

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

**GLICEROL NO CONTROLE DA SIGATOKA NEGRA EM
BANANEIRA CV. GRANDE NAINÉ**

Ana Paula da Silva Novaes

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

2024

GLICEROL NO CONTROLE DA SIGATOKA NEGRA EM BANANEIRA CV. GRANDE NAINÉ

Ana Paula da Silva Novaes

Tecnóloga em Agroecologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2020

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

Orientador(a): Dr^a Claudia Fortes Ferreira

Coorientador: Dr. Edson Perito Amorim

Coorientador: Dr. Leandro de Souza Rocha

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

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

**GLICEROL NO CONTROLE DA SIGATOKA NEGRA EM
BANANEIRA CV. GRANDE NAINÉ**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Ana Paula da Silva Novaes

Aprovada em: 26/01/2024



Dr^a. Claudia Fortes Ferreira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)



Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Membro interno)



Dr^a. Fernanda dos Santos Nascimento
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Membro externo)

DEDICATÓRIA

Dedico às minhas bases: Deus e minha mãe, e todos que me ajudaram e torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Sem a ajuda de muitas pessoas não seria possível concluir este trabalho. Agradeço primeiramente a Deus pela força durante todo o tempo para realizar a pesquisa. Em segundo a minha mãe, pelo exemplo de força, pela dedicação por todos esses anos e por nunca ter desistido de mim.

A Andresa Ramos por ter sido mais que a analista do Laboratório de Biologia Molecular. Sou grata pela ajuda, força e amizade de sempre.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Andressa Rodrigues, Luiz Carlos e Rodrigo por toda ajuda desde o início e pela amizade que construímos.

A todos do Laboratório de Fitopatologia pelo conhecimento compartilhado, em especial à Flávia, Leandro e Sr. Sinésio.

A minha orientadora, Dra. Claudia Fortes Ferreira, e co-orientadores, Dr. Edson Perito Amorim e Dr. Leandro Rocha, que sempre que puderam me orientaram da melhor forma possível.

A todos do laboratório de Cultura de Tecidos vegetais pelos ensinamentos, ajuda e suporte.

Foram muitas pessoas que tive a sorte de encontrar durante o meu período de Mestrado. Fernanda e Anelita são umas delas, sou grata por toda ajuda durante os trabalhos.

Agradeço a toda turma que ingressou comigo no Mestrado pela ajuda e suporte durante as disciplinas e até mesmo quando já havia completado os créditos.

Agradeço a Marcellly, Amanda, Mileide, Wanderley, Manoela, Juliana, Thaís, Wesley e Tamires pelos momentos de descontração, ajuda e apoio.

Agradeço à minha Irmã Ana Carolina e a minha amiga Jaciara por toda ajuda, principalmente na reta final.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela chance de realizar o Mestrado e à Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo espaço e suporte para desenvolver a pesquisa.

Aos professores Carlos Ledo, Carlos Bragança, Ricardo Franco Cunha Moreira e Rogério Mercês Ferreira Santos por toda ajuda quando solicitados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudo.

Gratidão a todos que direta e indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui.

GLICEROL NO CONTROLE DA SIGATOKA NEGRA EM BANANEIRA CV. GRANDE NAINÉ

RESUMO: A bananeira é afetada por fatores bióticos e abióticos, tendo como um dos principais fatores bióticos, a infecção pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, causador da Sigatoka Negra (SN). O patógeno apresenta grande variabilidade genética. O controle químico requer várias aplicações anuais, que oneram o produtor e causam danos ao meio ambiente e à saúde humana. Sendo assim, alternativas naturais de controle da doença se tornam mais atrativas. O glicerol é considerado uma alternativa ecologicamente viável na agricultura, e vem sendo usado para induzir resistência de doenças em plantas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a indução de resistência em plantas de bananeira da cultivar Grande Nainé, suscetível à SN, utilizando o glicerol. No primeiro capítulo desta dissertação, foi realizada uma revisão sistemática para identificar respostas de resistência de doenças em plantas com o uso de glicerol. As buscas realizadas entre 2008-2022 nas bases de dados Google Acadêmico, PubMed Central, Periódico CAPES, Web of Science e Springer. Foram encontrados 2.374 artigos, que passados pela etapa de seleção, restaram apenas 10 artigos. A maioria dos estudos utilizaram a planta modelo *Arabidopsis thaliana* e os Estados Unidos foi o país que mais desenvolveu pesquisas nesta área. A técnica de aplicação mais utilizada para o glicerol foi a pulverização. A análise de expressão gênica identificou o gene PR1 como o mais expresso na indução de resistência. A resistência induzida pelo glicerol está relacionada ao aumento da produção da molécula de glicerol-3-fosfato e à diminuição do ácido oleico, que por sua vez afeta a produção de ácido salicílico e jasmonato nas plantas. No segundo capítulo, foi realizado um experimento em casa de vegetação para avaliação da indução de resistência via glicerol no patossistema *Musa* x Sigatoka negra. O experimento foi instalado em DIC (Delineamento inteiramente casualizado) com 5 tratamentos (controle, 0, 3, 5, e 8% de glicerol), e 3 repetições. Para análise de resistência, foram avaliados sintomas, detecção de calose, clareamento para visualização de estruturas fúngicas. A análise de expressão gênica foi conduzida utilizando os genes alvos o domínio Kinase (KINLRR) e o gene STRANS de transdução de sinais. A deposição de calose ocorreu a partir das 72 h.a.i. em plantas tratadas com glicerol. Houve indução dos dois genes de resistência testados nos tempos finais, principalmente para a concentração de 5% de glicerol. Este é um estudo pioneiro para a cultura da bananeira, por meio deste foi possível confirmar que o uso do glicerol em plantas, na variedade Grande Nainé para indução de resistência, é promissor. O glicerol induz a defesa contra patógenos possibilitando que plantas suscetíveis controlem melhor a invasão, mas seu uso e atividade em bananeira ainda precisa ser melhor avaliado, com diferentes métodos e momentos de aplicação. Dessa forma, os resultados apresentados mostraram que o uso do glicerol poderá vir a ser uma estratégia mais sustentável e de uso mais abrangente dentro da cadeia produtiva da fruta.

Palavras -chave: Expressão gênica; *M. fijiensis*; *Musa*; Resistência

GLYCEROL IN THE CONTROL OF BLACK SIGATOKA IN BANANA CV. GRANDE NAINÉ

ABSTRACT: The banana is affected by biotic and abiotic factors, with one of the main biotic factors being infection by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, which causes Black Sigatoka (NS). The pathogen presents great genetic variability. Chemical control requires several annual applications, which burden the producer and cause damage to the environment and human health. Therefore, natural alternatives to control the disease become more attractive. Glycerol is considered an ecologically viable alternative in agriculture, and has been used to induce disease resistance in plants. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the induction of resistance in banana plants of the Grande Nainé cultivar, susceptible to NS, using glycerol. In the first chapter of this dissertation, a systematic review was carried out to identify disease resistance responses in plants using glycerol. Searches carried out between 2008-2022 in the Google Scholar, PubMed Central, Periódico CAPES, Web of Science and Springer databases. 2,374 articles were found, and after passing the selection stage, only 10 articles remained. Most studies used the model plant *Arabidopsis thaliana* and the United States was the country that developed the most research in this area. The most used application technique for glycerol was spraying. Gene expression analysis identified the PR1 gene as the most expressed in resistance induction. Glycerol-induced resistance is related to the increased production of the glycerol-3-phosphate molecule and the decrease in oleic acid, which in turn affects the production of salicylic acid and jasmonate in plants. In the second chapter, an experiment was carried out in a greenhouse to evaluate the induction of resistance via glycerol in the *Musa* x Black Sigatoka pathosystem. The experiment was installed in DIC (completely randomized design) with 5 treatments (control, 0, 3, 5, and 8% glycerol), and 3 replications. For resistance analysis, symptoms, callosis detection, and bleaching to visualize fungal structures were evaluated. Gene expression analysis was conducted using the target genes the Kinase domain (KINLRR) and the signal transduction gene STRANS. Callose deposition occurred from 72 h.a.i. in plants treated with glycerol. There was induction of the two resistance genes tested at the final times, mainly for the 5% glycerol concentration. This is a pioneering study for banana cultivation, through which it was possible to confirm that the use of glycerol in plants, in the Grande Nainé variety for inducing resistance, is promising. Glycerol induces defense against pathogens, enabling susceptible plants to better control invasion, but its use and activity in banana plants still needs to be better evaluated, with different methods and times of application. Thus, the results presented showed that the use of glycerol could become a more sustainable strategy and a more comprehensive use within the fruit production chain.

Key words: Gene expression; *M. fijiensis*; *Musa*; Resistance

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Origem e importância econômica da banana	11
2.2. Aspectos gerais da Sigatoka Negra.....	12
2.3. Características gerais e descrição do glicerol	15
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 1	20
RESUMO	20
ABSTRACT:	21
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Planejamento.....	25
2.2. Execução.....	26
2.3. Sumarização	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1. Pesquisa nos bancos de dados	28
3.2. Locais de estudo	30
3.3. Culturas utilizadas.....	30
3.4. Patógenos estudados.....	31
3.5. Concentrações utilizadas	32
3.6. Técnicas utilizadas	33
3.7. Resultados observados	33
4. Discussão.....	36
4.1. Pesquisa nos bancos de dados	36
4.2. Locais de estudo, culturas e hospedeiros do estudo	37
4.3. Doses e concentrações de glicerol	38
4.4. Resultados relatados nos estudos.....	41
4.5. Genes expressos em resposta à indução de resistência a partir do uso do glicerol	44
4.6. Técnicas utilizadas para aplicação do glicerol	47
4.7. Mecanismos bioquímicos que participam da via de resistência em plantas tratadas com glicerol	48
5. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 2	56

RESUMO	57
ABSTRACT	57
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1. Material vegetal	61
2.2. Preparo do inóculo	62
2.3. Avaliação de sintomas	62
2.5. Histoquímica	63
2.6. Clarificação e coloração de folhas	64
2.7. Análise molecular	64
2.7.1 Extração de RNA total	64
2.7.2 Tratamento com DNase	65
2.7.3. Síntese de cDNA	65
3. RESULTADOS	66
3.1. Avaliação de sintomas	66
3.2. Análises Histológicas	67
3.2.1. Clarificação e coloração das folhas	67
3.4. Análise Histoquímica	71
4. DISCUSSÃO	72
4.2. Expressão gênica	74
REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

A banana é uma fruta conhecida pelas suas características nutricionais e faz parte da alimentação da população mundial; por seu valor aquisitivo, é adquirido por todas as classes. A maior parte da produção de banana produzida no Brasil não é exportada para outros países, e permanece no mercado interno (ANDRADE et al., 2009).

A produtividade na bananicultura no Brasil nos últimos 10 anos não obteve crescimento acentuado significativo. Segundo dados do IBGE (2021), a produção de aproximadamente 7 milhões de toneladas no ano de 2021 foi menor que em anos anteriores. Foram produzidas 6.854.222 toneladas de banana no ano de 2022, segundo dados do IBGE. A queda na produção pode estar relacionada a fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores bióticos que afetam a cultura da bananeira, destaca-se a Sigatoka Negra (SN), causada pelo fungo *Mycosphaella fijiensis* Morelet, que a depender das condições de temperatura e manejo da cultura, pode levar a perdas de 100% da produção (PEREIRA et al., 1998). As aplicações de fungicida no controle da SN podem variar de 35-40 por ano em alguns bananais mais produtivos, o que além de causar danos significativos ao meio ambiente e à saúde humana, elevam os custos do produtor (LUC et al. 2009).

Sendo assim, produtos mais amigáveis ambientalmente são mais atrativos para uso no plantio da bananeira. Um desses produtos, que vem sendo usado no controle de doenças em plantas, é o glicerol. Esse óleo é oriundo da epícloridrina obtida do propileno. As plantas também são utilizadas para produção do glicerol, mas também pode ser originado da produção petroquímica (BEATRIZ; ARAÚJO e LIMA, 2010).

O glicerol é considerado um fungicida orgânico e resultados de pesquisas determinaram que quando utilizado de forma correta, auxilia na resistência a diversas doenças fúngicas (SOUSA et al., 2017). Acredita-se que a molécula sinalizadora do glicerol na planta, seja o glicerol-3-fosfato (G3P), que, juntamente com o metabolismo de carboidratos primários, contribui para maior resistência das plantas ao ataque de fungos (Gazolla et al. 2019).

No entanto, não há estudos envolvendo respostas do patossistema *Musa* spp. x *M. fijiensis* e o uso do glicerol. Portanto, este trabalho tem como

objetivos, compilar os principais trabalhos sendo conduzidos em todo o mundo sobre o uso do glicerol na indução de resistência em plantas a doenças por meio de uma revisão sistemática (RS) e avaliar a eficiência do uso do glicerol nas diferentes concentrações (controle, 0, 3, 5 e 8%), no aumento da resistência da variedade de bananeira, Grande Naine, ao fungo *M. fijiensis* Morelet, causador da Sigatoka Negra.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e importância econômica da banana

A bananeira é uma planta com centro de origem no continente asiático, e possuiu outros centros secundários como África oriental e ilhas do Pacífico (SIMMONDS, 1962). A domesticação da bananeira ocorreu a partir de hibridização de subgrupos de *Musa acuminata* na ilha Sudeste Asiático e na Melanésia Ocidental (KENNEDY, 2009). Chegando nas américas através de marinheiros europeus (Nayar, 2009).

No Brasil, a maior região produtora de banana é a Região Sudeste, seguida pela Região Nordeste, de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2023). Segundo os indicadores agropecuários, a bananicultura obteve rendimento de aproximadamente 12 milhões de reais movimentando a cadeia produtiva da fruta no ano de 2022 (IBGE, 2023).

Além de ser considerada umas das principais frutas ricas em nutrientes, facilidade de adaptação em lugares de todo o mundo, a banana possui também diversas utilidades, como na produção de fibras, geleias, doces e um forte mercado como planta ornamental (DANTAS et al., 2015) e na produção de cervejas (CARVALHO et al., 2008).

A maioria das cultivares de bananeiras encontradas atualmente originaram-se do cruzamento natural entre duas espécies selvagens diploides, *M. acuminata* Colla (genoma A) e *M. balbisiana* Colla (genoma B), responsáveis pelos genomas "A" e "B", respectivamente (Simmonds & Shepherd, 1955). As principais espécies de bananeira são divididas em subgrupos, onde o subgrupo Cavendish é um dos principais em se tratando de

bananas exportadas em todo o mundo (ARAVANITTOYANNIS e MAVROMATIS, 2009).

