Triticum* spp.) and purification of a safener-induced glutathione S-transferase from *Triticum tauschii*. *Plant Physiol*. 1997 Ago ;114(4):1461-70.

Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schauser L, Yoshioka H, Jones JDG. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO J*. 2004 Maio 19;23(10):2156-65.

Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ. Plant metallothioneins. *Biochem J*. 1993 Oct 1;295 (Pt 1):1-10.

Romano ML, Stepheson GR, Tal A, Hall JC. The effect of monooxygenase and glutathione s-transferase inhibitors on the metabolism of diclofop-methyl and fenoxaprop-ethyl in barley and wheat. *Pesticide biochemistry and physiology*. 1993 ;46: 181-189.

Rougemont J, Amzallag A, Iseli C, Farinelli L, Xenarios I, Naef F. Probabilistic base calling of Solexa sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2008 ;9:431.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000 ;132:365-86.

Ruanjaichon V, Sangsrakru D, Kamolsukyonyong W, Siangliw M, Toojinda T, Tragoonrung S, Vanavichit A. Small GTP-binding protein gene is associated with QTL for submergence tolerance in rice (*Oryza sativa*). *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004 ;Vol. 51, No.5:648-657.

Sali A, Overington JP. Derivation of rules for comparative protein modeling from a database of protein structure alignments. *Protein Sci.* 1994 Set ;3(9):1582-96.

Santos CMR, Martins NF, Hörberg HM, de Almeida ERP, Coelho MCF, Togawa RC, et al. Analysis of expressed sequence tags from *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 (AA) leaves submitted to temperature stresses. *Theor Appl Genet.* 2005 Maio; 110(8):1517-22.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods.* 2000 Nov 20;46(1-2):69-81.

Schröder P, Rennenberg H. Characterization of glutathione S-transferase from dwarf pine needles (*Pinus mugo* Turra). *Tree Physiol.* 1992 Set ;11(2):151-60.

Schuler GD. Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Res.* 1997 Maio ;7(5):541-50.

Silva S. de O, Flores JCO, Lima Neto FP. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2002, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1567-1574.

Simmonds NW. *Evolution of the Bananas*. Longman, London, UK. 1962 ;170pp.

Simmonds NW. Botanical results of the banana collecting exhibition 1954-1955. *Kew Bull.* 1956 ;11(3): 463-489

Simmonds NW, Weatherup, STC. Numerical taxonomy of the wild bananas (*Musa*). *New Phytologist.* 1990 ;567-571.

Singhal SS, Tiwari NK, Ahmad H, Srivastava SK, Awasthi YC. Purification and characterization of glutathione s-transferase from sugarcane leaves. *Phytochemistry.* 1991; 30: 1409-1414.

Skiba B, Ford R, Pang E: Construction of a cDNA library of *Lathyrus sativus* inoculated with *Mycosphaerella pinodes* and the expression of potential defence-related expressed sequence tags (ESTs). *Physiol Mol Plant P.* 2005 ;66(1/2):55-67.

Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*. 1999 Mar ;11(3):431-44.

Somssich IE, Wernert P, Kiedrowski S, Hahlbrock K. *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol:NADP⁺ oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 November 26; 93(24): 14199–14203.

Souza SAC. Avaliação da variabilidade genética em *Musa* spp. utilizando marcadores microssatélites. Piracicaba. 2002 ;86 p.: il.

Souza Jr, MT. Projeto *MusaGeneBR*. Identificação e caracterização funcional de genes de resistência a estresses bióticos e sequência promotora de expressão gênica em banana (*Musa* spp.). Brasília, 2004.

Stekel DJ, Git Y, Falciani F. The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries. *Genome Res*. 2000 Dez ;10(12):2055-61.

Stover RH, Simmonds NW. Bananas. 3. ed. New York : Longmans. 1987 ;468 p. (Tropical Agriculture Series).

Tabaeizadeh Z. Transgenic tomato plants expressing *L. chilense* chitinase gene demonstrate resistance to *Verticillium dahliae*. *Plant Physiol*. 1997 ;114:299

Takabatake R, Karita E, Seo S, Mitsuhara I, Kuchitsu K, Ohashi Y. Pathogen-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco. *Plant Cell Physiol*. 2007 Mar ;48(3):414-23.

Taler D, Galperin M, Benjamin I, Cohen Y, Kenigsbuch D. Plant enzymatic resistance (*eR*) genes encoding for photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *Plant Cell*. 2004 ;16, 172–184.

Tezenas du Montcel H. *Musa acuminata* subsp. *banksii* status and diversity. In: Workshop on identification of genetic diversity in the genus *Musa*, Montpellier Proceedings. Montpellier. INIBAP. 1988;12.

Togawa RC, Brigido MM . PPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology, 2003. Ribeirao Preto. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology, 2003.

Truglio JJ, Theis K, Leimkühler S, Rappa R, Rajagopalan KV, Kisker C. Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Structure*. 2002 Jan ;10(1):115-25.

Ulmasov T, Ohmiya A, Hagen G, Guilfoyle T. The soybean GH2/4 gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol*. 1995 Jul ;108(3):919-27.

van den Berg N, Birch PRJ, Viljoen A, Wingfield MJ, Visser M and Berger DK. 2002. Suppression subtraction hybridization used to identify genes associated with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in Cavendish bananas. In: 3rd International Symposium On Molecular And Cellular Biology Of Bananas, Leuven, Belgium, 9-11 September, 2002.

van Loon LC, van Kammen A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*. 1970 Feb ;40(2):190-211.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol*. 2005 Jan ;23(1):48-55.

Vedadi M, Lew J, Artz J, Amani M, Zhao Y, Dong A, et al. Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 Jan ;151(1):100-10.

Vedoy CG, Bengtson MH, Sogayar MC. Hunting for differentially expressed genes. *Braz J Med Biol Res*. 1999 Jul ;32(7):877-84.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995 ;270: 484-487

Vera JC, Wheat CW, Fescemyer HW, Frilander MJ, Crawford DL, Hanski I, et al. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Mol Ecol*. 2008 Abr ;17(7):1636-47.

Vilarinhos AD, Piffanelli P, Lagoda P, Thibivilliers S, Sabau X, Carreel F, D'Hont A :Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla). *Theor Appl Genet.* 2003 ;106:1102-1106.

Wagner W, Edwards R, Dixon DP, Mauch F. Probing the Diversity of the Arabidopsis glutathione S-Transferase Gene Family. *Plant Molecular Biology.* 2002 ;49: 515–532, 2002.

Wang RL, Dekker J. Weedy adaptation in *Setaria* spp. III. Variation in herbicide resistance in *Setaria* spp. *Pesticide biochemistry and physiology.* 1995 ;51: 99-116.

Wang JY, Chen YY, Liu WL, Wu YT. Development and application of EST-derived SSR markers for bananas (*Musa nana* Lour.). *Yi Chuan.* 2008 ;30:933-40.

Wasinger VC, Locke VL, Raftery MJ, Larance M, Rothemund D, Liew A, et al. Two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of Gradiflow fractionated native human plasma. *Proteomics.* 2005 Ago ;5(13):3397-401.

Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen P, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* 1998 ;36:101–112.

Wernimont AK, Lew J, Hills T, Hassanali, A, Lin L, Wasney G, Zhao Y, Koziaradzki, I, Vedadi M, Schapira M, Bochkarev A, Edwards AM, Arrowsmith CH, Weigelt J, Sundstrom M, Hui R, Artz JD, Amani M. Crystal structure of *Cryptosporidium parvum* cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cgd2_1660. To be Published.

Wicker T, Schlagenhauf E, Graner A, Close TJ, Keller B, Stein N. 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley. *BMC Genomics.* 2006 ;7275.

Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, Sykes BD, et al. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3316-9.

Wolf AE, Dietz KJ, Schröder P. Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Lett.* 1996 Abr 8;384(1):31-4.

Wu SP, Druka A, Horvath H, Kleinhofs A, Kannangara CG, von Wettstein D. Functional characterization of seed coat-specific members of the barley germin gene family. *Plant Physiol. Biochem.* 2000 ;38:685-698.

Xu BY, Su W, Liu JH, Wang JB, Jin ZQ. Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Planta.* 2007 Jul ;226(2):529-39.

Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T, Matsuta N. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* 2000 ;19:639–646

Zhou J, Goldsbrough PB. Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 1994 Jun ;6(6):875-84.

Zimmermann G, Bäumlein H, Mock HP, Himmelbach ASP. The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiol.* 2006 ;142:181-192.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Artigo submetido: Characterization of novel microsatellite markers derived from BAC sequences in *M. acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4.

APÊNDICE B. Resumo publicado – 54º Congresso Brasileiro de Genética: Caracterização de marcadores microssatélites derivados de sequências de BAC e EST em *Musa acuminata*.

APÊNDICE C. Resumo publicado – 53º Congresso Brasileiro de Genética: Analysis of ESTs in the interaction between *Musa acuminata* and *Mycosphaerella fijiensis*.

APÊNDICE D. Lista de *primers* desenvolvidos a partir de sequências de *M. acuminata* Calcutta 4.

APÊNDICE E. Lista de *primers* desenvolvidos a partir de sequências de *M. acuminata* Cavendish Grand Naine.

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES

Characterization of novel microsatellite markers derived from BAC sequences in *M. acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. *Calcutta 4*

Journal:	<i>Molecular Ecology Resources</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Permanent Genetic Resources Note
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Passos, Marco; Universidade Catolica de Brasilia, Ciencias Genomicas e Biotecnologia Miller, Robert; Universidade Catolica de Brasilia, Ciencias Genomicas e Biotecnologia; Universidade de Brasilia, Biologia Celular Menezes, Natalia; Universidade Catolica de Brasilia, Ciencias Biologicas Amorim, Edson; EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical Pappas Jr, Georgios; Universidade Catolica de Brasilia, Ciencias Genomicas e Biotecnologia; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Costa, Marcos; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Ciampi, Ana; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Keywords:	banana, SSR, polymorphism, Mycosphaerella, biotic stress, PCR primers

1 **Characterization of novel microsatellite markers derived from BAC sequences in *M.***
2 ***acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. *Calcutta 4***

3

4 Marco A. N. Passos,* Robert N.G. Miller*# Natalia N.P. Menezes,* Edson P. Amorim,†
5 Georgios J. Pappas Júnior,*‡ Marcos Mota do Carmo Costa,‡ and Ana Y. Ciampi‡

6 **Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Módulo B, 70790-160, Brasília, DF, Brazil,*

7 #*Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto de Ciências*
8 *Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Asa Norte, 70910-900, Brasília DF, Brazil,*

9 †*EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa, 44380-000, Cruz das Almas,*

10 *BA, Brazil, ‡EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica -*
11 *PqEB - Av. W5 Norte, Caixa Postal 02372, 70770-900, Brasília, DF, Brazil*

12

13 *Keywords:* banana, SSR, polymorphism, PCR primers, biotic stress, *Mycosphaerella*

14

15 Corresponding author: Robert Neil Gerard Miller, Fax: (55) 61 3347 4797; E-mail:

16 rmiller@pos.ucb.br; robertmiller@unb.br

17

18 **Running title:**

19 Novel SSR markers in *M. acuminata* Calcutta 4

20 **Abstract**

21

22 **We isolated 41 novel microsatellite loci from BAC clones in *Musa acuminata* subsp.**
23 ***burmannicoides*, var. Calcutta 4. From 33 tested loci, 20 were polymorphic when**
24 **screened across 21 diploid *M. acuminata* accessions, contrasting in resistance to Sigatoka**
25 **diseases. The number of alleles per SSR locus ranged from two to four, with expected**
26 **heterozygosity ranging from 0.31 to 0.75. These new microsatellite markers are a**
27 **resource for genetic mapping, germplasm characterization, and marker assisted**
28 **selection for desirable traits.**

29 Commercial banana varieties are mainly cultivated by smallholder farmers across tropical and
30 sub-tropical environments. As an inexpensive source of carbohydrates, banana is also rich in
31 fibre, minerals and vitamins. Although an important food commodity in terms of production
32 value after rice, wheat and maize (INIBAP 2003), genetic improvement has been limited. In
33 contrast to wild bananas, where sexual recombination results in viable seed, the majority of
34 today's commercial cultivars are sterile A and B genome-containing triploids, with seedless
35 fruit development via parthenocarpy. As such cultivars are evolving asexually via vegetative
36 micropropagation or suckers, their genetic base is narrow, resulting in crops lacking resistance
37 to pests and disease.

38 Highly variable simple sequence repeat loci (SSRs) are abundant, randomly dispersed,
39 locus specific, co-dominant and multi-allelic markers. Their application in *Musa* has included
40 genotyping (Crouch *et al.* 2001; Creste *et al.* 2003; Amorim *et al.* 2008), *Musa* evolution and
41 taxonomy (e.g. Lagoda *et al.* 1998), and linkage map saturation (e.g. Hippolyte *et al.* 2008).
42 Potential also exists in marker assisted selection (MAS), upon identification of SSRs co-
43 localizing with desirable traits. To date, several hundred SSR markers have been developed
44 from *M. acuminata* and *M. balbisiana* material (e.g. Lagoda *et al.* 1998; Crouch *et al.* 2001;
45 Buhariwalla *et al.* 2005; Creste *et al.* 2006, Cheung & Town 2007). In comparison with other
46 crop species, however, the total number of loci available for genetic analyses remains limited,
47 given that alleles can be absent or monomorphic when applied across cultivars.

48 We report the development of novel SSR markers in *M. acuminata* Calcutta 4, a wild
49 species resistant to numerous fungal and bacterial pathogens, as well as nematodes.
50 Polymorphic loci were identified when tested across 21 potential parental diploid *M.*
51 *acuminata* individuals contrasting in resistance to Sigatoka diseases caused by the ascomycete
52 fungi *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola*.

53 Data for SSR identification was derived from genomic data (shotgun-sequenced BAC
54 clones from a *M. acuminata* Calcutta 4 BAC library) (Vilarinhos *et al.* 2003; Lescot *et al.*
55 2008). A computational search over the BAC consensi datasets was performed to locate SSRs
56 with at least two repeating units spanning more than 10 bases, using the program Mreps
57 (<http://bioinfo.lifl.fr/mreps/>). Six classes of repeats were identified. Di-nucleotide motifs were
58 the most abundant (46.34%), followed by tri- (29.26%), tetra- (12.19%), penta- (7.31%),
59 hexa- (2.43%) and nona-nucleotide repeats (2.43%). The most abundant dinucleotide repeat
60 motifs were AG, AT, CT, and TA (7.31% each). By contrast, all tri-nucleotide motifs were
61 equal in abundance (7.31% each). Primers flanking microsatellite loci were designed using
62 PRIMER3 (Rozen & Skaletsky 2000).

63 From 41 loci identified where primers could be designed, 33 primer pairs were tested
64 for polymorphism. Twenty one diploid (AA) *M. acuminata* accessions, contrasting in
65 resistance to Sigatoka diseases, and potential parents for genetic map construction, were
66 used to characterize microsatellite loci. Genomic DNA was extracted from the Black
67 Sigatoka-resistant *M. acuminata* accessions Calcutta 4, Lidi, 0323-03, SH32-63, 1304-06 and
68 0116-01; Black Sigatoka-susceptible accessions Pisang Berlin and Niyarma Yik; Yellow
69 Sigatoka-resistant accessions Calcutta 4, Burmanica, Microcarpa, Lidi, 0323-03, 1304-06,
70 1741-01, 9179-03, 0116-01, 1318-01 and 4279-06; and Yellow Sigatoka-susceptible
71 accessions Raja Uter, Tjau Lagada, F2P2, Khai Nai On, Pisang Berlin, Niyarma Yik,
72 Sowmuk, Jaribuaya and SH32-63. Each PCR reaction was carried out in a 13 μ l volume,
73 containing 3 ng of template genomic DNA, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μ M of each
74 primer, 1.25U of Taq polymerase, and 1X PCR buffer (Invitrogen). Amplifications were
75 conducted on a PTC-100 thermocycler (MJ Research), with temperature cycling conducted as
76 follows: 94°C for 5 min; 29 cycles of 94°C for 1 min, specific primer annealing temperature

77 for 1 min, and 72°C for 1 min; plus an extra elongation period of 7 min at 72°C. Following
78 amplification, PCR products were initially electrophoresed in 3.5% agarose gels run in 1X
79 TBE buffer, in order to check amplicon size and PCR specificity. Allele sizes were
80 determined against a 10-bp molecular size marker (Invitrogen) on denaturing 6%
81 polyacrylamide gels using 7m urea, with PCR products visualized by silver staining according
82 to standard protocols. The degree of polymorphism per locus was calculated using GDA
83 software v1.2 (Lewis & Zaykin 2001). Twenty of the 33 tested primer pairs reproducibly
84 amplified polymorphic PCR products across the individuals, with allelic patterns given in
85 Table 1. From 59 scored alleles, the number of polymorphic alleles ranged from two to four.
86 Heterozygosity values were calculated using GDA (Lewis & Zaykin 2001) and FSTAT
87 (Goudet 2001), with expected values ranging from 0.31 to 0.75. Thirteen loci (MABN 09,
88 MABN 12, MABN 14, MABN 16, MABN 18, MABN 21, MABN 24, MABN 31, MABN 33,
89 MABN 37, MABN 38, MABN 39, MABN 40) were monomorphic in *M. acuminata*
90 accessions. Twelve loci showed departure from Hardy-Weinberg expectations ($P < 0.05$ using
91 Fisher's exact test probability ($P < 0.05$) based on 2000 shufflings), possibly as a result of
92 sampling, chromosomal inversions or null alleles. Phenomena potentially responsible for null
93 alleles include point mutations and sequence divergence in primer annealing sites, or
94 preferential allele amplification during PCR.

95 In testing for linkage disequilibrium (FSTAT $P < 0.01$ with Bonferroni correction), no
96 disequilibrium was detected among the loci pairwise combinations.

97 This is the first report identifying polymorphic microsatellite markers from *M.*
98 *acuminata* Calcutta 4 across accessions contrasting in resistance to Sigatoka diseases. Their
99 availability will contribute towards development of genetic maps derived from segregant

100 populations for resistance to Sigatoka diseases, and offer potential for application in marker
101 assisted selection for agronomically important traits.

For Review Only

102 **References**

103

104 Amorim, EP, Reis, RV, Santos-Serejo, JA, Amorim, VBO, Silva, SO (2008). Variabilidade
105 genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa*
106 *Agropecuária Brasileira*, **43**, 1045-1052.

107

108 Buhariwalla HK, Jarret RL, Jayashree B, Crouch JH, Ortiz R (2005) Isolation and
109 characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana*. *Molecular Ecology Notes*, **5**,
110 327–330.

111

112 Cheung F, Town CD (2007) A BAC end view of the *Musa Accuminata* genome. *BMC Plant*
113 *Biology*, **7**, 29.

114

115 Creste S, Tulmann-Neto A, Silva SO, Figueira A (2003) Genetic characterization of banana
116 cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. *Euphytica*, **132**, 259–268.

117

118 Creste S, Benatti TR, Orsi MR, Risterucci AM and Figueira, A (2006) Isolation and
119 characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*.
120 *Molecular Ecology Notes*, **6**, 303–306.

121

122 Crouch JH, Ortiz R, Crouch HK *et al.* (2001) Utilization of molecular genetic techniques in
123 support of plantain and banana improvement. *Acta Horticulturae*, **540**, 185-191.

124

125 Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices

- 126 (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- 127
- 128 INIBAP (2003) Banana food and wealth. International Network for the Improvement of
129 Banana and Plantain, Montpellier, 2003, France.
- 130
- 131 Hippolyte I, Seguin M, Bakry F *et al.* (2008) *Musa* Genetic Mapping. XVI International Plant
132 and Animal genome conference (PAG), San Diego, January 2008.
- 133
- 134 Lagoda PJJ, Noyer JL, Dambier D *et al.* (1998) Sequence tagged microsatellite site (STMS)
135 markers in the *Musaceae*. *Molecular Ecology*, **7**, 657-666.
- 136
- 137 Lescot M, Piffanelli P, Ciampi AY *et al.* (2008) Insights into the *Musa* genome: syntenic
138 relationships to rice and between *Musa* species. *BMC Genomics*, **9**, 58.
- 139
- 140 Lewis PO, Zaykin D (2001) GENETIC DATA ANALYSIS: Computer Program for the
141 Analysis of Allelic Data, version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the
142 Internet at <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- 143
- 144 Rozen S, Skaletsky HJ (2000) PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist
145 programmers. In: Bioinformatics Methods and Protocols; Methods in Molecular Biology (eds.
146 Krawetz S, Misener S), pp. 365-386. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- 147

148 Vilarinhos AD, Piffanelli P, Lagoda P *et al.* (2003) Construction and characterization of a
149 bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla). *Theoretical and*
150 *Applied Genetics*, **106**, 1102-1106.

151

152 **Acknowledgements**

153 This work was funded by the CNPq (Projects 680.398/01-5 and 506165/2004-3), the IAEA
154 (Project 13187), FINEP (Project 0107060900 / 0842/07), Embrapa and the Universidade
155 Católica de Brasília. MANP was supported by the CNPq.