Embora as bananas sejam consideradas frutas importantes tanto no mercado interno quanto externo, as cultivares são acometidas por várias doenças causadas por vírus, bactéria, insetos e fungos. O principal vírus que ataca as bananeiras no país é o vírus causador de estrias, BSV – Banana Streak Virus. A principal doença bacteriana é denominada de Moko da bananeira, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (raça 2), com os nematóides da espécie *Radopholus similis* sendo os mais danosos à cultura. As bananeiras também são prejudicadas por insetos, como a broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*) também chamado de moleque-da-bananeira (SILVA et al., 2013). Em se tratando de doenças fúngicas, as principais são a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense e as Sigatokas, amarela e negra; sendo esta última, a mais devastadora.

A cultivar Grande Naine (AAA) pertence ao subgrupo Cavendish. É uma cultivar comercial, triploide e sua origem se deu da hibridação com genótipos diplóides locais já existentes (PERRIER et al. 2011) na Indochina e sudoeste da Ásia, considerado centro de origem e diversidade (KIMUNYE et al. 2021). Apesar da Grande Naine ser uma das cultivares preferidas tanto do produtor quanto consumidor brasileiro, a mesma é suscetível à SN (SILVA et al., 2013).

O melhoramento genético da bananeira visa o desenvolvimento de variedades tolerantes aos principais fatores abióticos e bióticos. No entanto, o melhoramento clássico da bananeira é demorado, não somente devido ao grande número de diferentes combinações de ploidias, mas também devido à partenocarpia inerente à espécie (ORTIZ e SWENNEN, 2014). Sendo assim, a possibilidade do uso de compostos naturais que possam aumentar a resistência de plantas ao ataque de fungos trazem grandes benefícios não somente do ponto de vista de produção por viabilizar a diminuição dos custos com a compra de fungicidas, mas também do ponto de vista ambiental por não causar danos ao meio ambiente e nem à saúde humana (SORAES et al. 2021, VISHNEVETSKY et al., 2010).

2.2. Aspectos gerais da Sigatoka Negra

Causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a Sigatoka Negra (SN) é uma doença que atinge a cultura da bananeira de forma severa,

chegando a atingir 100% da produção se não houver controle adequado (PEREIRA et al., 2008). Fungos cercósporos, a exemplo dos fungos que causam a Sigatoka Negra, possuem, como características, a mutualidade e a hibridação, que podem ser favorecidas pelos fungicidas aplicados, em se tratando do aparecimento de novas raças do microorganismo (CASTELAN, 2010).

O fungo *Mycosphaerella fijiensis* produz dois tipos de esporos: conídios, de reprodução assexuada e ascósporos, de reprodução sexuada. Os conídios podem sobreviver até 60 dias. O tempo de vida varia conforme o tipo de superfície. Em folhas de bananeira é possível ciclo de até 2 meses de vida; e de até 18 dias em superfícies dos frutos infectados (PEREIRA e GASPAROTTO, 2005). A principal forma de disseminação do microorganismo é pelo vento, mas existem outras formas de contaminação, como por humanos, vestimentas e calçados do funcionário utilizado em áreas contaminadas. A proliferação pode acontecer pelo fruto, suas embalagens e transportes oriundos de bananais doentes, sendo que o fungo pode sobreviver por até 2 meses (PEREIRA e GASPAROTTO, 2001).

A SN tem sua infestação favorecida por fatores climáticos. A umidade do local e até mesmo a água presente na planta, favorece o desenvolvimento do fungo, onde maior conhecimento sobre o patógeno é muito importante para tomada de decisão de estratégias de práticas de manejo. Este fungo possui reprodução sexuada, permitindo a recombinação genética com outros indivíduos, o que o torna mais apto para se adaptar às práticas de manejo e às diferentes temperaturas (UCHÔA et al., 2012), possibilitando a quebra de barreiras de infecção.

O patógeno *M. fijiensis* se desenvolve melhor em temperaturas em torno de 26 °C (ROMERO e SUTTON, 1997). Ambientes com temperatura em torno de 21 °C e 30 °C são limitantes para a infecção da doença (UCHÔA et al., 2012). Presente na Bahia, a Sigatoka Negra faz com que produtores tenham dificuldades de comercializar os frutos, pois, regiões consumidoras não contaminadas, passaram a evitar a compra dos frutos na tentativa de impedir que a doença se espalhe nessas regiões sem a presença da doença (NASTARO e JULIÃO, 2016).

Os sintomas da SN se caracterizam por estrias nas folhas, inicialmente de cor marrom. Com sua evolução, ocorrem manchas necróticas que afetam diretamente a atividade fotossintética da planta reduzindo seu ciclo de vida (NOMURA et al., 2015). As estrias de cor marrom-clara, com o avanço da doença, se tornam negra, o que dá origem ao nome a doença. A deterioração na planta se inicia nas bordas das folhas, depois avança para a morte do limbo foliar (MARTINS; GASPAROTTO e MOREIRA, 2016). Os frutos de plantas infectadas com a SN têm amadurecimento fora da época natural, e se caracterizam como frutos de baixa qualidade, causando um impacto negativo na produção da fruta (NOMURA et al., 2015).

Práticas de controle natural estão sendo utilizadas para controlar o patógeno. O manejo consiste na eliminação de folhas infestadas para evitar a propagação do patógeno (VARGAS et al., 2009; NOMURA et al., 2015). No entanto, o controle químico continua sendo o mais eficaz no controle da doença no campo. Na tentativa de controlar a Sigatoka Negra, métodos biológicos também estão sendo utilizados. A prática de controle biológico com o fungo *trichoderma* demonstra resultados positivos na inibição do avanço da doença. O produto feito com o antagonista chamado tricofun, é recomendado para uso em lavouras orgânicas como técnica para impedir perdas na produção (CASTRO et al., 2014).

O controle químico, o biológico e formas de manejo, não são os únicos métodos utilizados com o propósito de controlar a Sigatoka Negra. A introdução de cultivares resistentes está sendo cada vez mais utilizada em propriedades produtoras com e sem a incidência deste patógeno. Dentre as cultivares resistentes à SN, destacam-se a Caipira, Thap Maeo, FHIA-01, FHIA-21 e a falsa FHIA-18 (SANTOS et al., 2006). Entre as cultivares suscetíveis, estão as cultivares Grande Naine, D'Angola, Prata baby, Prata Graúda, Tropical e Terra (CORDEIRO; MATOS & MEISSNER FILHO, 2020).

O uso de óleos, como essenciais, é uma metodologia que está crescendo dentro das medidas para controlar doenças em nível de campo. O uso dos óleos de *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare* e *Pimenta dioica*, apresentaram resultados interessantes no controle da SN em bananeira (JIMÉNEZ et al., 2018).

A planta é induzida a desenvolver resposta de resistência de duas formas, pela resistência sistêmica induzida (ISR) por meio de elicitores bióticos e pela resistência sistêmica adquirida (SAR) através de elicitores bióticos e abióticos. A última é dependente do ácido salicílico e proteínas relacionadas a patogênese, enquanto a primeira depende dos fitohormônios etileno e jasmonato (VALLAD e GOODMAN, 2004).

No processo de resistência genes são ativados para que ocorra a resposta hipersensível, onde ocorre morte do tecido para impedir a propagação dos patógenos biotróficos (CHISHOLM et al., 2006).

2.3. Características gerais e descrição do glicerol

Derivado da palavra grega *glykys*, que significa doce, o glicerol é um álcool de três carbonos, sendo inodoro, incolor e viscoso. Sua produção é oriunda de fontes naturais ou petroquímicas (BEATRIZ; ARAÚJO e LIMA, 2010). O custo de produção do biodiesel é alto e a utilização do seu coproduto, o glicerol, é uma alternativa para diminuição dos gastos. O glicerol bruto, conhecido também como glicerina, tem custo relativamente baixo e alta produção, possibilitando o uso em diversas áreas (YANG; HANNA e SUN, 2012).

Co-produto do biodiesel, o glicerol está sendo aproveitado como meio de suprir os gastos da extração do biodiesel. Neste caso, o aproveitamento do glicerol, contribui para custear os gastos realizados com o biodiesel (YANG, HANNA e SUN, 2012).

A molécula de glicerol, que é produzida e metabolizada durante a etapa de indução de resistência em plantas, é o glicerol-3-fosfato (G3P), produzido pelo processo de fosforilação do glicerol pela glicerol quinase (GK), ou pela redução do fosfato de hidroxiacetona (DHAP), mediada pela G3P desidrogenase (G3Pdh) (VENUPOPAL et al, 2011). Esta molécula, G3P, vem sendo apontada como indutora de um possível mecanismo de defesa de plantas agrícolas contra doenças. Em pesquisas com plantas de café, foi confirmado a diminuição de sintomas causados pela ferrugem (*Hemileia vastatrix*), ao se utilizar o glicerol na concentração de 3% (Gazolla et al., 2019).

Atualmente, o glicerol está sendo utilizado em pesquisas científicas para controlar resistência/tolerância aos principais fatores bióticos e abióticos (RAOUFI, RAHEMI e AKBARI, 2020). Este composto é considerado um fungicida orgânico e resultados de pesquisas determinaram que quando utilizado de forma correta, em termos de concentração e número de aplicações, auxilia na resistência a diversas doenças fúngicas (SOUSA et al., 2017). Até o momento, não há estudos envolvendo o uso de glicerol no controle do fungo *M. fijiensis*, causador da Sigatoka negra em bananeira.

3. REFERÊNCIAS

ANDRADE, F.W.R.; AMORIM, E. P. R.; ELOY, A. P. e RUFINO, M. J. Ocorrência de doenças em bananeiras no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.305-309, 2009.

ARVANITTOYANNIS, I. S.; MAVROMATIS, A. Banana cultivars, cultivation practices, and physicochemical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 49, 2009. DOI: 10.1080/10408390701764344.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y.J. K. e LIMA, D. P. de. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, V. 34, N. 2, p. 306-319, 2011. DOI: 10.1590/S0100-40422011000200025.

CARVALHO, G. B. M.; SILVA, D. P.; BENTO, C. V.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; FELIPE, M. d. G. A.; SILVA, J. B. A. Banana as an Adjunct in Beer Production: Applicability and Performance of Fermentative Parameters. **Appl Biochem Biotechnol**, V. 55, p. 53–62, 2008. DOI: 10.1007/s12010-0088458-y.

CASTELAN, F. P. **Efeitos da infestação de Sigatoka Amarela e de Sigatoka Negra sobre a qualidade das bananas**. Dissertação (mestrado em Ciência dos Alimentos)- Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 91p. 2010.

CASTRO, R.; PESÁNTEZ, M.; LEMA, P.; QUEVEDO, J.; ARICHABALA, P.; ALVARADO-CAPÓ, Y. Potential use of Trichoderma-based bioproduct for black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*) management in the field. **Biocontrol Science and Technology**. p. 481-486, 2015. DOI: 10.1080/09583157.2014.982512.

CORDEIRO, Z. J.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. **Sigatokas**. Disponível em: Agência de Informação Embrapa Sigatokas. Acesso em: 21 de nov. de 2021.

CHISHOLM, S. T.; GITTA, C.; BRAD, D.; STASKAWICZ, B. J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**. P. 803-814, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>.

DANTAS, J. L. L.; SILVA, S. de O. e; SOARES FILHO, W. dos S.; CARVALHO, P. César Lemos de. **O agronegócio da banana**. Embrapa, Brasília, 2015. Disponível em: <https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00084630.pdf>. Acesso em: 27 de dezembro de 2021.

GAZOLLA, L. C. de O. F.; ALMEIDA, D. P.; CASTRO, I. S. L.; CASTRO, A. G. de; ARRUDA, L. V. de S.; VIEIRA, N, M.; MANTOVANI, H. C.; ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E. T.; MENDES, T. A. de O. **Regulação transcricional do metabolismo de glicerol-3-fosfato induz resistência à ferrugem do café**. Vitória, 5 p, 2019.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: IBGE | Portal do IBGE | IBGE. Acesso em: 28 de out. de 2021.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: IBGE | Portal do IBGE | IBGE. Acesso em: 18 de out. de 2023.

JIMÉNEZ, E. G.; SANDOVAL, A. P.; BOLAÑOS, L. M.; GAXIOLA, J. A. S.; GONZÁLEZ, F. G. Effect of natural oils against *Mycosphaerella fijiensis* in vitro conditions and detection of active plant chemicals. **Mexican phytopathology magazine**, v.36 n.1 2018. DOI: 10.18781/r.mex.fit.1707-4.

KENNEDY, J. Bananas e pessoas na terra natal do gênero *Musa*: Não apenas frutas bonitas. **Ethnobot Res Apl**, 179–197, 2009.

KIMUNYE, J.; WERE, E.; SWENNEN, R.; VILJOEN, A.; MAHUKU, G. Sources of resistance to *Pseudocercospora fijiensis*, the cause of black Sigatoka in banana. **Plant Pathology**. 2021, 70:1651–1664. DOI: 10.1111/ppa.13408.

LUC, L. B.; JOSUÉ, E. N.; CATHERINE, A.; CHRISTIAN, C.; R, B.; THIERRY, L.; JEAN, C.; FRANÇOIS-XAVIER, C. Is chemical control of *Mycosphaerella foliar* diseases of banana sustainable?. In: III International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for Sustainable Production and Improved Livelihoods. **Acta horticulture**. White River, 2009. p. 161-170.

MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 38, DE 1º DE OUTUBRO DE 2018. Disponível em: Instrução Normativa SDA/MAPA nº 38, de 1º de outubro de 2018. Acesso em: 21 de nov. de 2021.

MARTINS, M. B.; GASPAROTTO, L.; MOREIRA, A. Sigatoka Negra em bananais cultivados na região Centro-Sul do Estado do Mato Grosso. **Revista Ciências Agrárias**, v. 59, n. 1, p. 74-79, jan./mar. 2016.

NASTARO, M.; JULIÃO, L. **Sigatoka Negra chega na BA: Produtores do vale do são francisco têm dificuldade de comercialização devido à doença**. 2016. Disponível em: HF Brasil - Galeria - Sigatoka Negra chega na BA. Acesso em: 21/11/2021.

Nayar, N. M. (2009). Bananas: Botânica, origem, dispersão. Em: Horticultural Reviews, J. Janick, ed., 117-164.

NOMURA, E. S.; DAMATTO JUNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; SAES, L. A.; SILVA, S. de O. e. Desenvolvimento e produção de bananeira 'grande naine' em diferentes sistemas de manejo para a convivência com a Sigatoka Negra no

vale do Ribeira-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 3, p. 644-655, set. 2015.