For Review Only

156 **Table 1** Characteristics of polymorphic microsatellite loci isolated from *M. acuminata* Calcutta 4 and tested on 20 *M. acuminata* accessions,
 157 contrasting in resistance to Sigatoka diseases. T_a , annealing temperature; N_a , number of alleles per locus observed; H_E , expected heterozygosity
 158 under Hardy-Weinberg expectations; H_O , observed heterozygosity; $H-W$, P value for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, with
 159 *significant departure ($P < 0.05$) from HW equilibrium; f , fixation index.

160

161

Locus	Consensus sequence ID	GenBank		Primer Sequence (5' – 3')	Obtained allele size		N_a	H_E	H_O	$H-W$	f
		Accession no.	Repeat Array		range (bp)	T_a (°C)					
MABN 01	MA4_BAC008L021	AC186748	(AG)12	F: CCACTGAAGCTGAAAGGAGG R: GGATTGTAGGTGACGGGAGA	500-540	56	3	0.667828	0.875000	0.021000*	-0.292639
MABN03	MA4_BAC008L021	AC186748	(TG)10	F: TGGTTGTATGTTTGTCTGGGA R: CAAAGTGCTGGCATGAGAAA	500-545	60	3	0.593590	0.850000	0.013500*	-0.448430
MABN 06	MA4_BAC008L021	AC186748	(ATAC)3	F: GCAACCATCAACCAAAAACC R: TTTGCAAGAAAATCGTGCTG	344-360	58	3	0.444872	0.200000	0.013500*	0.556851
MABN 07	MA4_BAC008L021	AC186748	(ATA)6	F: TTTTGATCATCATATGGGTCG R: AGAGGGAGAGCCAAAGTGGT	500-540	60	2	0.344948	0.428571	0.512000	-0.250000
MABN 08	MA4_BAC008L021	AC186748	(GA)13	F: TTACCGTAAACGGAGCCAAC R: GAAATCGAGGAAAACCGACA	260-290	58	3	0.637631	1.000000	0.000000*	-0.590909
MABN 13	MA4_BAC111B014	AC186954	(CA)6	F: CCTCAACGAAGCATAACAGCA	210-240	58	2	0.450980	0.647059	0.106500	-0.454545

				R: CAGTCTGGGCTGACACAGAA							
MABN 15	MA4_BAC111B014	AC186954	(ATTTT)3	F: CCAACTTCCATTTGGCTTTT R: CGCAGGCGACTTCTTACAGT	490-520	58	2	0.315912	0.380952	1.000000	-0.212121
MABN 17	MA4_BAC111B014	AC186954	(TCT)14	F: CCCATGCAACTACAACAACG R: GGAACCACGTGTCCTGATCT	200-245	60	4	0.732804	1.000000	0.125000	-0.384030
MABN 19	MA4_BAC106O017	AC186747	(TTTAT)3	F: CTCCACCGCTGCAAATTAT R: TTCATTTGATTGGAAAGTGAA	330-380	60	4	0.750794	0.944444	0.003000*	-0.267544
MABN 20	MA4_BAC106O017	AC186747	(AC)7	F: AAGAAGTGCAACAGATGGGC R: GCCAAAGGAATCATGCTGTT	344-380	56	3	0.537179	0.550000	0.727500	-0.024510
MABN 22	MA4_BAC106O017	AC186747	(AG)6	F: GTCGCAGAGATCAAGGAACC R: GGACCTCCTATGTTTGCTGC	490-510	58	2	0.507549	0.619048	0.392000	-0.226415
MABN 23	MA4_BAC106O017	AC186747	(TTA)4	F: TCGATCATTGGCATCACAT R: CCAGGTAGCGAAGACGAGAC	350-500	60	4	0.723577	0.952381	0.015500*	-0.326700
MABN 25	MA4_BAC106O017	AC186747	(TAT)9	F: TTTCATGATTTGAGGAGCCC R: CCCCACAAGTATGTTCCAC	380-410	58	2	0.462304	0.684211	0.049500*	-0.500000
MABN 26	MA4_BAC106O017	AC186747	(CT)24	F: GTGGGAACATACTTGTGGGG R: ACGGAAAACCACAAGCAATC	375-395	58	2	0.493612	0.047619	0.000000*	0.905660
MABN 27	MA4_BAC106O017	AC186747	(GAA)4	F: GGATGCAAAGACGGACAAAT R: TAATGGCTTTGCAACTGCTG	470-520	58	3	0.667828	0.714286	0.000000*	-0.071429
MABN 28	MA4_BAC106O017	AC186747	(GA)23	F: TGGAGGTCTCAACAAAACC R: AGATTGGCTACTGTGGGTGG	390-410	60	2	0.480769	0.550000	0.639500	-0.148352

MABN 29	MA4_BAC106O017	AC186747	(GAT)5	F: ACCAGCCACTGGAATCAAAC R: GTCTGCTGAAGAGCCAAACC	350-385	60	3	0.600000	0.866667	0.069000	-0.467742
MABN 30	MA4_BAC106O017	AC186747	(ATTTT)3	F: CAGCCGTTGATGTTCAAATG R: CGTTACGGTGGATCGTCTTT	360-380	60	2	0.387097	1.000000	0.000500*	1.000000
MABN 34	MA4_BAC106O017	AC186747	(CT)18	F: TAGGTGAGAATGGGACGGAG R: CAGTAGCAGCAACCTGGTGA	330-355	58	3	0.661451	0.368421	0.000000*	0.449782
MABN 35	MA4_BAC106O017	AC186747	(CT)14	F: CTGTCACCAGGTTGCTGCTA R: CTCCTTGGACCTTTCATCG	270-320	56	4	0.664103	0.450000	0.005500*	0.328094

For Review Only

162

For Review Only

Caracterização de marcadores microsatélites derivados de seqüências de BAC e EST em *Musa acuminata*

Passos, MAN¹; Menezes, NNP¹; Emediato, FL; Vilarinhos, AD²; Souza Jr., MT³; Pappas Júnior, GJ¹; Miller, RNG¹; Ciampi, AY³

¹Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Módulo B, Brasília, DF, CEP 70790-160, Brazil

²EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA., Brazil

³EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte, Caixa Postal 02372, Brasília, DF, CEP 70770-900, Brazil
marconinomia@gmail.com

Palavras-chave: *Musa acuminata*, simple sequence repeats (SSRs), polimorfismo, estresse biótico, Sigatoka Negra

O Brasil é atualmente o segundo maior produtor de banana, contribuindo para aproximadamente 10% da produção mundial. Estresses bióticos estão hoje entre os mais importantes fatores limitativos da produção de banana em todo o mundo. O patógeno *Mycosphaerella fijiensis*, organismo causador de Sigatoka Negra causa na bananeira amadurecimento precoce da fruta, lesões necróticas e decomposição foliar, além de perdas na produção de até 100% em variedades suscetíveis. O objetivo deste trabalho é a identificação e caracterização de componentes genéticos de resistência ao patógeno *M. fijiensis* em *Musa* spp., e o desenvolvimento de marcadores gênicos funcionais para o mapeamento genético a ser utilizado em programas de melhoramento de *Musa*. Foram desenhados primers a partir de seqüências de EST's de 2 bibliotecas de cDNA originadas de *M. acuminata* spp. *burmannicoides* Calcutta 4 (cultivar resistente) e Cavendish Grande Naine (cultivar susceptível), infectadas *in vitro* com *M. fijiensis*. Primers SSRs também foram desenhados a partir de seqüências de subclones da biblioteca BAC de *M. acuminata* spp. *burmannicoides* Calcutta 4. O DNA de 20 cultivares diplóides de *M. acuminata* resistentes e susceptíveis às Sigatokas negra e amarela foi utilizado para caracterizar os marcadores microsatélites. Foram formados 4 agrupamentos (*Bulks*) da seguinte maneira: *Bulk* 1, com DNA de 6 indivíduos resistentes à Sigatoka-negra; *Bulk* 2, com DNA de 2 indivíduos susceptíveis à Sigatoka-negra; *Bulk* 3, com DNA de 11 indivíduos resistentes à Sigatoka-amarela; e *Bulk* 4, com DNA de 9 indivíduos susceptíveis à Sigatoka-amarela. Foram realizadas reações de PCR com o objetivo de detectar presença/ausência de fragmentos entre os *Bulks*. Para os locos onde foi detectado polimorfismo, novas reações foram realizadas com os *Bulks* abertos, ou seja, para cada indivíduo, de modo a confirmar a presença da banda em todos os componentes do *Bulk*. Essa verificação de polimorfismo foi realizada em eletroforese com gel de poliacrilamida 4% em resolução em nitrato de prata. Até o momento foram encontrados 22 locos microsatélite polimórficos, sendo 20 locos originados de seqüências oriundas de BAC's e 2 originados a partir de seqüências de ESTs. Esses locos foram testados em 20 cultivares diplóides contrastantes para a resistência às Sigatokas negra e amarela e em 2 indivíduos da F1 gerados do cruzamento entre os cultivares "Calcutta 4" (resistentes às Sigatokas negra e amarela) e "Pisang Berlin" (suscetível às Sigatokas negra e amarela). No caso de populações de *Musa* sp., contrastando para resistência a pragas, uma potencial co-segregação de SSRs com QTLs para resistência também oferece a possibilidade de desenvolvimento de marcadores ligados à locos de resistência. Dessa forma, esses marcadores moleculares podem possibilitar uma seleção assistida, além de saturar mapas genéticos futuros em *Musa*.

Supported by: IAEA, CNPq, UCB.

Analysis of ESTs in the interaction between *Musa acuminata* and *Mycosphaerella fijiensis*

Passos, MAN; Emediato, FL; Nunes, FAC; Pappas Jr, GJ; Miller, RNG

¹Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Módulo B, Brasília, DF, CEP 70790-160, Brasil
rmiller@pos.ucb.br

Keywords: Black Sigatoka Disease, cDNA, ESTs, *Musa acuminata*

Brazil is the world's second largest producer of banana (~9.5% of world production), which is one of the most popular fruits and the fourth most valuable food. Biotic stresses are today amongst the most important constraining factors in banana production worldwide. Black Sigatoka disease, which is caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, causes necrotic leaf lesions, yield losses of 50% or more, and premature ripening. The objective this work is to identify and characterize genetic components of resistance in *Musa* spp. against the pathogen *M. fijiensis* and to develop functional gene based markers for uptake in genetic mapping and marker assisted selection in *Musa* breeding programmes. Two cDNA libraries were previously constructed in a collaborative project with CIRAD and EMBRAPA, from leaves from *Musa acuminata* spp. *burmannicoides* Calcutta 4 (resistant cultivar) and Cavendish Grande Naine (susceptible cultivar), both *in vitro* - infected with *M. fijiensis*. 5'-end sequencing of over 5500 clones from each library was performed at UCB and Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Ongoing bioinformatic analysis of EST sequence data is being accomplished by the following procedure: a) Identification of sequence homologs via searches in nucleotide and protein databases; b) sequence processing for quality (via Phred), insert size, slippage assessment, removal of rRNA sequences, vector trimming, adaptor and polyA tail removal, and CAP3/TGICL clustering for contig mounting. EST sequence clusters will be submitted to BlastX analyses against distinct databases to identify protein functional categories. Identification of a unigene set will provide the basis for development of a *Musa* DNA array. EST sequences showing high homology to resistance genes and differential expression in *M. acuminata* Calcutta IV and *M. acuminata* Cavendish will be identified via '*in silico*' analysis of expression levels, using the 'Digital Differential Display' analysis package available at UCB's bioinformatics pipeline (www.biofoco.org). SSR based markers will also be developed via analysis of EST sequences, for uptake in genetic mapping applications. Specific primers are being designed for flanking regions to microsatellites, with primers so far designed for 203 consensus sequences with SSRs. Specific primers for differentially expressed ESTs associated with disease resistance will also be designed. Validation of *in silico*-identified differentially expressed genes in the *Musa* v *M. fijiensis* interaction will be executed. For this, candidate genes in the *Musa* v *M. fijiensis* interaction will be validated via Northern blots or Quantitative (Real time) PCR.

Supported by: IAEA, CNPq, UCB

Locos	ID da sequência consenso	primers_forward	primers_reverse	Repeat
MA41	CL490Contig1&&120817593177966283184262999615	ATATCCAAAAGAGCCACGA	AATAGTGGCTAAGCGAGGCA	AG
MA42	CL410Contig1&&120817593173665849566866862678	CATTTGTGGAGAGGAGCCAT	TCAATCAACCAACCACACTCA	TTGGG
MA43	CL405Contig1&&120817593173454583982892913052	TCTCAAAAAGCGGCATCTCT	GCCTTTCTCCACATTTTCCA	CTC
MA44	CL379Contig1&&120817593172110706608163176493	TGCATTCAGTTGCTCTTTGG	CGTGAACGCTTCTTTCTTCC	TC
MA45	CL311Contig1&&120817593168527714061814760714	GATGGTTCGTCCGTCAGATT	CACAGTCACCAAATCCATCG	TCTT
MA46	CL231Contig1&&120817593164454421918667642167	CCTTCGTTACCAAACCCAGA	CCAGCAAATCCCAAGTTTGT	CCT
MA47	CL154Contig1&&120817593159880658841588903426	TTTAGGCATTTCCAACCTGC	AGGGACGTACATCTTGTGGC	CTC
MA48	CL144Contig1&&120817593159140850794263635309	GTCCGTAATTTGTGGAGCGT	GTAGTCGGAGCCAACCAGAG	CCA
MA49	CL136Contig1&&120817593158514814533786289105	ACCTCAACACCGTCATCTCC	CTTGCACACTGTTCCAGAGC	AG
MA410	CL203Contig1&&120817593116979064956696601710	ATCACCAACGTAGACTGGGC	GCCCGAATCCCTACTTACCA	TC
MA411	CL188Contig1&&120817593115970733398473814727	GATCCAAAGAGCCACCACAT	AGTTGTAGCCACGGTTGTCC	CCT
MA412	CL163Contig1&&120817593114619211714812263906	TGAGGAAGAGGAAGCAAGA	GAGACTTCCACCTTTTCCGA	GAA
MA413	CL146Contig1&&120817593113758378668077830770	AGTTACTATGCTCAGCAGCAGG	CACAGCATCCCTTCCAGAAT	CTC
MA414	CL5Contig2&&120817593045386675067725888236	ACTTCCAGTTCAACATCGGG	AAGCATGCGTAGGAAGATTCA	CAG
MA415	CL3Contig1&&120817593029013831714270623625	TTGCACTCCTCCAGCTCTTT	AGGAACGACAGCAAGAGGAA	CGG
MA416	CL2Contig1&&120817593013914980179597871682	CACAAACTGGTAAACGCCCT	GGGGAAGAGCAATCAGAAGG	TC
MA417	CL449Contig1&&120817592999668556524242589953	TTGTTGCTCCCTTCTTCGAT	AGGATGAATTCAGCAATGCC	AGA
MA418	CL441Contig1&&120817592999069200664468877487	ATCGGCAAGAGACTCGAGAA	ATGAAGAAGGCTGGGGTCTT	GAG
MA419	CL431Contig1&&120817592998562317610194379476	TGGGATGACAAGGAAGAAGG	TTCTCTGTGCTGCTTTTCGAG	GAT
MA420	CL406Contig1&&120817592997237627882633222249	GGAAGGTCTCAGGCAAAGAA	AGGCGAACGAGTCACATCTT	AGG
MA421	CL401Contig1&&120817592997043477328512745205	CGCTCTTGCTACACCTTTTC	AAGACCACAGAGATGGCAGC	GGACGA
MA422	CL397Contig1&&120817592996774930236159381400	TCATCCACTGCAGCTCTGTC	CATGGCGTATCTCACATTGG	GCC
MA423	CL253Contig1&&120817592989951658240380623266	GCGGTACACACACACACACA	GGACCCGTGGTATGTCAATC	TC
MA424	CL244Contig1&&120817592989418107932459857100	TCTCCCTTTCCCTTTTCCTC	CCCCTGCATATGGACTGTCT	GAGG
MA425	CL185Contig1&&120817592946924403008128963805	GATCCTCCAATTCGGCTGT	GCTTCGACCTTGAAGACGAC	AG
MA426	CL170Contig1&&120817592945877925232491445249	TCGTCAGGTCTGTATGCGAG	CTGCAAGAGGACATCAAACAAG	TAAT
MA427	CL153Contig1&&120817592942566617806573507949	CTTCTCCTCGTGTCTTGCT	CTCTCCGCTTTCTCTCTCT	CCCTTC

MA428	CL143Contig1&&120817592941872428332263736397	GCAACAAGAGAGCAGCATAGC	GCAGCCACCAGTAGCTTTTC	AAG
MA429	CL54Contig1&&120817592933974981891687259815	CGAAACCTGCCAAGAAGAAG	AAACAACGATCATAAACTGCCA	GA
MA430	CL46Contig1&&120817593150260018086587987801	ATCTGTGAAGAGCCCTTTTCG	CTGATCAGAAGCAGCAGCAG	TC
MA431	CL42Contig1&&120817593149762559143391429482	AATGACAAAGGTGCAGGTCC	CTCTTCCGGTAAAAATGGCA	AAG
MA432	CL39Contig1&&120817593149094333825377917392	CAAAGATGTCCGAGGAGAGG	TCCTCGATCTTGTGCTTGTG	CAC
MA433	CL39Contig1&&120817593149094333825377917392	CATGAGCACCACGAGAAGAA	AAAACGACAAAGCATCCCAC	CAC
MA434	CL23Contig1&&120817593144488154616265692187	TTTTCGGGGTCTACAACAGG	GGGGGTATTCTCGAGTTTC	CTT
MA435	CL15Contig1&&120817593141452432912212375875	CTCGGGATAGAGCAGCAGAC	TAGCAAAATCATTGCTTGCG	GAA
MA436	CL12Contig2&&120817593140572831920698342819	TCTGCAGAAGAAAGGGAGGA	CCAATGGCGTCAAGAAACTT	GTG
MA437	CL469Contig1&&120817593131974758296531983909	GCGATCAATTCAAGTGGGAT	TTATCTAGCCGGTTGCCTTG	GAA
MA438	CL380Contig1&&120817593127598900303024934451	AGTGCGAGATTGAGAGAGGG	AATGGTACAGTGCCACGTCA	GA
MA439	CL314Contig1&&120817593124483875369934325847	AGGAGAAGAATTGGGGGAGA	GAAGAATGGAGGCATGCTGT	GAG
MA440	CL293Contig1&&120817593123426819937770063372	ACCACGACCTCCTCCTTTC	GGCGACATCTATGCCAAGTT	TTC
MA441	CL285Contig1&&120817593122951518647424535909	GATCCTCCGATTCTCTTCC	CTTTTCTCCTCTTCGCCGTT	CT
MA442	CL275Contig1&&120817593122366903325899089841	GCAAACCTCCTTCCAATGAA	TCGTTGCTCTTACCGCTCTT	AGA
MA443	CL487Contig1&&120817592919985956476762791698	AGATCAGTGATGGCTTCCGT	TGTCCCTGCGAGAGAAGAGT	TTC
MA444	CL487Contig1&&120817592919985956476762791698	AGGGACATATGCCCAGAGTG	GTCATGGTGGGTGAGAGGAG	CT
MA445	CL457Contig1&&120817592918347990257723750609	CCAACCAATGCTACGAAGGT	TTTTTAATCAGGTCAATCCTGC	AAG
MA446	CL432Contig1&&120817592917074506813463290982	TTACAGCTCCTCCACCTCGT	CGCCTCTCCACCAAATACAT	TC
MA447	CL418Contig1&&120817592916261736236831776227	GAGGACTTCTCGTCGGAGTG	GCTCCCCATGTGATCAACTC	GAG
MA448	CL377Contig1&&120817592914750494993386723872	GCTCATTTCTAAGAGGCAGCAA	TTCTGAACTTGGAGATGGGG	GCA
MA449	CL377Contig1&&120817592914750494993386723872	TCAACCCCATCTCCAAGTTC	TCGTTTATCTCGGTCTTGCC	AAG
MA450	CL353Contig1&&120817592913492102677115886836	CGCAGAGAAGTGGAAAAAGG	TGAAGCAACTTGATGCCTTG	GAAA
MA451	CL348Contig1&&120817592913187046748159758932	ACGGATCTTGGTTGGATCTG	TTGAGGTATGAACGAAGGGG	CCG
MA452	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES029D&&E06.esd&&120817592879325250761219533993	TACGGCCTCCAAAGAGAAGA	CTCCTCCTCCAATCATCCA	AGA
MA453	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES029C&&G10.esd&&120817592872453844230195836149	TCGAGCATTTAGGGTTTTTCG	CCACCTAGGGCATTCTCAAA	CGC
MA454	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES029C&&D03.esd&&120817592869020304540310592845	GTGGTCTGGATCCGCTTACC	CTGGAGATTAGGGCTTGACAG	CTC
MA455	CL91Contig1&&120817593155149406938342598897	TGATGCCCTTCTCATCTGTG	GATTGGATTCAAAGGCAGGA	GAA