ORTIZ, R.; SWENNEN, R. From crossbreeding to biotechnology facilitated improvement of banana and plantain. **Buitechology Advances**. v. 32, p. 158-169, 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.010.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; ARRUDA, M. R. de; PEREIRA, M. C. N. **Sigatoka Negra no Brasil- 10 anos da doença**. 2008.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. D. S., & URBEN, A. F. Ocorrência da Sigatoka Negra no Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v. 23, p. 295, 1998.

ROMERO, R. A. e SUTTON, T. B. Reação de Quatro musa Genótipos em três temperaturas para isolados de *Mycosphaerella fijiensis* de diferentes regiões geográficas. **Doença vegetal**, p. 1139-1142, 1997.

SANTOS, S. C.; CARNEIRO, L. C.; SILVEIRA NETO, A. N. DA; PANIAGO JÚNIOR, E.; FREITAS, H. G. DE; PEIXOTO, C. N. caracterização morfológica e avaliação de cultivares de bananeira resistentes a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) NO SUDOESTE GOIANO. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 449-453, dez. 2006.

SILVA, S. de O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; FERREIRA, C. F.; Rodriguez, M. A. D. Genetic improvement of banana: strategies and available technologies. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013. DOI: 10.1590/S0100-29452013000300032.

SIMMONDS, N.W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Botanical Journal of the Linnean Society**. London, v.55, n.359, p.302-312, 1955, DOI: 10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x.

SIMMONDS, N. W. *Evolution of the bananas*. **Cabi**, 170 p. 1962.

SOUSA, W. B. de; MENDONÇA, R. F. de; CRUZ, T. P. da; QUEIROZ, V. T. de; COSTA, A.V.; MORAES, W. B. **Atividade fungicida de compostos inéditos de triazóis obtidos a partir de glicerol sobre alternaria solani**. XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência, p. 1-5, 2017.

UCHÔA, C. do N.; POZZA, E. A.; ALBUQUERQUE, K. S.; MORAES, W. da S. Relação entre a temperatura e o molhamento foliar no monociclo da Sigatoka Negra. **Summa phytopathol**. Botucatu, v. 38, n. 2, p.144-147, 2012.

VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Ceop science**. P. 1920-1934. Doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>.

VARGAS, A.; ARAYA, M.; GUZMÁN, M.; MURILLO, G. Efeito da poda das folhas de plantas de banana (*Musa AAA*) no aparecimento da doença Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) e no rendimento da fruta International. **Journal of Pest Management**, V. 55, 2009.

VISHNEVETSKY , J.; WHITE Jr. , T. L.; PALMATER , A. J.; FLAISHMAN , M.; COHEN , Y.; ELAD, Y.; VELCHEVA , M.; HANÂNIA, U.; SAHAR, N.; DGANI, O.; PERLNAME, A. Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. **Transgenic Res**, 2011, 20:61–72. DOI:10.1007/s11248-010-9392-7.

PERRIER, X.; DONOHUE, M.; LENFER, C.; VRYDAGHS, L.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; HIPPOLYTE, I.; HORRY, JP.; JENNY, C.; LEBOT, V.; RISTERUCCI, AM.; TOMEKPE, K.; DOUTRELEPONT, H.; BALL, T.; MANWARING, J.; MARET, P.; DENHAM, T. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **PNAS**. v. 108, n. 28, p.11311-11318, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1102001108.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for raw glycerol – a by-product of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**. 2012, 10p.

CAPÍTULO 1

GLICEROL COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM PLANTAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

GLICEROL COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM PLANTAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO: Muitas são as formas de tentativas para se controlar doenças em plantas, mas, geralmente, a resistência não é mantida por muito tempo, pois os patógenos acabam burlando o sistema de defesa. Uma das tentativas de promover maior defesa é o uso de produtos capazes de induzir a resistência em plantas, como o glicerol, um co-produto do biodiesel que, aplicado em plantas, pode vir a induzir resistência contra organismos patogênicos. Esta revisão teve por objetivo selecionar estudos sobre a atividade do glicerol como molécula indutora de resistência de doenças em plantas. Buscou-se avaliar artigos depositados em diferentes bases de dados eletrônicas, usando um *string* de busca e critérios de inclusão e exclusão predefinidos. Esta revisão demonstra que as aplicações de glicerol em plantas induziram resistência após os tratamentos onde a resistência se deu por meio do aumento do nível da molécula sinalizadora, G3P e diminuição dos níveis de ácido oleico (18:1). Os principais meios de aplicação foram via pulverização e imersão. Foram inúmeras doses estudadas, que variaram em cada pesquisa. A concentração de 3% de glicerol é considerada a melhor para a maioria das espécies de plantas até o momento. A revisão revela também a avaliação de genes indutores de resistência como as proteínas PR – Pathogenesis Related proteins (PR-1, PR2, PR-5, etc.), HPS70, HSP90, SCAM4 e Tapr1, dentre outros. Poucos artigos foram publicados entre 2008 e 2022, sendo o número ainda menor após o ano de 2015. Isso demonstra que, apesar dos resultados já obtidos serem positivos, ainda, por algum motivo, podendo ser falta de conhecimento, este composto, glicerol, vem sendo pouco estudado.

Palavras-chave: Ácido oleico; Genes de defesa; Glicerol-3-fosfato, Proteínas PR

GLYCEROL AS AN INDUCER OF RESISTANCE TO DISEASES IN PLANTS: A SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT: There are many forms of attempts to control plant diseases, but generally resistance is not maintained for long, as pathogens end up bypassing the defense system. One of the attempts to promote greater defense is the use of products capable of inducing resistance in plants, such as glycerol, a co-product of biodiesel that when applied to plants can induce resistance against pathogenic organisms. The objective of this review was to select studies on the activity of glycerol as a molecule that induces disease resistance in plants. We sought to evaluate articles deposited in different electronic databases, using a search string and predefined inclusion and exclusion criteria. This review demonstrates that the applications of glycerol in plants induced resistance after treatments where resistance occurred by increasing the level of the signaling molecule, G3P (Glycerol-3-phosphate) and decreasing the levels of oleic acid (18:1). The main means of application were via spray and immersion. Numerous doses were studied, which varied in each study. The 3% glycerol concentration is considered the best for most plant species to date. The review also reveals resistance-inducing genes such as PR proteins (PR-1, PR2, PR-5, etc.), HPS70, HSP90, SCAM4 and Tapr1 among others. Few articles were published between 2008 and 2022 with the number being even lower after 2015. This shows that although the results already obtained are positive, still, for some reason, which may be a lack of knowledge, this compound, glycerol, is still not well studied.

Key words: Glycerol-3-phosphate, oleic acid, PRs proteins, plant defense genes.

1. INTRODUÇÃO

As diversas doenças causadas por pragas ou patógenos virais, fúngicos e bacterianos, comprometem o desenvolvimento das plantas afetando sua produtividade final. Dentre os microrganismos, há características específicas, como microrganismos biotróficos, que dependem da planta viva para se alimentarem e completarem seu ciclo de vida; necrotróficos, que durante seu hábito alimentar matam a planta hospedeira e os hemibiotróficos, que inicialmente dependem da planta viva para sobreviver e completam seu ciclo com uma fase necrotrófica, onde o hospedeiro é degradado (VELÁSQUEZ; CASTROVERDE e HE 2018; HORBACH et al., 2011). Dentre as características dos fungos biotróficos, que os diferencia dos outros, está a dificuldade de reprodução em laboratório em meio não vivo (SPANU e PANSTRUGA, 2017).

Para sobreviver aos ataques dos patógenos, as plantas utilizam padrões de reconhecimento de patógenos para detectar a invasão. Existem os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Micróbios (MAMPs). PAMPs e MAMPs podem ser reconhecidos por receptores que irão induzir o padrão de imunidade desencadeada (PTI) (DODDS e RATHJEN, 2010). O PTI juntamente com a imunidade desencadeada por efector (ETI), são essenciais na atividade um do outro e juntos aumentam a expressão gênica e deposição de calose (CHANG et al., 2022), além de contribuir para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (NGOU et al., 2021).

O modo que faz com que a planta seja capaz de impedir os ataques de patógenos é por meio da resistência sistêmica induzida (ISR) e da resistência sistêmica adquirida (SAR). O que as diferem são os tipos de indução na planta. A SAR é ativada por meio de organismos causadores de doenças e é dependente do ácido salicílico (SA) e genes, enquanto a ISR é induzida por micróbios benéficos, e é independente de SA (VLOT et al., 2020). As duas formas de resistência são ativadas a partir de sinais de defesa diversos quando a planta sofre ataque de patógenos (BOLLER e FÉLIX, 2009), a exemplo de quando entra em contato com a molécula do glicerol-3-fosfato.

A molécula de glicerol que é produzida e metabolizada durante a etapa de indução de resistência em plantas, é o glicerol-3-fosfato (G3P), produzido pelo processo de fosforilação do glicerol pela enzima glicerol quinase (GK) ou pela redução do fosfato de hidroxiacetona (DHAP), mediada pela G3P desidrogenase (G3Pdh) (VENUGOPAL et al., 2009). O glicerol possui potencial para controle de doenças em campo, onde o nível do produto deve ser considerado para que a quantidade não exerça papel contrário ou tóxico no controle da doença. Pelas suas características, o glicerol é um produto natural que age sem prejudicar o meio ambiente (LI et al., 2016).

Atualmente o glicerol é utilizado em pesquisas científicas tanto para promover tolerância/resistência aos principais fatores abióticos, quanto bióticos, que afetam as plantas (RAOUFI, RAHEMI e AKBARI, 2020). Entre alguns estudos, seu uso já foi documentado na resistência sistêmica adquirida contra as doenças *Phytophthora capsici* em *Theobroma cacao* (ZHANG et al., 2015), resistência do café à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) (GAZOLLA et al., 2019) e ao oídio em *Triticum aestivum* (LI et al., 2016; LI et al. 2020), entre outros.

Embora o uso de glicerol em plantas ainda seja pouco estudado, principalmente relacionado ao controle de doenças, trabalhos com o objetivo de estudar o glicerol como um defensivo ou na resistência de plantas aos principais fatores bióticos e abióticos, são de suma importância, pois é uma molécula que não degrada o meio ambiente e não causa danos à saúde humana e nem de animais.

Diante disso, revisar sistematicamente o tema “glicerol aplicado em culturas agrícolas e biológicas”, é de grande interesse para se entender os mecanismos desenvolvidos pelas plantas para adquirir resistência a fatores bióticos, e para entender as vias correlacionadas e protocolos adotados em diferentes estudos. Assim, esta revisão tem como objetivo principal, reunir os artigos publicados nos anos de 2008 a 2022, de forma a compilar os principais dados produzidos na área de agronomia e biologia quanto ao uso de glicerol como molécula indutora de resistência em plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A revisão sistemática foi desenvolvida com o auxílio do software StArt (*State of the Art through Systematic Review*) versão Beta 3.0.3, desenvolvido na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Santos et al., 2018). Todos os procedimentos adotados pelo *Start* seguiram as diretrizes *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), o qual permitem que as revisões sejam mais transparentes, com informações sobre o motivo da revisão, a abordagem dos autores e as informações que os autores encontraram (resultados). Assim, três etapas foram seguidas para elaboração da revisão, a saber: planejamento, execução e sumarização.

2.1. Planejamento

Nessa etapa, foi criado um protocolo definido de acordo com as seguintes informações: título do artigo, autores, objetivo, palavras-chave, questões de pesquisa, fontes de pesquisa, critérios de inclusão/exclusão e definição do tipo de estudo. A questão de pesquisa definida foi: Quais os mecanismos utilizados pelo glicerol para criar resistência a doenças em plantas? A partir disto, questões secundárias foram elaboradas e encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Questões levantadas sobre a atividade do glicerol como agente indutor de resistência a doenças de plantas em uma revisão sistemática de estudos publicados nos últimos 14 anos.

Questões

1. Quais países utilizaram o glicerol para indução de resistência a doenças?
 2. Qual o resultado ou resultados esperados com o uso do glicerol?
 3. Quais técnicas estão sendo utilizadas para aplicação do glicerol?
 4. Quais genes são relatados na resposta da planta ao uso do glicerol?
 5. Para quais patógenos o uso do glicerol foi relatado?
 6. Quais culturas mais utilizam o glicerol como indutor de resistência?
 7. Qual protocolo é proposto para aplicação do glicerol?
 8. Quais mecanismos estruturais e bioquímicos são associados ao uso do glicerol?
 9. Quais concentrações de glicerol para uso como indutor de resistência?
-

2.2. Execução

A revisão considerou os estudos realizados entre janeiro de 2008 a março de 2022 que realizaram pesquisas experimentais com aplicação de glicerol para avaliar a indução de resistência a doenças de plantas.

A partir dos protocolos estabelecidos para elaboração da revisão sistemática, dois *strings* de busca foram construídos baseados nos cinco componentes de inclusão denominado de "PICOS" - População, Intervenção, Comparação, Desfecho e Tipo de estudo (Santos et al., 2007) (Tabela 2).

Tabela 2: Termos PICOS para a "questão" de pesquisa utilizada em uma revisão sistemática sobre a atividade de glicerol como agente indutor de resistência a doenças de plantas publicados nos últimos 14 anos.

Descrição	Abreviação	Componentes da pergunta
População	P	Culturas agrícolas afetadas por doenças.
Interesse / Intervenção	I	Atividade do glicerol como agente indutor de resistência a doenças de plantas para o melhoramento genético vegetal.
Comparação	C	Métodos de melhoramento vegetal que não contemplem a utilização do glicerol.
Desfecho	O	Resistência a doenças de plantas.
Tipo de estudo	S	Artigos científicos e revisões de literatura.

Foram realizadas pesquisas em bases de dados com o objetivo de selecionar e extrair artigos. As bases utilizadas foram: periódicos CAPES (<https://www.periodicos.capes.gov.br>), PubMed Central (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>), Springer (<https://link.springer.com>) e Web of Science (<https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>). O site Google Scholar (<https://scholar.google.com.br>) também foi utilizado para buscas. Os arquivos selecionados foram importados em formato BIBTEX e MEDLINE compatível com o software *StArt*. Nos *strings* de busca foram utilizados conectores como “AND” e “OR” para agrupar palavras-chave sinônimas e os tópicos principais.