MA456	CL91Contig1&&120817593155149406938342598897	TCCTGCCTTTGAATCCAATC	ACCTCCTGTGTTGCAGGCT	GA
MA457	CL43Contig1&&120817592974317445347987153150	GTTCTGCCTGCCACATAAAT	CCTCTGTCCAAGAACCACC	AGG
MA458	CL10Contig1&&120817592965851928838614814490	GCATCCTTCTGAAGCCGTAG	GTCAAACGTACCCAGCCAT	AT
MA459	CL8Contig1&&120817592964022345463350485055	CAATCTGTGTTGAGGAGCGA	CTACGGCTTCAGAAGGATGC	TA
MA460	CL483Contig1&&120817592962743611902173784324	CAGGATGTGCTACCTGGGAT	TGCGTGCAATCCAAAAATAA	ATG
MA461	CL453Contig1&&120817592961148717891979377741	TATGAGTAGACGGGATCGGG	GTGCTAATATTTTGGGCGGA	CT
MA462	CL438Contig1&&120817592960324036005245164453	GAAAGGTGTGCGTTTGGAGT	TTGGCTTGGATGTGTTTAC	GGA
MA463	CL409Contig1&&120817592958857537085882844663	CTCTGCGCGACTTATTGCTT	TTGTCGTTGTCTTGATCCCA	AG
MA464	CL366Contig1&&120817592956566543668713578359	ATCTTCTTGTGGGGGAGCTT	TTCAGCTCAATACCACACCG	TA
MA465	CL254Contig1&&120817592950515957096475417579	CCTGCTAAGCTGACCTGGAC	GCAACCGACAAAAGGAAAAA	TGG
MA466	CL239Contig1&&120817592949791510315729947882	CTCATCGGAAGGAGACAAGC	GAGCGGTGAATCTGAACTCC	CAG
MA467	CL215Contig1&&120817592948776196032387709505	GGAGGAGGTAGGCGGAGAG	CGAGGCTTGTTTTTCTCTGG	GA
MA468	CL208Contig1&&120817592948579901314365546044	GTGGAGCTCAAGAGCAAACC	ATGACGATGAAGATCGAGGG	AGG
MA469	CL98Contig1&&120817592980363951432562833021	AACTTCTGCTACCCAGCCT	TCACATTCTCGTTCAGCGAC	CT
MA470	CL87Contig1&&120817592979449776999494161393	TCTCGTCTCCCTTCGTCTGT	TCAGCTGCCTTCTTTTCTC	GAT
MA471	CL82Contig1&&120817592979076417125178561380	GAGCTGATTCACATCTGCCA	CAAATGCTCCAAGTGCTTCA	AAG
MA472	CL213Contig1&&120817592906017678991501011544	GGGCTCTTCTTCCTCATCCT	AACAGGGTTTACCCGAGATG	GAGAG
MA473	CL213Contig1&&120817592906017678991501011544	CATCTCGGTGAAACCCTGTT	GGTCAACCAGTTGGAAAGGA	TCTCCA
MA474	CL120Contig1&&120817592900539430491149766060	TGACCCCGATCTGTAGTCC	GGGGACAGATCCAGAGAGAG	CT
MA475	CL65Contig1&&120817592895983314679248191436	AGGAGGAAGAGCTCGAATCC	TTTGTGGCTATCCAACCCTC	TCG
MA476	CL60Contig1&&120817592895444828894483328501	CCATCACAGTTCTTCGAGCA	TCGAAACAAAGAAAATTGCC	AC
MA477	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES029D&&H11.esd&&120817592883923435171021587500	TGCTGGTGGTCTGTGATGTT	CCCAATCCCCACCTAAAAGT	TTTC
MA478	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES027C&&G06.esd&&120817592814637588785638023262	TGGCAGTGCAAGATTTTCTG	TCCGGATAACCCTAAATCCC	AAG
MA479	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES027C&&D02.esd&&120817592811773971806316793312	GCTCTCCCTGATCTGCTCAC	TGTCACGGAGGTCTTCTCT	CCT
MA480	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES027C&&B10.esd&&120817592810498864114897161414	TGTGGAAGAAGGGAGAAGGA	TTGTTATTAGGGCGAATGCC	ACC
MA481	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES027C&&B10.esd&&120817592810498864114897161414	AGAGGAGACGTGCTGTTCGT	TCGCGTTTTTCATATTCCTCC	AGA
MA482	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES027C&&B10.esd&&120817592810498864114897161414	GGAGGAATATGAAAACGCGA	AACGGTGTCAAGGGGAAAG	CACTC
MA483	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026C&&E12.esd&&120817592791019358352161051743	AGACCACCTTCATCTGGTG	CCATGCAGACCAACAGACAC	CCG

MA484	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026C&&E02.esd&&120817592790379469583083154509	GGAGAGGAGGGGAAAGAAGA	TGAATCTCCGGAAGGAATTG	CT
MA485	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026B&&G08.esd&&120817592785678462062288196186	GGGGATGAGAGTGAGGATG	GGAGTCCCTGAGAGCTTGTG	AGA
MA486	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026B&&F04.esd&&120817592784157367135970756902	GGGGAATCAGAAGGCTACAC	TCCACATACATCACCCTG	AG
MA487	CL172Contig1&&120817592984958360819010638882	ACACATGGTCAAAGTTGGCA	GGATCGCCTTCCCTATCTTC	GAGG
MA488	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES028D&&B10.esd&&120817592847189345151816706097	CTCTTAGTTGCTTTTGCCCCG	GGCATCCCCATCCTAATCTT	GAA
MA489	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES028B&&H03.esd&&120817592836561625832669725090	ATGTAAGAAGCGGGTGGCTG	TCTCAATCGAGTGATACCGAGA	AT
MA490	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES028B&&A10.esd&&120817592832573293920391528638	AGCAGCAGAGTTGTCCATGA	GCTATGGACAGCTGGAGAGG	CAC
MA491	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026B&&C02.esd&&120817592782413535396280451694	CCAAAAAGAGGTCGCTTCAG	TCTGTATGGCCCCTCAACTC	CCTCTT
MA492	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026B&&A06.esd&&120817592779823756419668316254	CCTCCAGCAATGGATACGAT	AGAGAAGCAGTAGCACCCCA	AT
MA493	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026A&&G07.esd&&120817592778870690920199246408	GAGAGGAAGTGCCGTTTCTG	CCTCTCTCTCGATGACGG	CTC
MA494	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026A&&G02.esd&&120817592778199000615568848002	GATCGTCGAGCGTTTTGATT	ACAGCATTACCCGAAACGAC	AATGGC
MA495	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026A&&D06.esd&&120817592775291069380083908262	AGTTGTGGTTCCTCTCACGG	ATGCTTCTTTGTCCCACCAC	GAA
MA496	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES025D&&B12.esd&&120817592767994103431600713988	TTCTCTCTCCCGGTATCT	TTGCTCCTCGTCTTCACTT	CTC
MA497	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES025C&&G03.esd&&120817592764618530997855419528	GGTCAGACAGGAAGAAGGGA	CAAAGCAGCTGGATTCAACA	GAA
MA498	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES025C&&A07.esd&&120817592759018437929891786333	ATTCACAGTGGCTTAACCG	GATCCACAATGGATTACGGG	TA
MA499	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES025B&&G07.esd&&120817592756998970776834899289	CGGTTCTCTCTTTTTCTCG	CAAACCAGGGGAAGATTT	CAG
MA4100	CL197Contig1&&120817592986733281593210062250	ATGATCACCATTTCTCCCA	GAGACGATGAGGGGAATGAA	AG
MA4101	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES027A&&D10.esd&&120817592802997761559635655333	GACGATTGGGCGTTTTCTTA	TTCTGCTTTGCTTGGACCTT	GAT
MA4102	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES026D&&D12.esd&&120817592797087067470629690425	CTCACCCATTTTGTGGTTTT	TGTGTTAACCCAATCTGGCA	CTC
MA4103	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES025B&&A04.esd&&120817592752747300290351959639	GGCTGGGAAGCACAGAGATA	GGCTCTCATGCAAACAGTGA	GA
MA4104	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES025A&&E05.esd&&120817592749437454930548269428	GGTTATTGGAGCATGCTGGT	CCCTCTGAGTTCCGCACTAC	GA
MA4105	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES025A&&C04.esd&&120817592748184327035813438402	TCCATCGTTGCACGAATACT	GCTATGGTCACATGTGGTGC	CCT
MA4106	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES025D&&H04.esd&&120817592771943714292035523746	TAAGGGATCCATGCAGAAGC	TGAAAGAAGATCCACCCAG	CT
MA4107	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES009C&&C08.esd&&120817592534647343561072655054	GCTTATCGACCCGAATTCAA	GATCCCTGGAAATTGCTGAA	CAG
MA4108	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES009B&&D09.esd&&120817592529620923734275738639	AGCAAAGAGGGAGGAAGAGG	GTCTCCGCTTTCTGCAAT	AAGA
MA4109	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES009A&&C02.esd&&120817592518695877924082717170	CGGATTGGGTCTGGTTTCTA	AATATCTGCACCCAACGAG	CAC
MA4110	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES009A&&B02.esd&&120817592517621860829667299366	TCTTTGGGGCTTCTGCTTTA	TTCCCGCTAGAAAACCAAGA	TCT
MA4111	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES008D&&F07.esd&&120817592514138309755082146848	CAAGGACCCAAAGGAGATCA	GGAGCTCAAGCTACCACAGG	AGC