Dois *strings* de buscas foram utilizados: glycerol OR “G3P” OR “glycerol-3-phosphate” AND “plant resistance” AND “resistance induction” OR “systemic immunity in plants” OR “systemic acquired resistance” AND “plant disease” OR “plant pathogen” e glycerol OR G3P OR “glycerol-3-phosphate” OR “glycerol metabolism” OR “glycerol application” AND “disease resistance” OR “plant resistance” OR “plant diseases” or “biotics factors” OR “biotic stress” AND “systemic immunity in plants” OR “systemic acquired resistance”; esta última utilizada apenas para a base de dados web of science. Em ambos os casos, o *string* de pesquisa foi projetado para incluir uma ampla gama de artigos relacionados ao uso do glicerol como agente indutor de resistência a estresses bióticos.

Posteriormente, foram realizadas as etapas de seleção e extração, a qual foram considerados como critérios de inclusão: (I) Trabalhos que contenham no título, resumo e palavras-chave os termos do *string*; (I) Artigos que respondam as questões do protocolo; (I) Artigos de revisão. Como critérios de exclusão: (E) Teses, dissertações, manuais; (E) Capítulo de livro; (E) Duplicados; (E) Fuja do tema; (E) Trabalhos sem contribuição clara; (E) Trabalhos não escritos em inglês.

2.3. Sumarização

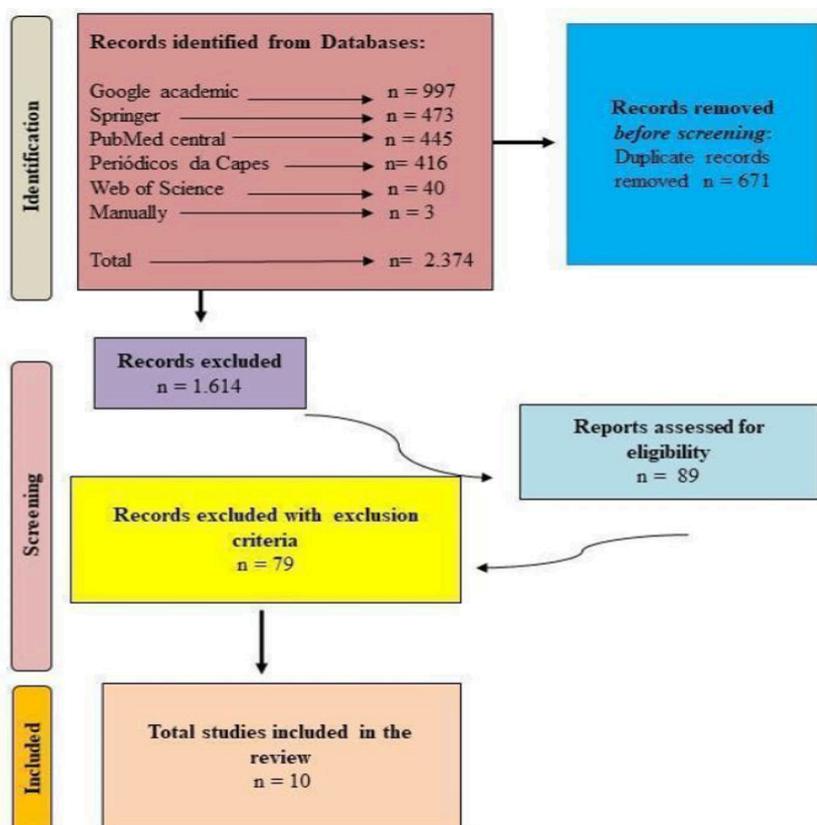
Esta etapa consistiu no desenvolvimento de gráficos, tabelas e nuvem de palavras. Os gráficos de barra foram criados no programa estatístico R utilizando os pacotes *ggplot2* e *ggpubr* (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2016) e devido à quantidade de artigos, os dados foram expostos em números

e não em porcentagem. O mapa bibliométrico foi gerado no programa VOSviewer_1.6.17 (Van e Waltman et al. 2010). As tabelas foram criadas para exibir os resultados dos mecanismos ativos pelo uso do glicerol, as formas de aplicação do glicerol e resultados obtidos ou esperados com o uso do glicerol. Uma nuvem de palavras com genes expressos em resposta ao uso do glicerol foi construída em um gerador online gratuito, disponível no link < <https://www.wordclouds.com/>>.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Pesquisa nos bancos de dados

As buscas realizadas em cinco bases de dados geraram um total de 2.374 artigos publicados entre janeiro de 2008 a março de 2022. No site Google Acadêmico foram encontrados 997 estudos, nas bases acadêmicas Springer 473, Pub Med central 445, Periódicos da Capes 416 e na web of Science, encontrados 40. Além disso, três estudos que não foram captados com o *string*, foram adicionados manualmente (Figura 1).



Os termos ácido salicílico, salicilato de metila e glicerol-3-fosfato foram os mais frequentes, estiveram relacionados ao ácido azelaico, acúmulo, genes e resistência sistêmica adquirida; além disso estiveram relacionados aos termos aplicação de glicerol, ácido oleico e *Arabidopsis ssi2* mutante.

3.2. Locais de estudo

A maior parte dos estudos foi realizada nos Estados Unidos (5), seguido da China e Japão, que tiveram dois artigos publicados sobre o uso do glicerol como indutor de resistência a doenças. No Brasil foi encontrado apenas um estudo (Figura 3).

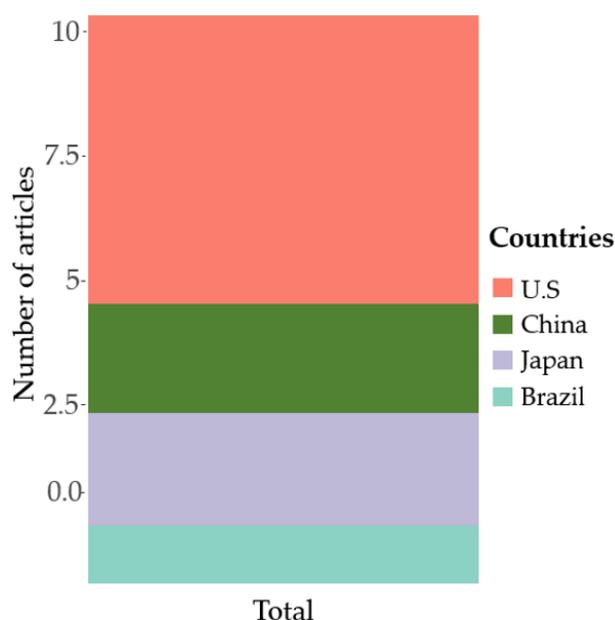


Figura 3. Países que realizaram estudos com glicerol como indutor de resistência a doenças de plantas.

3.3. Culturas utilizadas

Dentre as culturas mais utilizadas, a planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, obteve o maior número de artigos (4), todos desenvolvidos nos Estados Unidos, seguido do trigo e soja (2). O cafeeiro, arroz e cacau também foram produtores de conhecimento sobre a utilização do glicerol como indutor de resistência a doenças de plantas (Figura 4).

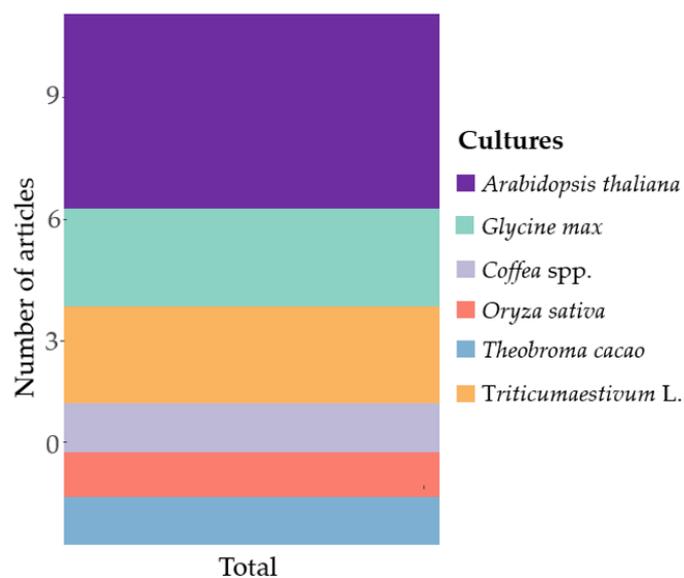


Figura 4. Culturas utilizadas em estudos científicos que receberam aplicação de glicerol para avaliar a indução de resistência a doenças de plantas.

3.4. Patógenos estudados

Entre os patógenos mais estudados, *Pseudomonas syringae* DC 3000, causadora da mancha bacteriana em *A. thaliana* e tomate, teve maior número de artigos (4), seguido pelo patógeno *Blumeria graminis* f. sp. tritici (2), causador do oídio. Os patógenos *Phytophthora sojae*, *Phytophthora capsici*, *Hemileia vastatrix*, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Magnaporthe grisea*, *Brusone colletotrichum*, vírus da crinkle do nabo e *Hyaloperonospora*, também foram testados com o glicerol (Figura 5).

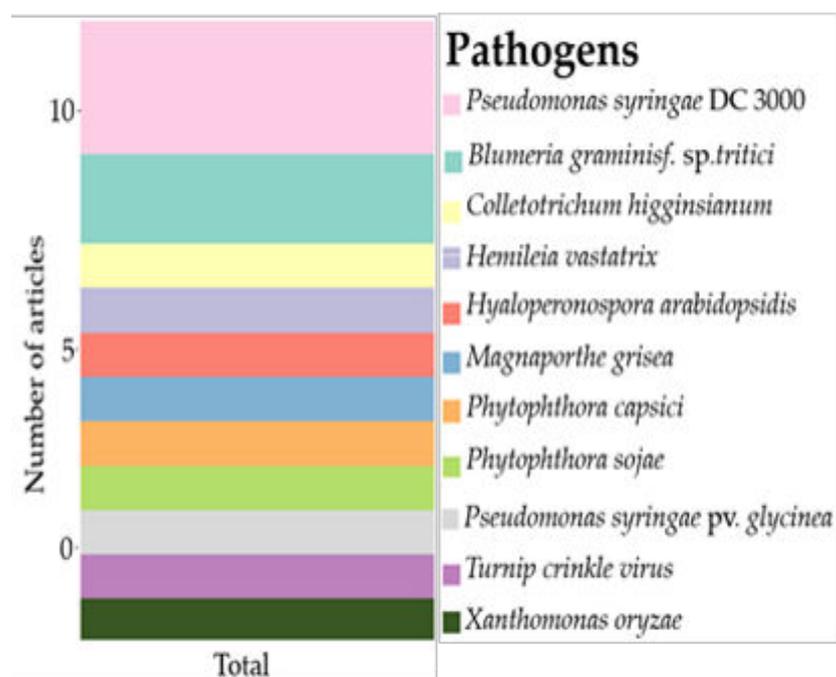


Figura 5. Patógenos mais utilizados para avaliar a resistência induzida em estudos com glicerol como indutor de resistência a doenças de plantas.

3.5. Concentrações utilizadas

Foram utilizadas diferentes concentrações de glicerol para indução de resistência nos artigos selecionados. Quatro deles utilizaram apenas uma única concentração sendo 3%, 1% e 0,46%; a última utilizada em dois trabalhos. Os demais artigos utilizaram a partir de duas concentrações de glicerol que variaram de 0,004 a 9,21% (Figura 6).

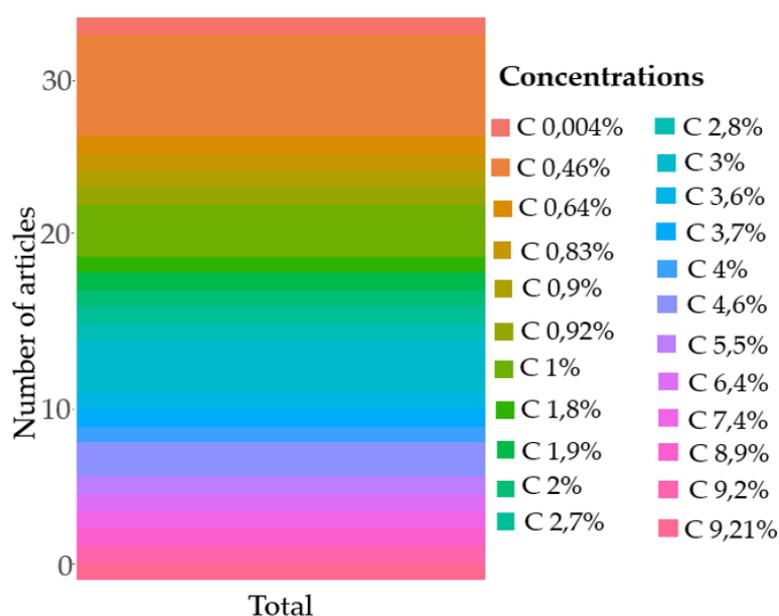


Figura 6. Frequência das concentrações de glicerol utilizadas em estudos com glicerol como agente indutor de resistência a doenças em plantas.

3.6. Técnicas utilizadas

Dentre as técnicas utilizadas para aplicação do glicerol, a pulverização (com uso de recipiente não informado) obteve maior frequência (8 trabalhos) (Tabela 3). Outra forma de aplicação utilizada foi a imersão na qual folhas foram imersas em solução de 100 mL por 10s a cada 24 h por três dias consecutivos.

Tabela 3. Técnicas utilizadas para aplicação do glicerol em estudos sobre a utilização do glicerol como agente indutor de resistência a doenças de plantas.

Referências	Técnicas utilizadas	Protocolos
Li et al. (2020)	Pulverização	Li et al. (2020)
Gazolla et al. (2019)	Não informada	Gazolla et al. (2019)
Li et al. (2016)	Pulverização	Li et al. (2016)
Zhang et al. (2015)	Imersão	Zhang et al. (2015)
Mendel et al. (2012)	Pulverização	Mendel et al. (2012)
Chanda et al. (2011)	Pulverização	Chanda et al. (2011)
Jiang et al. (2009)	Pulverização	Kachoo et al. (2008)
Venugopal et al. (2009)	Pulverização	Venugopal et al. (2009)
Chanda et al. (2008)	Pulverização	Chanda et al. (2008)
Kachoo et al. (2008)	Pulverização	Kachoo et al. (2008)

3.7. Resultados observados

A Tabela 4 mostra os resultados observados com o uso do glicerol para induzir resistência, sendo os efeitos semelhantes entre si, como redução de lesões das doenças, morte celular programada, aumento da molécula G3P, diminuição do ácido oleico 18:1 e expressão de genes.

Tabela 4. Resultados obtidos em estudos sobre a utilização do glicerol como agente indutor de resistência a doenças de plantas.

Referências	Resultados observados
Li et al. (2020)	Aumento dos níveis de JA e SA, redução do nível de IAA e indução de PR proteínas.
Gazolla et al. (2019)	Menor porcentagem de lesões.
Li et al. (2016)	Alterações na expressão de genes associados às vias do glicerol e dos ácidos graxos; aumento do G3P.
Zhang et al. (2015)	Aumento nos níveis endógenos de G3P, ROS, teor de malondialdeído (MDA) e diminuição nos níveis de ácido oleico.
Mendel et al. (2012)	Redução dos níveis de 18:1 e indução do acúmulo de óxido nítrico nos cloroplastos de plantas Col-0.
Chanda et al. (2011)	O glicerol foi incapaz de induzir SAR em plantas <i>gli1</i> .
Jiang et al. (2009)	Aumento da resistência às doenças <i>Magnaporthe grisea</i> e <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .
Venugopal et al. (2009)	Redução dos níveis de ácido oleico 18:1.
Chanda et al. (2008)	Aumento de G3P. Maior resistência em ambos os tipos selvagem e <i>gly1</i> de plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> .
Kachoo et al. (2008)	Aparecimento de lesões semelhantes a células mortas visíveis e microscópicas nas folhas tratadas.

Uma nuvem de palavras com os genes relacionados à resistência de plantas utilizando o glicerol foi elaborada (Figura 7). Os genes expressos mais relatados em resposta ao glicerol foram PR-1, CHI1, TAPR-1, PR-5, SCAM-5, Udp-glicosiltransferase, quitinase-1, LOX, entre outros.



Figura 7. Nuvem de palavras de genes de resistência encontrados em estudos que utilizaram glicerol como agente indutor de resistência a doenças de plantas.

Dentre os mecanismos estruturais e bioquímicos relatados pelo uso do glicerol está a diminuição nos níveis de ácido oleico e o aumento do glicerol-3-fosfato, o que resultou no aumento da resistência com atividade de expressão gênica (Tabela 5).

Tabela 5. Mecanismos estruturais e bioquímicos associados ao uso do glicerol como agente indutor de resistência a doenças de plantas.

Referências	Mecanismos estruturais e bioquímicos
Li et al. (2020)	Metabolismo de ácidos graxos vegetais, crosstalk de hormônios e indução de genes relacionados à patogênese.
Gazolla et al. (2019)	Mecanismo de resistência dependente de glicerol-3P.
Li et al. (2016)	Moléculas sinalizadoras: glicerol-3-fosfato (G3P) e ácido oleico 18:1; e espécies reativas de oxigênio (ROS).
Zhang et al. (2015)	Via de sinalização de defesa mediada por 18:1.
Mendel et al. (2012)	Aumento dos níveis endógenos de G3P, diminuição de 18:1 e fenótipos semelhantes a ssi2 em plantas do controle
Chanda et al. (2011)	O glicerol foi incapaz de induzir SAR em plantas gli1.
Jiang et al. (2009)	Redução dos níveis de ácido oleico 18:1.
Venugopal et al. (2009)	Redução dos níveis de ácido oleico 18:1.
Chanda et al. (2008)	Aumento de G3P.
Kachoo et al. (2008)	Redução dos níveis de ácido oleico 18:1.

4. Discussão

4.1. Pesquisa nos bancos de dados

A revisão considerou os estudos realizados entre janeiro de 2008 a março de 2022 que realizaram pesquisas experimentais com aplicação de glicerol para avaliar a indução de resistência a doenças de plantas. É importante destacar que até o momento não foram encontradas revisões de literatura e nem revisões sistemáticas sobre o glicerol como molécula indutora de resistência a doenças; fato que reforça a importância desta revisão sistemática sobre o tema.

Foram selecionados 2.374 trabalhos a partir do uso dos strings nas bases de dados. Desses selecionados, 2.285 foram excluídos por não estarem de acordo com o protocolo proposto ou por serem duplicados. Na etapa de extração, 89 artigos foram aceitos, e entre eles, apenas 10 artigos foram considerados relevantes, pois, responderam às perguntas do protocolo.

Houve muitos artigos citando a palavra glicerol devido à presença da molécula glicerol-3-fosfato (G3P) que também participa da via de indução de resistência produzida naturalmente pela planta. Além da molécula citada,

muitos estudos continham em seu título, resumo ou palavras-chave, termos que continham nos *strings* como resistência sistêmica adquirida, doenças de plantas e indução de resistência. Essas são palavras-chave muito utilizadas quando se trabalha com resistência em plantas.

4.2. Locais de estudo, culturas e hospedeiros do estudo

O glicerol como indutor de resistência foi bastante estudado nos Estados Unidos da América (5 estudos); a maioria utilizou o mesmo agente fitopatogênico, *Pseudomonas syringae*, e a planta modelo, *Arabidopsis thaliana*. A bactéria *P. syringae* pode infectar diferentes tipos de culturas, sendo constituída de diferentes patovares, o que explica o crescente uso de glicerol na tentativa de induzir resistência em plantas contra este patógeno (XIN, KVITKO e HE, 2018). Além disso, foi também estudado o uso do glicerol no patossistema *Theobroma cacao* x *Phytophthora capsici*. O cacaueteiro é uma cultura comercialmente importante por sua vasta funcionalidade, além de ser a principal matéria-prima do chocolate (SALLES et al., 2019).

A cultura mais estudada utilizando glicerol como indutor de resistência a patógenos nos últimos 14 anos, foi a planta modelo *A. thaliana* (4 artigos). O foco dos artigos com esta planta, está no fato da mesma possuir um ciclo de vida curto (seis semanas). Isso facilita seu uso em pesquisas na área da genética, bioquímica e da fisiologia, ajudando no desenvolvimento de cultivares resistentes, adaptadas e produtivas, por meio da transferência do conhecimento gerado para as demais culturas de interesse alimentar (PROVART et al., 2016; CHENG et al., 2017).

Importantes culturas alimentícias como o arroz, trigo e soja, também foram estudadas quanto a sua resistência a patógenos na presença do glicerol. O arroz é cultivado sob condições de sequeiro em várias zonas agroclimáticas e está sujeito a vários estresses bióticos que desencadeiam uma série de respostas morfofisiológicas e moleculares que afetam negativamente o crescimento e o desenvolvimento e, conseqüentemente, o potencial de rendimento (ISMAIL e HORIE, 2017). Portanto, esforços globais para se usar intervenções convencionais e/ou biotecnológicas para projetar algumas das características de respostas ao estresse por patógenos, são observados. A soja também possui grande valor econômico, não só na alimentação humana,

mas também animal, podendo produzir produtos como óleo, leite, proteína vegetal, biocombustíveis, dentre outros (SILVA et al., 2021).

Além dos Estados Unidos, a China e o Japão produziram dois trabalhos cada. Na China, as pesquisas foram desenvolvidas com o patógeno *Blumeria graminis* fsp. tritici com intervalo de quatro anos entre os estudos, com a cultura do trigo. O trigo é um dos cereais mais importantes no mundo por ser uma das principais fontes da alimentação humana. Além do oídio, a cultura é afetada de forma severa por *Puccinia striiformis*, a ferrugem listrada, ou ferrugem amarela do trigo (CHEN, 2020).

Os estudos realizados no Japão foram com as culturas da soja e do arroz; principais alimentos que fazem parte da alimentação de humanos e animais (MA et al. 2013). Na cultura do arroz foram estudados os patógenos *Magnaporthe grisea* (raça 007.0) e *Xanthomonas oryzae* (cepa T7174), e na cultura da soja, *Pseudomonas syringae* DC 3000.

O cafeeiro, cultura estudada no Brasil quanto ao uso do glicerol, é umas das primeiras plantas cultivadas em regiões brasileiras. A cultura ganhou destaque mundialmente, sendo cultivada com o propósito de exportação por vários países, tornando-se essencial para famílias produtoras (CARVALHO et al. 2017).

4.3. Doses e concentrações de glicerol

As doses de glicerol mais eficientes nos estudos de indução de resistência foram relatadas por Zhang et al. (2015), Li et al. (2016) e Gazolla et al. (2019) na cultura do cacaueteiro, trigo e cafeeiro, respectivamente. As doses de 0,92 e 3% induziram resistência nas plantas, deixando claro que cada cultura infectada por patógenos diferentes, respondem de formas variadas às concentrações utilizadas. Ao comparar os resultados dos trabalhos, pode-se considerar a dose de 3% como a mais eficiente a ser usada, inclusive em trabalhos futuros devido à sua alta taxa de indução de resistência e baixa toxidez em plantas estudadas até o momento (LI et al., 2016; LI et al., 2020 e GAZOLLA et al., 2019).

Além do glicerol, houve também a utilização do produto fixador Silwett L-77. Este produto é utilizado como uma forma de adesivo para que o produto de

interesse possa aderir melhor à planta, contribuindo para uma melhor absorção. As concentrações desse produto foram de 0,02 e 0,04%. Chanda et al. (2008), Chanda et al. (2011), Mandel et al. (2012) e Venugopal et al. (2009), não utilizaram o produto fixador em seus estudos (Tabela 3).

Visto que na maioria dos trabalhos realizou-se a aplicação do glicerol com adição de Silwett L-77, sua eficiência não foi relacionada ao uso do produto, não podendo afirmar que sem o Silwett L-77 a indução de resistência seria considerada menor. As concentrações de glicerol na maioria dos trabalhos não foram definidas em porcentagem, estavam em milimolar (mM) e em micromolar (uM), mas nesta revisão sistemática foram transformadas em porcentagem por questão de uniformidade e padronização.

Das inúmeras concentrações utilizadas, as concentrações de 2-4% foram as que mais se destacaram. Gazolla et al. (2019) utilizando 1 e 3% conseguiram obter melhores resultados na concentração de 3%, tornando plantas suscetíveis de cafeeiro capazes de criar resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*).

Utilizando doses de glicerol de 1-4% em plantas de trigo na fase de plântula e adulta, foi possível observar que quanto maior a dose, maior o grau de resistência, mas com a dose mais alta, houve amarelecimento das pontas das folhas, o que levou a se considerar a melhor dose o tratamento de 3%. Com isso, somente a dose de 3% foi utilizada antes e depois da inoculação em experimentos posteriores. O momento da aplicação que resultou em maior resistência foi 1-2 dias antes da inoculação. A aplicação no mesmo dia da inoculação e após, não obteve resultados positivos quanto aos aplicados antes da existência do fungo. Contudo, para uma melhor resistência em plantas sob contínua infecção, foi necessária a aplicação da dose 3% em 1 dia antes da inoculação e 3 dias após a primeira aplicação (Li et al. 2016).

O efeito do glicerol foi positivo não somente em plântulas e na fase adulta, como também foi possível descobrir a eficiência em outras variedades de trigo (primavera chinesa, Jimai5265, Liaochun 10 e trigo duro Mo75). As concentrações de 2,5 - 3% resultaram em resistência na fase de plântulas, mas afetaram o desenvolvimento da raiz e da parte aérea (Li et al. 2016).

O glicerol é considerado tóxico dependendo da concentração utilizada e da fase de desenvolvimento da planta (JONES e VELIKY, 1980). Ocorreu fitotoxicidade em plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana*, onde o glicerol inibiu o desenvolvimento das raízes, diminuindo o nível de produção da auxina, fitohormônio responsável pelo alongamento das plantas, além de alterar a divisão celular do meristema radicular (HU et al. 2014).

Li et al. (2020) utilizaram a dose de 3% de glicerol em trigo. Os resultados foram positivos e a diferença entre o controle e o tratamento com glicerol foi significativa, onde a taxa de germinação dos esporos de oídio *Blumeria graminis* f. sp. tritici (Bgt) em folhas de trigo tratadas com água, foi de aproximadamente 90% e de 10,7% tratadas com glicerol (LI et al. 2020).

Zhang et al. (2015) utilizaram as concentrações de 100µM, 500 µM, 1000 µM, 50 mM, 70 mM e 90 mM, o que equivale a (0,46; 0,64; 0,83; 0,92; 4,6; 9,2%, respectivamente), em plantas de cacau para avaliação da resistência ao fungo *Phytophthora capsici* onde obtiveram os melhores resultados com a dose de 0,92%.

A concentração de 1% foi suficiente para expressão gênica e indução de resistência para as duas doenças estudadas, a brusone e a ferrugem das folhas na cultura do arroz selvagem (JIANG et al. 2009). Chanda et al. (2008) utilizaram a dose de 0,92% e conseguiram obter resultados positivos em plantas do tipo selvagem e gli1, onde tiveram resistência aumentada com a aplicação do glicerol.

A utilização do glicerol nas concentrações de 1 e 3% na cultura do cafeeiro apresentou resultados de indução de resistência em plantas tratadas na concentração de 3%. A resistência foi explicada pelo aumento do glicerol-3-fosfato que chegou a ser semelhante ao presente na cultivar resistente (GAZOLLA et al. 2019). O G3P já foi confirmado como uma molécula de sinalização contribuindo para SAR (Systemic Acquired Resistance) em plantas de trigo contra *Puccinia striiformis* f. sp. tritici (LI et al. 2016, LI et al. 2020).

Chanda et al. (2008) utilizaram apenas a dose de 50 mM de glicerol preparada com água estéril. Os autores não deixaram claro o motivo da escolha da dose, mas chegam a citar que o glicerol em grandes quantidades na

planta pode ser usado de forma benéfica pelo patógeno, ou seja, como fonte de carbono, promovendo aumento dos sintomas das doenças. Venugopal et al. (2009), que também fez parte do trabalho previamente citado, usou a mesma dose. Anos após, Chanda et al. (2011) testaram diferentes concentrações de glicerol (500 μ M, 50 μ M e 50 mM), mas relacionam os novos resultados às novas doses testadas nas pesquisas anteriores.

4.4. Resultados relatados nos estudos

A aplicação exógena de glicerol induziu resistência aos patógenos das plantas estudadas. A resistência se deu por meio da indução de genes, redução dos níveis de ácido oleico (18:1) e aumento da molécula G3P nas plantas. As plantas quando submetidas ao estresse biótico, podem ter respostas que permitem a remodelação da fluidez da membrana. Esta modificação na fluidez da membrana é mediada por mudanças dos níveis de ácidos graxos insaturados que conta com a atuação de enzimas desaturases dos ácidos graxos. O ajuste fino da fluidez da membrana mantém o ambiente propício para as funções integrais das proteínas durante o estresse. Portanto, a modulação dos níveis de ácido oleico (18:1) dos cloroplastos é de suma importância para a expressão normal de proteínas de respostas a patógenos (UPCHURCH et al. 2008).