MA4112	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES008A&&H07.esd&&120817592498330983466441181142	TCTTTGTCTCGGCTTCTTCC	AAATCAACACGAATCCTCGG	TC
MA4113	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES008A&&H04.esd&&120817592498010372370064182613	CTCCCCTCTGCCTCTTCT	CACCAGGGGTCTTCCTATCA	TTCG
MA4114	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES008A&&C07.esd&&120817592493919370861824769761	TGGTTTTGTCTTTTGTCTCC	TCTCGAAGACAACCATGCAG	CCGC
MA4115	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007D&&G05.esd&&120817592492420674171883438906	AGAAGCCCAAAAAGTGGGAT	TTCCATGGTCCCTTGTAAGC	GAT
MA4116	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007D&&E09.esd&&120817592491370862377146516317	CATCTCCAAATTCGAAGGGA	CCCTAGAAGAGAGCGAGAGAGA	CT
MA4117	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007D&&E04.esd&&120817592490542705064821927881	GAAGAGCCCTTCGTCTCTC	GGTGAACCCTCAAGCAACAT	TC
MA4118	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES010A&&H06.esd&&120817592582218239415190867577	AAGTAATGGAGGTGATGGCG	TTGTTGTTCTGTGGCACTC	GAG
MA4119	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES010A&&D10.esd&&120817592579069855261665924914	CTGGTACACCGGAGAGGGTA	AATGGGAAATCGGGTAAAGG	GAAGAG
MA4120	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007D&&A02.esd&&120817592486115174251533333638	GATGATTTCTCCGGTGAGGA	ACCCTCTCTCTCGTCTTCAT	GAC
MA4121	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007C&&E07.esd&&120817592483362172656434425173	GGAACAATGTAGGCAAGGGA	CCCACGAGTTGGGTTTAGAA	AG
MA4122	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007C&&D09.esd&&120817592482516113197952252091	ACAGTGGGAGTGCTCTCGTT	ACGGACCATCGGATACCATA	CTCCGC
MA4123	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007C&&D01.esd&&120817592481291119118582604740	GAAAGAGGATGCTGCAAAGG	TTGCTTAAGCGCAAAATCCT	CAT
MA4124	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007C&&C11.esd&&120817592480724422708519213928	GCTGGGTCCGACATTGATAC	TGAAGCTTCTCGAGTCCAT	TGA
MA4125	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES010B&&D11.esd&&120817592586322205849749198784	GGGGGTTCTTCTCCCTTTCT	CTCCTGATCTGAAATCCCCA	GA
MA4126	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES008D&&D03.esd&&120817592511296332826191564844	TCTCTCCATTCCGCAAGTCT	TCCCATCCTTCATTTCCAAG	CA
MA4127	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES008C&&B08.esd&&120817592504798161991316656865	ATGAAGTGGAACGATCAGCC	ATTCAGCTTCTTCTGCGA	GA
MA4128	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES007B&&H11.esd&&120817592477284402092740529032	GAGGGTTGGATAGCCACAAA	GGCTGTCAAGTGCACAAAAA	CTT
MA4129	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES006D&&C05.esd&&120817592460738378058286280916	AGGGGTAGTCCAAGCATGA	CACAGCTGCCACTATCCTCA	GT
MA4130	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES006D&&A02.esd&&120817592458883507339398028713	CCCATGTCACACAGGTGAAG	CAAGATGAACAGGAGGGCAT	TCT
MA4131	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES006B&&D07.esd&&120817592447042951779141502962	TCGTCACTCTCGTTGTGGAG	TGAATTGCAGCTCGTTCTTG	GAA
MA4132	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES006A&&G02.esd&&120817592441327172111734161775	CCCTAATCTCCGAAAGCTCC	CTCCCGATCGCAGTAGTAGC	GA
MA4133	MA4_LEAVES_INF_MF_ES&&MA4LIMFES006A&&E04.esd&&120817592439713643085284747345	GGGTTTCATCTGTTTCGAGAT	TATGGTCGCACTTCATCCAA	AG

locos	ID da sequência consenso	primers_forward	primers_reverse	Repeat
MACV1	CL115Contig1&&120817594111924593475262649633	CAGAAGGAATCCACCCTTCA	AACAGACTCGAACCCAATGC	CCG
MACV2	CL66Contig1&&120817594107938754410350152817	GCGTCACTCATTACACACACC	CTTCTCTCCCTCCTCGTCT	GAAA
MACV3	CL38Contig1&&120817594104855194244129046819	ATTCAGCTCAATACCACCGC	GTCAAAACGTACCCAGCCAT	AT
MACV4	CL21Contig1&&120817594102760177541132904842	TTGCAAATGCCTTTGTGAGAG	GGGCTCCACAGAAGAGAGAG	TC
MACV5	CL474Contig1&&120817594092896879399944123210	GGGCCATGCTCAAATAAAAT	CGAACCTCTGCTAACGAAG	TCC
MACV6	CL373Contig1&&120817594087361884082951675239	GACGAAGGACACCTTGAAGC	AGGGTACCAGCGACATGAAC	AGG
MACV7	CL338Contig1&&120817594085530947071099391849	GGGAAAGACAACGCAAACAT	TGCCTTTTGGAACTTTCACC	AGAA
MACV8	CL281Contig1&&120817594082730186086779012519	GGGACATTTGCAGTCAACG	GATACCAATGGTCCGGAATG	GA
MACV9	CL276Contig1&&120817594082421995793795975707	GCAATGCCCGATTTACTGAT	TCAGAAGTCAAAGCTATTGAGGC	TTC
MACV10	CL167Contig1&&120817594004159909651875877916	GGGTGACCAGGGAAAGAAA	AACAAAAGTTCTGCCCAACG	AAG
MACV11	CL113Contig1&&120817594000517269852665205460	GAGGTGGCCGAGGATAGAG	GCAGCCTCCTATGTTCAAGC	CAG
MACV12	CL113Contig1&&120817594000517269852665205460	GCTTGAACATAGGAGGCTGC	CTCCACATCAGAAGGGAAA	CT
MACV13	CL109Contig1&&120817594000240290879710881324	AGACAGCACCGAGGGAGTAA	TTGGACTTCTACAGCGGGAT	TTC
MACV14	CL104Contig1&&120817593999824284401018645555	AGATGTCACCCAAAAGACGG	AGCGTTCGAGGTGTTTGAGT	CGG
MACV15	CL27Contig1&&120817593992012499378845189344	TTCACACGCACAAAGATTGG	TGAACAAGATCAAGGAGGGG	GA
MACV16	CL27Contig1&&120817593992012499378845189344	ACGCACAAAGATTGGGAGAG	TGAAGCCACTGATCTTCGTG	CA
MACV17	CL22Contig1&&120817593991390256527190057360	GAGCTGATTCACATCTGCCA	CAAATGCTCCAAGTGCTTCA	AAG
MACV18	CL8Contig1&&120817593984875547984425134301	TCAGCAACATGGAAGTGAAGC	TAGATGGACGACGGGACTTC	CTT
MACV19	CL535Contig1&&120817593983642886225471805779	CACCTGATCTCACACGATGG	ATGGTGAGGCCTTTGAACAC	AGG
MACV20	CL530Contig1&&120817593983312760512837065766	TGAAGCGAACCCCAATAAAG	ATGGTGGAAGTCGACGGTAG	TC
MACV21	CL530Contig1&&120817593983312760512837065766	CTACCGTTCGACTTCCACCAT	AGGAGTTGGGAGTTGGGAAG	TCA
MACV22	CL432Contig1&&120817593978568215540362771745	CCGTGCTCCGTGTTTATTTT	CCCACCTAAAACCTAACCC	GAG
MACV23	CL406Contig1&&120817593977219139229786549360	ACGAAGAGGGTGATGCTGTC	CGTCTCTCACTCTTCCTGCC	GTA
MACV24	CL497Contig1&&120817594139264304138512152885	ATGGTGACGAAGGGTACTGC	ACAAACCGCTGCTTCTTCTC	GGA
MACV25	CL467Contig1&&120817594137664507640656918450	GCTTTGCTCTTTGTTGGAGG	ACTGTTGGAAGGAGGACGTG	AG
MACV26	CL320Contig1&&120817594124978326542153091298	CCCTTCCCTTTTCCTCGT	CCCCTGCATATGGACTGTCT	GAGG
MACV27	CL169Contig1&&120817594116168221646130617787	CACGGCACAAATAATGCAGAT	AGGTGAGAGGAAAGGGGAAA	TC

MACV28	CL364Contig1&&120817593975299592465737211158	ACAACGTGTCGACCCCACTTC	CCGCCAATAAAATTAGGGTT	CCT
MACV29	CL329Contig1&&120817593973782902846453693791	TCGTCAAGGTCTGTATGCGAG	CTGCAAGAGGACATCAAACAAG	TAAT
MACV30	CL305Contig1&&120817593972870922115458711715	CTCGGGATAGAGCAGCAGAC	CGATCCATAAGCATGCACAC	GAA
MACV31	CL289Contig1&&120817593972081202736511276102	GCAAATCGATCTCGAAGGAG	GCACCCAGGCATACTTGAAT	ATCTCTCC
MACV32	CL196Contig1&&120817593914061500023488259574	GGCCTGCACTGACCAATAAT	GGATTTAGCGTACGAGGAGC	AG
MACV33	CL176Contig1&&120817593912647815564454707325	AAATAGGAGGCGGACTTGGT	GTGGCCCTGGTGTAGTCTGT	GATCCC
MACV34	CL141Contig1&&120817593910431582171854274711	TGCTTCGTGTGGTAGACGAG	GAGACCAACACCAGCACTCA	GA
MACV35	CL116Contig1&&120817593908896761986890934742	TCGAGAGATCAGTGATGGCA	TGTCCCTGCGAGAGAAGAGT	TTC
MACV36	CL116Contig1&&120817593908896761986890934742	AGGGACATATGCCAGAGTG	GTCATGGTGGGTGAGAGGAG	CT
MACV37	CL105Contig1&&120817593907927400492171191895	ATCCTTCTCGATCGATCCCT	GGGGATCCTCTTCTTGTG	AGC
MACV38	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027D&&G04.esd&&12081759389238175330546	GCCCTTCTTACCACCA	TCCACCAACCTAACTGTCCC	CTA
MACV39	CL536Contig1&&120817594024123523681548480083	GTCTTTTAGCCCGATCCTC	TTAGCAGGGGTGGTCTCTG	TCATT
MACV40	CL513Contig1&&120817594022857855680412348246	AACTGGTCTTTGGGCTTCT	AATTTGGGAGAGGAAGTGGG	TTC
MACV41	CL494Contig1&&120817594021862231238318857432	CCAGGACGAGTTATTAGCCG	TGGATCTCTTTGACCCGTTT	CT
MACV42	CL464Contig1&&120817594020359228220981297320	AGCCCAGAATCGTCAACAAC	ACATCTGCCTGACGTCGC	AGA
MACV43	CL425Contig1&&120817594018282372168827827889	TTGCACCTCCAATCTTTTCC	CACAACTGGTGCTCCTCTCC	CGAT
MACV44	CL414Contig1&&120817594017763179380189176288	GGAGGGAGCTCTGGAGACTT	AACTTCAAAGCTGCCAGGAA	TGA
MACV45	CL400Contig1&&120817594016990571662449838827	GACACATGATAGAGCATGGGAA	CGTTGCCTCCATATTCTGGT	AG
MACV46	CL400Contig1&&120817594016990571662449838827	ACCAGAATATGGAGGCAACG	ACAAGCAAAAGCGAACGAGT	TCT
MACV47	CL386Contig1&&120817594016139257414729250908	ACCGCAGAACCAAAACGA	CGTTCCGTAGGTAAGGTCCA	GA
MACV48	CL255Contig1&&120817594009511346326859056591	GAGGTGTTCGAGGTGGATGT	CTTGCGGATTCTTCAGGAG	ACTTG
MACV49	CL195Contig1&&120817594005822495493985360347	ATGAAGTAGAGCTGGCCAA	GCTACATGGGATCTGCTTC	AGGCGA
MACV50	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027C&&H05.esd&&12081759388476663206102	GGGGGACAACCACATAGTCA	AAAGATTGCAGCTAAGGGCA	TC
MACV51	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027A&&H08.esd&&12081759386749791166862	GACCAACTCGCCCTCCTT	TTGTTGCATCCAACCACTGT	CT
MACV52	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027A&&C11.esd&&12081759386187191957041	GGGATTCTTCCGCTTGATCT	TGTATGAACCTGGTGGCGTA	CTC
MACV53	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027A&&C07.esd&&12081759386136360967629	CAGTTGCTGTTTTGAAGCCA	GAAGGTCATCCGCCAATATG	TG
MACV54	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS026D&&G11.esd&&12081759385852943323909	AGCTTTTCTTGATGCCTGT	TGCTCCAGGTTGCTCTTCTT	CAG
MACV55	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS026D&&G11.esd&&12081759385852943323909	GGTGAACGAGGAGAGACAGC	CGAACAAAGGAATCAGCACA	AGA