Os ácidos graxos além de servirem como fonte de energia, são componentes fundamentais das membranas celulares, suberinas e seras de cutina, consideradas barreiras entre a planta e o ambiente. Estudos recentes demonstram que níveis de ácido oleico (18:1) livre nos cloroplastos regulam a resposta de defesa em plantas a patógenos, incluindo morte celular programada e SAR (Pollard et al. 2008, Walley et al. 2013). Níveis reduzidos de ácido oleico 18:1 tem sido responsáveis pela ativação constitutiva de respostas de defesa em plantas (KACHROO et al. 2007, VENUGOPAL et al. 2009).

Em dois trabalhos de Chanda et al. (2008; 2011), foi possível verificar que em plantas mutantes de *Arabidopsis* (*gli1*), não houve indução de resistência, por serem incapazes de converter glicerol em G3P. Talvez devido à baixa indução para produção das enzimas glicerol kinase (GK) e G3P desidrogenase, G3Pdh, que convertem o glicerol em G3P (MANDAL et al. 2011). O glicerol induziu a produção de ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico

(JA) em plantas de trigo, além de reduzir auxina (IAA-Indol Acetic Acid). Neste trabalho também identificaram a indução de proteínas relacionadas à patogenicidade (LI et al. 2020).

Os hormônios SA, JA e ET (Etileno) são responsáveis por sinalizações para desencadeamento de respostas de defesa nas plantas. O SA expressa proteínas (PR), enquanto o JA e o ET, são vias de sinalização ativadas a partir de ferimentos (GLAZEBROOK, 2005). Apesar da diminuição do nível de IAA, este fato não exerceu papel negativo na planta. Sua diminuição pode ter sido causada pelo SA, que quando na presença dos dois hormônios na planta, limita a produção de um deles (KOO; HEO e CHOI, 2020).

Li et al. (2016) aplicando o glicerol antes e depois da inoculação em trigo contra o *Blumeria graminis* f. sp. tritici, obtiveram resultados positivos com a concentração de 3%. A indução de resistência se deu pelas moléculas de glicerol-3-fosfato em altos níveis e baixos de ácido oleico 18:1. A aplicação que antecedeu a infecção foi realizada 1 a 2 dias, e após, uma vez a cada 4 dias. Houve indução das espécies reativas de oxigênio (ROS) e acúmulo de ácido salicílico; importante molécula para indução de resistência sistêmica adquirida.

Em estudos da resistência do trigo ao oídio, Li et al. (2020), avaliaram o transcriptoma de folhas na imunidade ativada pelo glicerol. Foi possível identificar transcritos como, TaGLI1, TaACT1 e TaSSI2, que participam do metabolismo do glicerol e ácidos graxos (FAs) que podem contribuir para o acúmulo de G3P e 18:1. De acordo com estudo de Gene Ontology, o glicerol ainda induziu resposta ao ácido jasmônico (JA), resposta de defesa à bactéria, oxidação lipídica e um fator que não está relacionado à resistência, o crescimento. O mesmo induziu o acúmulo do JA, o nível de ácido salicílico (SA) e reduziu a quantidade do hormônio auxina (IAA) nas plantas de trigo.

Os resultados de Zhang et al. (2015) em *T. cacao* x *Phytophthora capsici* foram positivos dependendo da dosagem, onde houve expressão de genes de resistência e ativação da via de espécies reativas de oxigênio (ROS). Conforme a dosagem usada, foi perceptível o aumento do nível de G3P e diminuição do ácido oleico (18:1). Usando as dosagens de 100, 500 e 1000 mM não houve diferença no tamanho das lesões, podendo concluir que o aumento

da concentração não fez diferença, e que a quantidade de 100 mM já é suficiente para desencadear as vias de resistência.

Estudando o fator sistêmico do glicerol em cacauero contra o *Phytophthora capsici*, Zhang et al. (2015) verificaram que o produto não foi capaz de ativar vias de resistência em tecidos distais, ou seja, não tratados, sinalizando que todas as folhas devam ser tratadas com glicerol. As folhas distais não diferiram nos níveis de G3P, ácido oleico e ROS comparadas ao controle. Neste caso, o G3P não respondeu como um sinal móvel de resistência na cultura do cacauero. Já Chanda et al. (2011) confirmaram que o G3P é capaz de se deslocar para outros tecidos ativando a via da resistência sistêmica adquirida contra infecção secundária.

Como em outros estudos foi perceptível a redução do ácido oleico a partir da aplicação de glicerol, no trabalho desenvolvido por Kachroo et al. (2008), não foi diferente nas plantas de soja, demonstrando mais uma vez que, quanto maior a dose de glicerol, menor o nível de ácido oleico (18:1). Devido ao glicerol, as plantas apresentaram lesões semelhantes a células mortas. Segundo os autores, isso está relacionado ao aumento de ROS e indução de genes PR-1, PR-1a, SCaM-4 e SCaM-5. O glicerol fez com que as plantas se tornassem resistentes aos patógenos bacterianos e oomicetos. Houve redução da suscetibilidade e sobrevivência superior a 80% das plantas tratadas. A concentração de 100 mM foi considerada melhor, sendo utilizada em trabalhos posteriores (KACHROO et al., 2008).

Jiang et al. (2009) avaliando respostas de plantas de arroz tratadas com glicerol para resistência às doenças, brusone e queima das folhas, tiveram resultados positivos com expressão de genes de resistência e redução nos níveis de ácido oleico (18:1). Gazolla et al. (2019) testando duas concentrações de glicerol em plantas suscetíveis de café, reportaram que a aplicação de glicerol favoreceu à resistência semelhante à cultivar resistente, identificando a importância do G3P para resistência a doenças e eficiência da aplicação antes da inoculação.

Resultados negativos foram encontrados em plantas gli1 mutantes de *Arabidopsis* por serem incapazes de converter glicerol em G3P (CHANDA et al.

2008) na defesa contra o fungo hemibiotrófico *Colletotrichum higginsianum*. O mesmo ocorreu nos estudos de Chanda et al. (2011) quando testaram SAR em plantas mutantes de *Arabidopsis* contra a bactéria *Pseudomonas syringae* DC 3000, onde plantas gli eram suscetíveis devido ao fato de não serem capazes de metabolizar o glicerol em G3P, o que descartou a eficiência do glicerol para a SAR. Xia et al. (2009) discute que plantas mutantes de *Arabidopsis* são defeituosas na produção da proteína de acila (ACP4), componente crítico da biossíntese de FA (fatty acids – ácidos graxos), prejudicando a formação de cutícula nas folhas. Assim, as plantas chegam a produzir o sinal de resistência, mas são incapazes de recebê-lo, ficando prejudicadas no início da SAR.

A aplicação de glicerol diminuiu os níveis de ácido oleico (18:1) e induziu o acúmulo de óxido nítrico (NO) em plantas de *Arabidopsis* contra a bactéria *Pseudomonas syringae* DC 3000 (MANDAL et al. 2012). O óxido nítrico (NO) é uma molécula que participa em várias respostas como germinação, florescimento, abertura e fechamento de estômatos, inclusive na defesa das plantas contra patógenos (Wilson et al. 2008).

Mandal et al. (2012), em seus estudos com *Arabidopsis*, demonstrou a relação entre ácido oleico 18:1 e rotas de sinalização de defesa mediadas por NO, onde o ácido oleico (18:1), sintetizado no cloroplasto, regula a estabilidade da proteína associada ao óxido nítrico (NOA1), e conseqüentemente a biossíntese e acúmulo de NO, levando a promover mais resistência da planta a doenças. Além disso, ao se comparar esses resultados da aplicação exógena do glicerol com outros produtos como manitol e sorbitol, que não reduzem a quantidade de ácido oleico 18:1, não houve acúmulo da molécula de sinalização NO.

4.5. Genes expressos em resposta à indução de resistência a partir do uso do glicerol

Dentre os trabalhos que realizaram a análise de expressão gênica, vários genes em resposta à infecção quando tratados com glicerol, foram identificados. O gene PR-1 foi o mais expresso, sendo este um gene já conhecido por alta indução em plantas infectadas quando em sua forma básica (GUIMARÃES, 2007). O PR-1, um dos membros das 17 famílias das proteínas PRs (Pathogen Related), está presente em todas as plantas no momento de

defesa contra os ataques de patógenos (KATTUPALLI; SRINIVASAN; SONIYA, 2021).

A calmodulina (CaM), é uma proteína Ca^{2+} dependente e suas isoformas, SCaM-4 e SCaM-5, são ativadas por elicitores de patógenos durante a infecção. A expressão constitutiva, em tabaco, demonstrou sua participação na indução de lesões e à expressão de genes associados à SAR (Heo et al. 1999). No trabalho desenvolvido por Kachroo et al. (2008), plantas de soja tratadas com glicerol apresentaram lesões de morte celular, o que foi correlacionado com a expressão dos genes PR-1 e PR-1a. Com o tratamento de 50, 100, 200, 300 e 400 mM de glicerol, a cada 24 h durante 3 dias, também foram expressos os genes SCaM-4 e SCaM-5 (KACHROO et al. 2008).

Devido aos genes expressos responsivos ao ácido salicílico, não houve a expressão do ácido jasmônico. Um estudo avaliou a PR-1 durante a infecção por *Phytophthora capsici* em plantas Panniyur-1, e descobriram que este gene é ativado no momento inicial da infecção, como PTI (KATTUPALLI; SRINIVASAN e SONIYA, 2021).

Outros genes induzidos após tratamentos com glicerol foram identificados em plantas de trigo. Além do Hsp70, o POX e LOX6, esses foram induzidos antes mesmo da ativação da resistência sistêmica adquirida (LI et al., 2020). O gene LOX6 está envolvido na defesa da planta contra os ataques de insetos, sinalizando feridas de longas distâncias, além de ser importante no acúmulo inicial do jasmonato (JA) e jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) (CHAUVIN et al. 2016; CHAUVIN et al. 2012).

Os genes HSP70 e HSP90, são genes ativados quando a planta passa por choque térmico (HSIR). No trabalho de Widiastuti et al. (2021) com pepino, verificaram que quando as plantas foram submetidas ao choque térmico, houve a indução deste gene após 12 h do tratamento. O gene LOX expresso em plantas de trigo após tratamento com glicerol, é um importante componente na via do JA para produção do fitohormônio (LIU et al., 2016).

Avaliando plantas de trigo tratadas com 1, 2, 3 e 4% de glicerol em resposta de defesa contra o oídio, a resistência por meio do gene TaGLI1 antes e depois da inoculação, foi avaliada e a análise de expressão gênica revelou

que após 24h da inoculação, a expressão deste gene foi maior quando comparado à 0h (LI et al. 2016); demonstrando resposta de defesa da planta na presença do patógeno.

A diferença da expressão gênica quando comparado folhas tratadas com glicerol e folhas tratadas com água, é bem perceptível, a exemplo dos genes R em plantas de trigo em que a expressão foi de 3,6 maior em folhas tratadas com glicerol. O gene TaPR-2A foi expresso quase 10x em relação ao controle tratado com água, demonstrando a eficiência do glicerol no controle do oídio (LI et al. 2016). O *Blumeria graminis*, causador do oídio é um patógeno biotrófico que ativa a via de genes como o PR2 de forma local e sistêmica contribuindo para resistência sistêmica adquirida (ALI et al. 2018).

Li et al. (2020), avaliando a indução de resistência do trigo ao oídio pelo tratamento de apenas 3% de glicerol, afirmaram que os genes expressos após a infecção são importantes para resistência, pois, contribuem para a produção de moléculas indutoras de resistência como G3P e ácidos graxos, e também para a resistência sistêmica adquirida ao ativar vias associadas ao acúmulo de ROS e morte celular. Os genes WRKY45 e PR1b foram expressos em plantas de arroz como resposta de resistência para as doenças brusone e murcha bacteriana (JIANG et al. 2009).

Genes relacionados à patogênese (PR genes) foram expressos em conjunto após aplicação de glicerol em plantas de cacau para resistência à *Phytophthora capsici*, onde Zhang et al. (2015) identificaram aumento de até 4174 vezes em plantas tratadas com dose de 500 mM. A expressão de genes foi dependente da dose utilizada. Com a menor dose de 100 mM, os genes PR-3Q e o PR-5, não foram induzidos significativamente em cacauzeiro. A expressão de TcCHI4 foi significativa nas duas doses de 100 e 500 mM, chegando a ser expresso em cinco e trinta vezes. Os genes da quitinase também foram expressos em trigo contra o fungo patogênico *Phytophthora capsici* (Li et al. 2020). Os genes CHI são proteínas relacionadas à patogênese que tem como função degradar o composto quitina, presente na parede celular de algumas bactérias e maioria dos fungos (JALIL; ANSARI e MISHRA, 2015; LIU et al. 2016).

4.6. Técnicas utilizadas para aplicação do glicerol

Dos 10 estudos encontrados sobre o uso do glicerol em plantas para indução de resistência, apenas um não especificou a técnica utilizada; os demais utilizaram a técnica de pulverização e imersão. O objeto utilizado na pulverização do produto não foi especificado. Apesar da imersão ser pouco utilizada na aplicação de glicerol, é uma técnica considerada mais eficaz por permanecer mais tempo em contato com a área de interesse e para que a pulverização tenha resultados semelhantes, são necessárias várias aplicações para a produção de camadas do produto (SCHLENOFF, DUBAS e FARHAT, 2000).

Em Li et al. (2016), a solução de glicerol para uso em plantas de trigo para resistência ao oídio (Bgt), foi preparada com água estéril adicionada de 0,02% de Silwett L-77. O tratamento controle tratado somente com água conteve apenas o Silwett L-77. Os líquidos foram aplicados até escorrimento nas folhas. A inoculação ocorreu um dia após o pré-tratamento e após a inoculação, realizando-se quatro aplicações.

Li et al. (2020) pulverizaram solução com 3% de glicerol contendo 0,02% de Silwett L-77 em plantas de trigo para resistência ao oídio (Bgt). Para o tratamento controle, a água também conteve Silwett L-77. As plântulas com folhas totalmente expandidas receberam os tratamentos duas vezes (uma vez ao dia) até que o líquido escorresse das folhas.

Plantas de cacaueteiro em estágio de desenvolvimento foram tratadas com glicerol preparado com água estéril contendo 0,04% de Silwett L-77. O tratamento com água também conteve o Silwett L-77. A técnica por imersão foi utilizada com soluções de 100 mL, imergindo folhas por 10s a cada 24 h por 3 dias (Zhang et al. 2015).

Também utilizando 0,04% de Silwett L-77 em plantas de soja no estágio de crescimento V1, Kachroo et al. (2008) aplicaram o glicerol com pulverizações a cada 24h durante 3 dias para resistência às doenças *Pseudomonas syringae* pv. glicina e *Phytophthora sojae*. Se baseando no trabalho de Kachroo et al. (2008), Jiang et al. (2009) fizeram algumas modificações na metodologia utilizando somente a concentração de 1%. A

concentração de Silwett L-77 foi de 2% e a aplicação foi realizada uma vez ao dia por dois dias consecutivos em plantas de arroz com 4 ou 6 folhas.

Chanda et al. (2008) e Venugopal et al. (2009) pulverizam com 50 mM de glicerol e água estéril em plantas de *Arabidopsis* inoculadas para estudo contra o *C. higginsianum*. Mendel et al. (2012) utilizaram 500 μ M, 50 mM, 100 a 1000 μ M e 100 μ M de glicerol em plantas silvestres e mutantes de *Arabidopsis* para resistência a *Pseudomonas syringae* DC 3000, e Chanda et al. (2011) também usaram a técnica de pulverização de glicerol a 500 μ M, 50 mM ou 50 μ M em plantas de soja para indução de resistência contra *Pseudomonas syringae* DC 3000. Gazolla et al. (2019) não disponibilizaram a metodologia aplicada, mas informaram que aplicaram as dosagens de 1 e 3% de glicerol para resistência à ferrugem do cafeeiro.

4.7. Mecanismos bioquímicos que participam da via de resistência em plantas tratadas com glicerol

Os efeitos bioquímicos do glicerol para resistência às doenças em alguns estudos estiveram relacionados à redução do ácido oleico (18:1) na indução de resistência. Além do ácido oleico (18:1) houve presença de outros metabólitos dos ácidos graxos (FAs), hormônios vegetais e genes relacionados à patogênese. O ácido oleico (18:1) faz parte dos ácidos graxos insaturados (UFAs), e possui tanto a fase positiva, quanto negativa. Exerce funções na planta contra estresses bióticos e abióticos, mas também pode elevar o estresse oxidativo que compromete as células vegetais, chegando a dificultar o processo fotossintético e até induzir mutação genética (SHARMA et al. 2012; HE e DING, 2020).

A ação da aplicação do glicerol com resultado do aumento do G3P diminui sempre a produção de ácido oleico (18:1) e esta diminuição é benéfica no processo de defesa da planta contra patógenos. Sua diminuição ocorre com a mutação da proteína dessaturase transportadora de estearoil-acil codificada (SACPD) que induz defesa constitutiva ativando a expressão de genes (CHANDA-SHEKARA et al. 2007). Em plantas mutantes de *Arabidopsis*, a diminuição do ácido oleico foi capaz de expressar o gene PR1 mediado pelo SA. O processo bioquímico ocorre nos plastídeos com a acilação do G3P com

o ácido oleico e a sinalização, além de ocorrer por ácido salicílico, também ocorre por ácido jasmônico (KACHROO et al. 2004).

A acilação entre o ácido oleico e o glicerol-3-fosfato é importante no processo de defesa em plantas. Onde não ocorre a acilação, como por exemplo, em plantas *act1*, a expressão dos genes de defesa como o PR1 não ocorre pela falta de indução do SA. Em plantas onde não ocorre a acilação, a expressão de PR1s não é aumentada (Chandra-Shekara et al. 2007).

O ácido oleico juntamente com outros ácidos graxos, ácido linolênico e o ácido linoleico, foram aplicados em plantas para diminuição do crescimento de fungos fitopatogênicos. Foi demonstrado que os ácidos graxos inibem o desenvolvimento dos microrganismos, mas o mecanismo que desenvolve este fenômeno não foi descoberto até o momento (WALTERS et al. 2004). A inibição não acontece com todos os ácidos graxos. Em alguns casos, como no trabalho de Amruthesh et al. (2005), os autores verificaram que quando utilizado o ácido oleico, não ocorreu diminuição significativa no desenvolvimento do patógeno, como ocorreu com outros ácidos.

Nos estudos avaliados, a atividade do glicerol esteve relacionada à ativação de vias para indução de resistência às doenças com genes e proteínas relacionados à patogenicidade, além da resistência estar relacionada com o aumento do glicerol-3-fosfato e à diminuição dos níveis de ácido oleico (18:1) (JIANG et al. 2009; ZHANG et al. 2015).

O G3P participa como sinal para resistência sistêmica adquirida para evitar infecções secundárias. Em resistência contra rizóbios indesejáveis, o G3P conta com ajuda de um sinal até então desconhecido para induzir seu acúmulo e ativar a SAR na parte aérea da planta, voltando para parte radicular eliminando os rizóbios não benéficos (SHINE et al. 2019).

O uso de glicerol de forma exógena sempre esteve relacionado à diminuição do ácido oleico (18:1). Seu nível baixo faz aumentar a resistência por meio da expressão de genes R sem precisar da presença do SA (CHANDA-SHEKARA et al. 2007). Foi o que Li et al. (2016) consideraram com a diminuição do ácido oleico (18:1) nas plantas infectadas pelo oídio tratadas com glicerol em comparação às plantas tratadas com água.

5. CONCLUSÃO

A quantidade de estudos utilizando o glicerol como indutor de resistência em plantas contra fatores bióticos ainda são poucos, principalmente no Brasil, onde há apenas um artigo publicado. A forma de aplicação que a maioria utilizou é de fácil repetição, não dificultando a repetição por parte de futuros trabalhos.

O glicerol aplicado de forma exógena em plantas, seja na fase de plântula, ou adulta, vem trazendo efeitos positivos às mesmas quando aplicado no período correto e dose adequados. Apesar de alguns periódicos não avaliarem a expressão gênica, foi possível, por meio dos que avaliaram, identificar genes que fazem parte do processo de resistência a partir do uso do glicerol. O aumento da resistência está relacionado à diminuição do ácido oleico (18:1) e aumento da molécula G3P.

Os dados obtidos esclarecem que dos 10 estudos encontrados nas bases de dados publicados nos últimos 14 anos, a maior parte é de uma única espécie de interesse não agrônômico, chamando atenção para que, apesar de resultados positivos, espécies agrícolas que tanto são afetadas por patógenos causadores de doenças em várias partes do mundo, ainda não estão sendo estudadas a fim de solucionar problemas fitopatológicos de forma mais sustentável.

Trabalhos futuros utilizando o glicerol com dosagem já utilizadas, ou até mesmo testando novas, são de extrema importância, principalmente em culturas agrícolas afetadas por patógenos em que sua principal forma de inibição seja o uso de produto químico e como também para esclarecer as vias do glicerol que leva a planta a induzir a resistência.

6. REFERÊNCIAS

ALI, S.; GANAI, B. A.; KAMILI, A. N.; BHAT, A. A.; MIR, Z. A.; BHAT, J. A.; TYAGI, A.; ISLAM, S. T.; MUSHTAQ, M.; YADAV, P.; RAWAT, S.; GROVER, A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, 212–213 P. 29–37, 2018. doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008.

AMRUTHESH, K. N.; GEETHA, N. P.; JORGENSEN, H. J. L.; NEERGAARD, E. de.; SHETTY, H. S. Unsaturated fatty acids from zoospores of *Sclerospora*

graminicola induce resistance in pearl millet. **European Journal of Plant Pathology**, p. 125–137 p. 2005.

BOLLER, T. e FÉLIX, J. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annu Ver Plant Biol.** 2009. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.

CARVALHO, A. C.; CARVALHO, D. F.; FILGUEIRAS, G. C.; ARAÚJO, A. C. S.; CARVALHO, A. V. Panorama e importância econômica do café no mercado internacional de commodities agrícolas: uma análise espectral. **Agroecosistemas**, v. 9, n. 2, p. 223 – 222. 2017.

CHANDA, B.; VENUGOPAL, S.C.; KULSHRESTHA, S. NAVARRE, D. A.; DOWNIE, B.; VAILLANCOURT, L.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Glycerol-3-phosphate levels are associated with basal resistance to the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** V. 147, P. 2017-2029. 2008. DOI: 10.1104/pp.108.121335.

CHANDA, B.; XIA, Y.; MANDAL, M. K.; YU, K.; SEKINE, K. T.; GAO, Q. M.; SELOTE, D.; HU, Y.; STROMBERG, A.; NAVARRA, D.; JACHROO, A.; KACHROO. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. **Nature genetics.** V. 43, 2011. DOI:10.1038/ng.798.

CHANDRA-SHEKARA, A.C.; VENUGOPAL, S. C.; BARMAN, S. R.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Plasma fatty acid levels regulate resistance gene-dependent defense signaling in *Arabidopsis*. **PNAS**, apr. v. 104, n.17, p. 7277-7282. 2007. DOI: 10.1073/pnas.0609259104.

CHANG, M.; CHEN, H.; LIU, F.; FU, Z. Q. PTI e ETI: convergent pathways with diverse elicitors. **Trends in Plant Science**, fev. vol. 27, 2022. DOI: 10.1016/j.tplants.2021.11.013.

CHAUVIN, A.; CALDELARI, D.; WOLFENDER, J. L.; FARMER, E. E. Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. **New phytologist.** V. 197, p. 566-575. 2012. DOI: 10.1111/nph.12029.

CHAUVIN, A.; LENGLET, A.; WOLFENDER, J. L.; FARMER, E. E. Paired Hierarchical Organization of 13-Lipoxygenases in *Arabidopsis*. **Plants.** V. 5, 2016. DOI: 10.3390/plants5020016.

CHEN, X. Pathogens which threaten food security: *Puccinia striiformis*, the wheat stripe rust pathogen. **Food security.** 239-251, 2020. DOI: 10.1007/s12571-020-01016-z.

CHENG, C.Y.; KRISHNAKUMAR, V.; CHAN, A.P.; THIBAUD-NISSEN, F.; SCHOBEL, S.; TOWN, C.D. Araport11: A complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. **The Plant Journal.** 2017, 89, 789–804. DOI: 10.1111/tpj.13415.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature reviews genetics.** Pag. 539–548, 2010. DOI: 10.1038/nrg2812.

GAZOLLA, L. C. O. F.; ALMEIDA, D. P.; CASTRO, I. S. L.; CASTRO, A. G.; ARRUDA, L. V. S.; VIEIRA, N. M.; MANTOVANI, H. C.; ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E. T.; MENDES, T. A. O. Transcriptional regulation of glycerol-3-phosphate metabolism induces resistance to coffee rust. Vitória-ES, 5 p. 2019.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathol.* 2005. 43. 205–227. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.

HEO, W. D.; LEE, S. H.; KIM, M. C.; KIM, J. C.; CHUNG, W. S.; CHUN, H. J.; LEE, K. J.; PARK, C. Y.; PARK, H. C.; CHOI, J. Y.; CHO, M. J. Plant Biology Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):766-771. DOI: 10.1073/pnas.96.2.766.

HU, J.; ZHANG, Y.; WANG, J.; ZHOU, Y. Glycerol Affects Root Development through Regulation of Multiple Pathways in Arabidopsis. *Plos one.* 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0086269.

HORBACH, R.; NAVARRO-QUESADA, A. R.; KNOGGE, W.; DEISING, H. B. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology.* V.1 January 2011, Pages 51-62. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.06.014.

ISMAIL, A. M.; HORIE, T. Genomics, Physiology, and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance. *Annu Rev Plant Biol.* 2017 Apr 28;68:405-434. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042916-040936.

JALIL, S, U.; ANSARI, M, I.; MISHRA, M. Current view on chitinase for plant defence. *Trends in Biosciences*, p. 6733-6743, 2015.

JIANG, C. J.; SHIMONO, M.; MAEDA, S.; INOUE, H.; MORI, M.; HASEGAWA, M.; SUGANO, S.; TAKATSUJI, H. Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene OsSSI2 enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Mol Plant Microbe Interact.* Vol. 22, nº 7. p. 820-829. 2009. DOI: 10.1094/MPMI-22-7-0820.

JONES, A.; VELINK, I. A. Growth of plant cell suspension cultures on glycerol as a sole source of carbon and energy. *Canadian Journal of Botany.* v.58, p.648-657, 1980.

KACHROO A.; SHANKLIN. J.; WHITTLE, E.; LAPCHYK, L.; HILDEBRAND, D.; KACHROO, P: The Arabidopsis stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Mol Biol.* 2007, 63:257-271. Doi: 10.1007/s11103-006-9086-y.

KACHROO, A.; FU, D. Q.; HAVENS, W.; NAVARRA, D.; KACHROO, P.; GHABRIAL, S. A. An oleic acid-mediated pathway induces constitutive defense signaling and enhanced resistance to multiple pathogens in soybean. *Mol Plant Microbe Interact.* Vol. 21, nº 5, 2008, pp. 564-575. DOI: 10.1094 / MPMI-21-5-0564.

KACHROO, A.; VENUGOPAL, S. C.; LAPCHYK, L.; FALCONE, D.; Hildebrand,D.; KACHROO, P. Oleic acid levels regulated by glycerolipid

metabolism modulate defense gene expression in Arabidopsis. PNAS. pág. 5152–5157. vol. 101, n. 14. April 6, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0401315101.

KATTUPALLI, D.; SRINIVASAN, A.; SONIYA, E. V. Uma análise de todo o genoma dos genes da proteína 1 relacionada à patogênese (PR-1) de *Piper nigrum* revela seu papel crítico durante a infecção por *Phytophthora capsici*, Genes, V. 12, 2021. DOI: 10.3390/genes12071007.

KOO, Y. M.; HEO, A. Y.; CHOI, H. W. Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator. Plant Pathology Journal. V. 36(1): 1–10, 2020. DOI: 10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295.

LI, Y.; QIU, L.; LIU, X.; ZANG, Q.; ZHAUNSON, X.; FAHIMA, T.; KRUGMAN, T.; SUN, Q.; XIE, C. Glycerol-Induced Powdery Mildew Resistance in Wheat by Regulating Plant Fatty Acid Metabolism, Plant Hormones Cross-Talk, and Pathogenesis-Related Genes. International Journal of Molecular Sciences. V. 21, 19 P., 2020. DOI: 10.3390/ijms21020673.

LI, Y.; SONG, N.; ZHAO, C.; LI, F.; GENG, M.; WANG, Y.; LIU, W.; XIE, C.; SUN, Q. Application of glycerol for induced Powdery Mildew resistance in *Triticum aestivum* L. Frontiers in Physiology. V. 7, 13 P., 2016. DOI: 10.3389/fphys.2016.00413.