MACV56	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS026D&&A05.esd&&12081759385413943271561	GGACCTCCGAACCTCGACG	TTCTCTTGAGTCTCCGCAT	CGC
MACV57	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS026C&&H03.esd&&12081759385308648245275	GGCTATTGAGATTGAAGCGG	TTTCTGGAGTTTTGCTGCCT	CTC
MACV58	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS026C&&E01.esd&&12081759384933765423571	GCTTTGAACTCTTGCAACCC	TCACATTCTCGTTCAGCGAC	CT
MACV59	CL7Contig1&&120817593946423800964437751123	CTGATCAGAAGCAGCAGCAG	GAAGAGCCCCTTCGTCTCTC	GA
MACV60	CL533Contig1&&120817593945034619493221335604	TCCCAGTACCCCTCTTTCCT	ACCACAGCAAACCCTTCC	CTCCGC
MACV61	CL523Contig1&&120817593944545296791571577152	GTCTCCACTCCAGAAGCCTG	TGTCTGACTCCGTAGCTTGG	GA
MACV62	CL499Contig1&&120817593943343727407721159571	CCAGTTTCCCCTTTTAGGGA	CAGCTGAGCAATGGTTTCAA	TTTTTA
MACV63	CL463Contig1&&120817593941559529692698725061	GACATCCTTGGTTGTGGCT	AAGCTTACGGTCATGGAAGG	TGC
MACV64	CL415Contig1&&120817593939159821573287223798	CTCACCCACCAAGCAATTTT	TACTGGGGCTTCTCAAGGTG	TTC
MACV65	CL384Contig1&&120817593937176420599634880338	GGGGACTTCGCGTTATTTCT	GGGCATGTTGCTCTTCTCTC	CTC
MACV66	CL375Contig1&&120817593936686297230773586403	AGCTGGCAACCTCTTTCTCA	TTGCTTATTGCAAGATCCCC	GA
MACV67	CL302Contig1&&120817593919453947942993802429	GAAGGCAAACTTGCAAAGC	AGACCAACTCGTGCATCTCC	GGT
MACV68	CL226Contig1&&120817593915720125125986394686	TTCCTTTTCGAGGAGGTGAGA	TCGACGACGACAATTACAACA	CTC
MACV69	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS026C&&D03.esd&&12081759384806486271378	CTGTGCTCGATGAAAACAA	TGGGAGAGTGTGAAGCACAG	TCT
MACV70	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025D&&G05.esd&&12081759383098024675239	AGGAAGGCAAGGTGGAAGAT	ATCTTGTCTGCTGGAGCGT	AGA
MACV71	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025D&&F04.esd&&12081759383041155292513	GCTGAGGTCACGGCTAAAAG	TTGGTGCAGATGTGCTTCTC	TGG
MACV72	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025D&&F03.esd&&12081759383022820838015	GGGAGTGGTGAAGTTATTGTAGG	TCATCACAGAACCCTCTCTCTT	AG
MACV73	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025D&&D03.esd&&12081759382843302859094	GGGGTCGTCCTCCATTTATT	AAGAAGCGGCAGATCTGAAA	CTCTC
MACV74	CL240Contig1&&120817594080745698226249638193	TGATGCCCTTCTCATCTGTG	GAAGGTTACCTGCTTCGAG	GAA
MACV75	CL223Contig1&&120817594079865639567798809891	GATCTCGATCTCCGCTGAAG	TGATCATGGTGGGTGACATT	CAT
MACV76	CL174Contig1&&120817594076549797235436963827	CCCAAATCAGAACCCTCTCA	GAAGTGAGAAGCCAAGGACG	CCG
MACV77	CL155Contig1&&120817594075214428698782964783	TCCATCGAGCCTGGACTTAG	TGGGTTTCGACAGCTTCTTCT	GCC
MACV78	CL79Contig1&&120817594069779406310357839687	CCTCTGTCCAAGAACCACC	GTTCTGCCTGCCATAACAAT	CCT
MACV79	CL68Contig1&&120817594068817500585027792171	TCTTCAAACCCTCTCAACGG	CAGAGAAACGCAAAGGAGG	TCT
MACV80	CL63Contig1&&120817594068315618446741878587	TCAATCTCAAGGTCAAGGGG	CGTCCAGTAGCTGCTAGTCTGT	TGG
MACV81	CL55Contig1&&120817594067848647055130581205	TAGGCTGCTTGGTCTGTGTG	GTTCTGCAAGAAGCTACGG	GAA
MACV82	CL51Contig1&&120817594067328885480868211105	GACGATTGGGCGTTTTCTTA	GGAGCCTTGAAGTCTTCTGC	GAT
MACV83	CL36Contig1&&120817594065766257864450541713	CTTGGCTTGGAGAAGGTGAG	GAGAACCATGGCAGCCTCTA	GTG

MACV84	CL33Contig1&&120817594065169414444257269147	AATGACAAAAGGTGCAGGTCC	CTCTTCCGGTAAAAATGGCA	AAG
MACV85	CL3Contig1&&120817594054490857891887746291	ATTGGGCTGTAGCCATCAAC	GGGGAGCAATCAGAAGGCTA	TC
MACV86	CL279Contig1&&120817593971547958525486624060	ATCATCCGGTGTGAGAGGAG	CCGTGCGATGTCGAAGGTTAT	TTCC
MACV87	CL265Contig1&&120817593970740217005296603160	CCACCCTTATCCCTTTCCTC	AGCTGCGGATGGAGTTCTTA	TCC
MACV88	CL236Contig1&&120817593969320603857896616514	CACGTCCCTTCACGAACTTT	AGCACAGCCTACCAGGAGAA	GAA
MACV89	CL140Contig1&&120817593963392329500113202480	GCCGCAGAGACCAACTACTC	TACTCCCTCGTGACCACCTC	GCG
MACV90	CL124Contig1&&120817593962395849998732413171	GAGCAAACCCTCCATCTTGA	ATTAGCCACATCTCCATCGG	TCA
MACV91	CL74Contig1&&120817593957855910333508121971	TGGGCCAGAGATATGGAAAG	ACAACAACATGAGCTTCCCC	GCT
MACV92	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027C&&D02.esd&&12081759387965330589973	TCTGTCTCCCAAACCAGACC	AACCTCGTACTCGATGGTGG	GAA
MACV93	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027B&&H12.esd&&12081759387591478100976	GGGGATCCAGAGAGAGAGAGA	AGAAGTGCCCCCTTGAGTT	GA
MACV94	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027B&&G03.esd&&12081759387473253216576	GGGGTCAGCAGAAAACCTCAG	TCATCTATTGCAGTCTTGCCC	TTA
MACV95	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027B&&G02.esd&&12081759387441893219936	CCGTTTCGCAATAGGTTGTTT	AACAAAATGCCGGCAACTAC	GAGC
MACV96	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027B&&E01.esd&&12081759387244274314588	TCGACGACGAGTAGGGATCT	CTTACCCAAAGGCCATAAGC	TCT
MACV97	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027B&&C10.esd&&12081759387166889686932	CATGGATTTCTGCCTTGTT	CCTTGCCGTAGTTCTCGAAG	CAG
MACV98	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS027B&&C07.esd&&12081759387098423462511	CAAGCAGGAGGAGCATAAGG	GCCATGGATCTTTTCCTTGA	GGA
MACV99	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025D&&A11.esd&&12081759382485131755853	GAAGCTGAACCCTCAACCAA	AATACCTCAACTGTTCCGGCG AAGATCAAATCTACCTTCTCCAT TT	GA TTA
MACV100	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025D&&A08.esd&&12081759382465465655834	ACTTGACTGCTACAACCCG	GCGACAAAAACTTGTGGGAT	CTC
MACV101	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024D&&F08.esd&&12081759379536848500488	CGGAAACGAGATAAGGCAAA	ATGGAACAAGAGACATGCCC	CTC
MACV102	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024D&&B09.esd&&12081759379063912713806	AACTTTCGCCCTTCATTCT	CAATCGTCAGTTTTTGGGAAA	GA
MACV103	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024C&&G04.esd&&12081759378637597801554	CAGCCTGGAGAGAGATACCG	CCTTCTTCACTGAGCTTGGG	AG
MACV104	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024C&&C01.esd&&12081759378312247783498	GGGGACTACAAAACCTATTCCACA	TAACAAAGAAGTCCGTTCCC	AG
MACV105	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024C&&B08.esd&&12081759378274506459284	CAACTCCGAGCAGATGATGA	GGTTACCTTTGCGTCTTGGA	TTA
MACV106	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024C&&B02.esd&&12081759378198144946799	GCAACATGATAGTTGATGCTTCTT	AAAATCTTCGATTGCCGATG	CGC
MACV107	CL187Contig1&&120817593966455511883032493202	CGAGATCCGCTTCTTCTCC	CTTCTTGGCGTTCTCTACGG	CTCGCTG
MACV108	CL179Contig1&&120817593965851534554045018295	GGTTGCGTCTCCTTCTTCC	GCCATAAACACACGCAAC	GGA
MACV109	CL175Contig1&&120817593965524205694516028403	TCTCCGGCATTATGTTCTCC	CTCTAAGTTTGGCAGGAGG	CTC
MACV110	CL170Contig1&&120817593965216686122143909138	CCGAAAAGATCTTCCATCAA	TGCACAATGAATCCAAAGTTTC	CTACA
MACV111	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024B&&F04.esd&&12081759377966583531939	CGTCTGTTGGATACAGCGAA		

MACV112	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024A&&C10.esd&&12081759376825371154328	TTCCAGATAATCTCGTGGGG	TGTCAAATACCCGAAAAGCC	CTC
MACV113	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS024A&&A01.esd&&12081759376355838631124	TATAGAACGGCAGCACCCAT	ACCAAATGTGGCCGAGTAAG	CAT
MACV114	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS023D&&H06.esd&&12081759376258410515438	TCTATGCGGATTAGCTCGTG	GCTTGATCTTCTGGGCTTG	GCG
MACV115	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS023D&&H06.esd&&12081759376258410515438	CCAAGATCCAGGACAAGGAA	GAAGTGGTTGGCCATGAAAG	AAG
MACV116	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS023D&&G03.esd&&12081759376047986976515	GGGGGCTCTTAGATCTTTTCC	GGCAATGATGTTGTGAGTGG	GA
MACV117	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025C&&A11.esd&&12081759381499545051259	GCGATCAATTCAAGTGGGAT	TGTGAGCTTACTCTGGGTG	GAA
MACV118	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025C&&A09.esd&&12081759381468440724839	GGGGAGAATACCACACAGGA	AACTCTATGGTGCCATTGCC	CTTC
MACV119	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025B&&H12.esd&&12081759381383035328536	ACATCTTGCGTGCCTCTTCT	GAGCTGTGTGGAACAAGCAA	AGA
MACV120	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025B&&G08.esd&&12081759381289482834954	CCTTTTGGAAATGGTTGCAGT	ACTGCAGTTTCCCGATTGTT	TATT
MACV121	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025B&&A09.esd&&12081759380673418438771	CAGGGGTTGAGCAAAAACAT	AAGGCCCAGAAGGGACTTTA	TAA
MACV122	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025A&&G07.esd&&12081759380456171116265	GAGACGCGAAGGAATTATCG	AGGTTGGCTGGTATTGTTCCG	GA
MACV123	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025A&&D09.esd&&12081759380179723140005	GATCTACCAGAGTACGCGGC	TCATTGAAGAGTTTCGTGCG	CCT
MACV124	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025A&&B08.esd&&12081759379995708033179	TCATTTGCGTGTGGAAATTG	TCAATGGATCCTTCCAAAGC	GA
MACV125	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS023D&&A03.esd&&12081759375441524718653	CAGTTGGCTCTCCAAGAAGG	TTTCCCAGCATTTTCTGGTC	AGC
MACV126	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS023C&&C03.esd&&12081759374791358961405	GGCCTCGAGAAGAGTAAGCA	ACTCCTGGAAGTCAGTTCCG	GAC
MACV127	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS023B&&E08.esd&&12081759374216242116951	GCTCCCTTGTCTTGTGATG	TCAGAATGCTCGTCATACGC	GA
MACV128	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS025C&&G02.esd&&12081759382055537412475	AATCTTGGCATATGCTTCCG	GCATGTGAGAGGAATGTGGA	ATGCTC
MACV129	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS023C&&H02.esd&&12081759375293134498668	GATTAGTCGCAATGGAAGCC	TAATCGTCGTAAACCCAGGC	TTCCC
MACV130	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS023A&&C09.esd&&12081759371922336622591	GCTTCCTTCTCCCGACTCT	TCGATATTCCCGTCTCCAAG	CGAAGC
MACV131	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008D&&D10.esd&&12081759351833411288735	CGAAACTATGCACGCTTCAA	TAGTTCCACTGGCTGGAGCA	TGC
MACV132	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008D&&D05.esd&&12081759351784562271491	TCGTCTTCTCCCTCGTGTC	AGGCATCCTCTTCTGGGAAT	CTC
MACV133	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008C&&F01.esd&&12081759351305516345491	GCGTTGTTCTCCCTTATTCG	CCATCTAGGTGTTGTGGGCT	AGA
MACV134	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008B&&H11.esd&&12081759351008671013405	ATGAAGAAGGCTGGGGTCTT	GCGTCTCGATGAACCTAAGC	CCT
MACV135	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008B&&H04.esd&&12081759350956655413397	CGATGCGAATTCTTTAGGGT	TGTAGGCAAAGCGAAGGTCT	GACGGC
MACV136	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008B&&H01.esd&&12081759350926945245864	CTCATTCAAAACGCACTGGA	ATTCGAATAGCTACGGACGC	GCCGCT
MACV137	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008B&&G04.esd&&12081759350853676799125	TATCTGTTGGTCGGAGAGGG	CATCGTCCGTGGAAATCTCT	CGC
MACV138	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008B&&C05.esd&&12081759350219863013309	AGAATGTGGTGGGACGAAGA	GGAGGACGAACATTGGAAAA	AGA
MACV139	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008A&&F04.esd&&12081759349742371233898	GCACAACAACATCGGAGACA	TGCAGGAGTGACAGGATGAG	GA

MACV140	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS007C&&C01.esd&&12081759347472483322358	GATCTGGAAACATCCTCCGA	ATTTAATTTTGGCCCCCTTG	TTC
MACV141	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS007C&&A06.esd&&12081759347278312575303	CCAGTTGGAAGGGAACCTCA	ATTTTGGGTGAGGAAATCCC	AT
MACV142	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS007B&&H01.esd&&12081759347151919243217	GAGCGAACGAGAGAGAAGGA	CCCAAGTTTGCCATGAAAGT	GA
MACV143	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS007B&&G10.esd&&12081759347132237961779	GATCCTCCCTCGCTCGCT	AGTCTGCTTACGCTTCTCGG	CCGC
MACV144	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS007B&&G04.esd&&12081759347052079515868	CGTTGCAGAAATATGCGAAA	GGGGAGAGAGGAAAATCGTC	CCA
MACV145	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS007B&&A05.esd&&12081759346371476048955	GGGGTGCCAAGTACTCTCT	AACCCAAGTTTTTCAGGGCTT	CTG
MACV146	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS007A&&F07.esd&&12081759346045804185955	CCACAAAGGCTCTCTGAAG	GTGCGCATCACAAAAGAAGA	CTGC
MACV147	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS010D&&H09.esd&&12081759358983220237328	CTCCTCCGTGTGCTCTTTC	TGTCTTCAATGCTGTAGCCG	AGT
MACV148	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS010B&&E10.esd&&12081759356765096842128	TTTAGGCATTTCCAACCTGC	AGGGACGTACATCTTGTGGC	CTC
MACV149	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS010B&&A02.esd&&12081759356258266979481	GAAAGGAGAAGGGAAGGGG	CTCTCTTCTTCTCCCCACGC	AAG GAGGAAG AAGA
MACV150	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS010B&&A02.esd&&12081759356258266979481	GGAAGGGGGAAAGAAAAGAA	GCTGCATCCACCTCTCTT	AAGA
MACV151	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS010A&&F12.esd&&12081759356016765601333	GGAGTAGGAGCCAGGAGCTT	GGATGAATACTTGGGAGCGA	TTC
MACV152	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS010A&&E03.esd&&12081759355765613681722	GGGTCCTTTTCCAATCCTTT	AAGTTGCGGGAGGAAAACCTT	CT
MACV153	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS009D&&H04.esd&&1208175935544775070683	CGTGAACGCTTCTTCTTCC	TGCATTACAGTTGCTCTTTGG	GA
MACV154	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS009D&&C12.esd&&12081759355375390981476	CCTCGAGGTCTCTTCTGTG	AGTCTCCGGAACATGGACAC	AAG
MACV155	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS010C&&F04.esd&&120817593580496071526013	GGGGACCCTCTCTCTCTCTC	AATTCGAGAACTGGCCCTT	TC
MACV156	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS006D&&H12.esd&&12081759345527293607312	TCGAGCATCTTCTCTCTGTT	TCGTAGTTCTCCAGCTCCGT	AGA
MACV157	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS006D&&H10.esd&&12081759345504924547151	CATCAGCATCAGACCTCGAA	CGAGGAACTGAAGCACTCCT	GGA
MACV158	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS009C&&H02.esd&&12081759354996801655794	ATCTCTTCCCCTCTCTCCG	AACTCATTTGGTCCAGGTGC	TCG
MACV159	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS009C&&F12.esd&&120817593548978434786453	TGGCGTGCTCATAACCAAAA	ACTGAAGTGCAGTGTCTTG	TGA
MACV160	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS009C&&E01.esd&&12081759354743911256335	GGGGGATTTTGAGGAATGAT	AAATTTTCATGCGTCTTTGGC	AG
MACV161	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS009C&&A12.esd&&12081759354443363148408	CAACGCACAAAACATGGA	AGGTTGAGAGAAGGTGGAGGT	GCA
MACV162	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS008A&&A11.esd&&12081759349141595204247	CGCCAAGTTTTTGTGAGGTT	TACCGAATAATGAGGCTCGC	ATCTG
MACV163	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS007D&&A11.esd&&12081759348173756380823	CCGCGAGAGAGAGAGAGAGA	CGTTACACTTCACACGCACA	TC
MACV164	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS009B&&H02.esd&&12081759354204079905288	AGAAACAGAGAGAGCAGCGG	CTTCTTTTTCTCCCCAAC	AGA
MACV165	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS006D&&A05.esd&&12081759344868027413708	GACACAGGTCACGAGAGCAA	TATTGACACCACTTACGGCG	AT
MACV166	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS006C&&G04.esd&&12081759344592130625809	CAGTGACTTGGTGCCTAGC	AATTCTTCTCCCGCATCTT	GCG
MACV167	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS006C&&D02.esd&&12081759344379316655717	TCGAGATCTCCGCAATCTT	GGAATTTGATGCAGGAGGAA	GAG

MACV168	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS006B&&H08.esd&&12081759343791858410952	GCAAAAATGTCATTCGGGAG	CGTAGCCTTCTCCAACGAAG	CCA
MACV169	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS006B&&D09.esd&&12081759343358916416146	CAGGGCAGAGAGAGGTTTTTC	TCTTCCCCATAACTCGCTA	TC
MACV170	MACV_LEAVES_INF_MF_LS&&MACVLIMFLS006A&&D05.esd&&12081759342568186815696	TCTTACCAACCATGCGTTCA	TTTTCCAGACCGTTGGTTTC	AAAT

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)