LIU, H.; CARVALHAIS, L. C.; KAZAN, K.; SCHENK, P. M. Development of marker genes for jasmonic acid signaling in shoots and roots of wheat. Plant Signaling & Behavior. 2016. DOI:10.1080/15592324.2016.1176654.

MA, L.; WANG, F.; ZHANG, W.; MA, W.; VELTHOF, G.; QUIN, W.; OENEMA, O.; ZHANG, F. Environmental Assessment of Management Options for Nutrient Flows in the Food Chain in China. Environmental Science e Technology. P. 7260-7268, 2013. DOI: 10.1021/es400456u.

MANDAL, M. K.; CHANDRA-SHEKARA, A. C.; JEONG, R. D.; Yu, K.; ZHU, S.; Chanda, B. ; NAVARRE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Oleic acid dependent modulation of nitric oxide associated1 protein levels regulates nitric oxide mediated defense signaling in Arabidopsis. The Plant Cell. V. 24, P. 1654–1674. 2012. DOI:10.1105/tpc.112.096768.

MENDEL, M. K.; CHANDA, B.; XIA, Y.; YU, K.; SEKINE, K.; GAO, QM.; SELOTE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Glycerol-3-phosphate and systemic immunity. Plant signaling e behavior. 2012, DOI: 10.4161/psb.6.11.17901.

NGOU, B. P. M.; AHN, HK.; DING, P.; JONES, J. D. G. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. Nature.592, pages110–115, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03315-7.

POLLARD, M.; BEISSON, F.; LI, Y.; OHLROGGE, J. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. Trends Plant Sci. V. 13, p. 236-46, 2008. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.03.003.

PROVART, N.J.; ALONSO, J.; ASSMANN, S.M.; BERGMANN, D.; BRADY, S.M.; BRKLJACIC, J.; BROWSE, J.; CHAPPLE, C.; COLOT, V.; CUTLER, S.; et al. 50 years of Arabidopsis research: Highlights and future directions. New Phytologist Foundation. 2016, 209, 921–944.

SALLES, B. P. A.; DAVID, A. M. S. S.; FIGUEIREDO, J. C.; MAIA, V. M.; PRUDÊNCIO, J. R. S.; PEREIRA, K. K. G. Viabilidade de sementes de cacau e limitações no armazenamento. *Revista de Ciências Agrárias*, 2019. P. 1010-1014. DOI: 10.19084/rca.18166.

SCHLENOFF, J. B.; DUBAS, S. T.; FARHAT, T. Sprayed polyelectrolyte multilayers. ACS Publications. 2000. DOI: 10.1021/la001312i.

SHINE, A. B.; GAO, Q-M.; CHOWDA-REDDY, R.V.; SINGH, A. K.; KACHROO, P.; KACHROO, A. Glycerol-3-phosphate mediates rhizobia-induced systemic signaling in soybean. *Nature communications*. 10:5303, 13 p. 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-13318-8.

SILVA, C. D. Cultura da soja (glycine max): uma abordagem sobre a viabilidade do cultivo no município de ribeira do pombal (BA). Monografia (bacharel em Engenharia Agrônômica) - Centro Universitário AGES, Paripiranga, p. 84. 2021.

SPANU, P. D.; PANSTRUGA, R. Editorial: Biotrophic Plant-Microbe

Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 13 February 2017, Vol. 8, 2017.

DOI: 10.3389/fpls.2017.00192.

UPCHURCH, R. G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30, 967-977 p. 2008. DOI: 10.1007/s10529-008-9639-z.

VAN ECK, N.; WALTMAN, L. Pesquisa de software: VOSviewer, um programa de computador para mapeamento bibliométrico. *Cientometria* 2010, 84, 523–538.

VENUGOPAL, S. C.; JEONG, R. D.; MANDAL, M. K.; ZHU, S.; CHANDRA-SHEKARA A. C.; XIA, Y.; HERSH, M.; STROMBERG, A.J.; NAVARRE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Enhanced disease susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling. *PLoS Genet*, 2009. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000545.

VENUPOPAL, S. C.; CHANDA, B.; VAILLANCOURT, L.; KACHROO, A.; KACHROO, P. The common metabolite glycerol-3-phosphate is a novel regulator of plant defense signaling. *Plant Signaling e Behavior*. p. 746-749, 2009. DOI: 10.4161/psb.4.8.9111.

VLOT, A. C.; VENDAS, J. H.; LENK, M.; BAUER, K.; BRAMBILLA, A.; SOMMER, A.; CHEN, Y.; WENIG, M.; SHAHRAN, N. Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*. p. 1234–1250. 2020. DOI: 10.1111/nph.16953.

WALLEY, J. W.; KLIEBENSTEIN, D.; BOSTOCK, R.; DEHESH, K. Fatty acids and early detection of pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*. 520-526, p. 2013. DOI: org/10.1016/j.pbi.2013.06.011.

WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER, R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against Plant Pathogenic fungi. *Mycopathologia*. p. 87–90, 2004.

WIDIASTUTI, A.; AROFATULLAH, N. A.; KHARISMA, A. D.; SATO, T. Upregulation of heat shock transcription factors, Hsp70, and defense-related genes in heat shock-induced resistance against powdery mildew in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 7 p. 2021. DOI: 10.1016/j.pmpp.2021.101730.

XIN, X. F.; KVIKTO, B.; HE, S. Y. *Pseudomonas Syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. v.16, p. 316-328, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2018.17.

XIA, Y.; GAO, QM.; YU, K.; LAPCHYK, L.; NAVARRE, D.; HILDEBRAND, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. An intact cuticle in distal tissues is essential for the induction of systemic acquired resistance in plants. *Cell Host Microbe*. p. 151-165. 2009. DOI: 10.1016/j.chom.2009.01.001.

WILSON, I.D.; NEILL, S.J.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ*. 31: 622–631, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01761.x.

VELÁSQUEZ, A. C.; CASTROVERDE, C. D. M.; HE, S. Y. Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Current Biology*. V. 28, n. 10, p. 619-634. 2018. DOI: 10.1016/j.cub.2018.03.054.

ZHANG, Y.; TH, P. L. S.; IMOVA, S. E. N. M.; INAN, G. L. Application of glycerol as a foliar spray activates the defence response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. *Molecular Plant Pathology*. p. 27-37. 2015. DOI: 10.1111/mpp.12158.

CAPÍTULO 2

HISTOQUÍMICA E EXPRESSÃO GÊNICA COM USO DO GLICEROL NO PATOSSISTEMA *Musa x Micosphaerella fijiensis*

HISTOQUÍMICA E EXPRESSÃO GÊNICA COM USO DO GLICEROL NO PATOSSISTEMA *Musa x Micosphaerella fijiensis*

RESUMO: A bananeira é uma planta acometida por vários patógenos, tendo como um dos principais o fungo hemibiotrófico, *Mycosphaerella fijiensis*, causador da Sigatoka negra. A Sigatoka negra (SN) é uma doença que causa lesões foliares que impedem o processo de fotossíntese, culminando em frutos de má qualidade. O controle da (SN) é feito por meio de pulverizações sistemáticas, que além de danificarem o meio ambiente e a saúde humana, aumentam significativamente os custos para os produtores. Sendo assim, medidas mais ambientalmente corretas, que possam apresentar um controle mais sustentável da doença no campo, são de extrema importância. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar respostas de resistência mediadas pelo glicerol em plantas de bananeiras da cultivar Grande Naine, suscetível à SN. O experimento foi conduzido em DIC (Delineamento inteiramente casualizado) com 5 tratamentos: controle, 0, 3, 5 e 8% de glicerol e três repetições. Foram avaliadas a cada sete dias a severidade da doença após os primeiros sintomas. Na análise de ID (Índice de doença) e AACPD (Área abaixo da curva da progressão da doença), a concentração de 5% de glicerol se mostrou a mais atrativa. Os parâmetros: produção de calose, estruturas fúngicas e expressão gênica foram avaliados nos tempos antes dos tratamentos e antes da inoculação, 72 horas após inoculação (HAI), 5, 15, 30 e 60 dias após inoculação (DAI). Para a análise de expressão gênica, foram utilizados os genes de transdução de sinais (STRANS) e o de reconhecimento e sinalização (KINLRR) e os genes de referência, L2MU e o 25S. A histoquímica foi conduzida para detecção de calose com auxílio dos corantes reativo de lugol e azul de anilina. A análise de histologia ocorreu por meio do clareamento com KOH (10,0M), ácido clorídrico e coloração com azul de tripan. Por meio de clareamento de tecido foliar foi possível visualizar estruturas do patógeno desde as 72 HAI. Na análise de calose, identificou-se a produção do composto nas primeiras avaliações em todos os tratamentos com glicerol. Na análise de expressão gênica, os genes alvos de resistência, STRANS e KINLRR, tiveram maior expressão nos tratamentos com maiores concentrações de 5-8% de glicerol. A partir dos resultados apresentados, o glicerol parece ser um bom indutor de resistência para plantas de bananeira quando utilizado na dose de 5%, mas, são necessários outros estudos para verificar o melhor momento da aplicação dos tratamentos, inoculação, e doses a serem utilizadas.

Palavras-chave: Grande Naine, resistência, KINLRR, STRANS.

HISTOCHEMISTRY AND GENE EXPRESSION WITH THE USE OF GLYCEROL IN THE PATHOSYSTEM *MUSA X MICOSPHAERELLA FIJIENSIS*

ABSTRACT: Bananas are affected by several pathogens, one of the main ones being *Mycosphaerella fijiensis*, an hemibiotrophic fungus that causes black Sigatoka (BS). Black Sigatoka is a disease that causes leaf lesions that hinders photosynthesis, culminating in fruits of poor quality. The control of black Sigatoka is carried out through systemic spraying that, in addition to damaging the environment and human health, increases costs for producers. Hence, more environmentally correct measures, which can present a more sustainable control of the disease in the field, are extremely important. Therefore, the objective of this study was to verify glycerol-mediated resistance responses in banana plants of the Grande Naine cultivar susceptible to BS. The experiment was conducted in randomized blocks with 5 treatments, namely: control, 0, 3, 5 and 8% glycerol and two replicates. The severity of the disease after the first symptoms was assessed every seven days. DI (Diseases index) and AUDPC (Area under the disease progress curve) analysis showed that glycerol at 5% was more promising. The following parameters: callus production, fungal structures and gene expression were evaluated before treatments, before inoculation, 72 hours after inoculation (HAI), 5, 15, 30 and 60 days after inoculation (DAI). For gene expression analysis, the signal transduction genes (STRANS) and the recognition and signaling genes (KINLRR) and the reference genes, L2MU and 25S, were used. Histochemistry was performed to detect calosis with the aid of relative dyes of lugol and aniline blue. Histology analysis was performed by bleaching with KOH (10.0M), hydrochloric acid and trypan blue staining. By means of leaf tissue clearing, it was possible to visualize pathogen structures from 72 HAI. In the analysis of calosis, the production of the compound was identified in the first evaluations in all glycerol treatments. The target resistance genes, STRANS and KINLRR, had higher expression in the treatments with 5-8% glycerol. From the results presented, glycerol appears to be a good resistance inducer for banana plants when used at a dose of 5%, but further studies are needed to verify the best time to apply treatments, inoculation, and doses to be used.

Key-words: Grand Nain, resistance, KINLRR, STRANS.

1. INTRODUÇÃO

O primeiro relato da Sigatoka Negra (SN) no Brasil foi no ano de 1998, em regiões produtoras no estado do Amazonas (CORDEIRO, 2015). Esta doença está entre as principais doenças fúngicas que atacam a cultura da bananeira. Os sintomas se manifestam nas folhas das plantas por meio de estrias escuras, fazendo com que sua área foliar seja prejudicada, impedindo a realização do processo fotossintético. Os frutos produzidos não possuem qualidade de mercado devido ao amadurecimento prematuro, o que os tornam impróprios para mercado, implicando em prejuízos financeiros para os produtores (GASPAROTTO e PEREIRA, 2010).

A SN tem avançado em território nacional, chegando recentemente no Estado da Bahia em 2018. Além da Bahia, a SN se encontra nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins (MAPA, 2021).

O principal meio de controle da doença é via pulverizações sistemáticas, que trazem prejuízos tanto para o homem e animais, quanto para o meio ambiente, sendo o plantio de cultivares resistentes a medida mais ambientalmente correta. No entanto, as variedades resistentes não são as principais plantadas no Brasil e no mundo, necessitando de outras medidas de controle mais factíveis e aplicáveis em curto prazo (GARRUTI et al., 2012).

A cultivar Grande Naine (AAA) pertence à espécie *Musa acuminata*, subgrupo Cavendish, cultivada comercialmente em regiões tropicais e subtropicais (ELBAGOURY et al. 2022). A Grande Naine sofre prejuízos durante seu ciclo que é afetado por doenças severas que limitam seu desenvolvimento, a exemplo da SN, considerada uma das principais doenças fúngicas que atingem a cultura da bananeira.

A SN causada pelo fungo hemibiotrófico na sua fase sexuada *M. fijiensis* (ascósporos) e na sua forma axesuada *P. fijiensis* (conídios) é uma doença policíclica que infecta a bananeira diversas vezes dentro de um único ciclo de desenvolvimento (GUSMÁN et al., 2019).

Segundo Pereira e Gasparotto (2001) são necessárias 26 aplicações de fungicidas sistêmicos ou até 52 aplicações de fungicidas protetores para controle eficaz da doença em plantios de bananeiras. Infelizmente, o pequeno produtor, é o mais representativo no país, na maioria das vezes, não possui condições para pagar os custos das aplicações e acaba tendo prejuízos com a doença. Além disso, o uso do fungicida pode ser viável para os grandes produtores que possuem recursos, mas trazendo malefícios à saúde dos seres humanos que consomem a fruta e na qualidade do meio ambiente. Com isso, o desenvolvimento de práticas sustentáveis, facilmente aplicáveis e de baixo custo para controlar a SN, são de suma importância.

Uma alternativa economicamente viável e sustentável, e que vem demonstrando bons resultados quando usados em plantas para o controle de doenças, é o glicerol. Quando aplicado de forma exógena nas plantas, o seu metabolismo leva à produção do composto glicerol-3-fosfato (G3P). Essa molécula conseqüentemente leva à diminuição da produção de ácido oleico (18:1- ácido graxo monossaturado-omega), fazendo com que haja a indução de resistência em plantas contra agentes patogênicos por meio da produção de ácido salicílico (AS) (ZHANG et al, 2015, Gao et al. 2011).

As respostas dos hormônios, ácido salicílico e jasmonato, na maioria das vezes, são antagônicas nas plantas. No caso da degradação do glicerol, a diminuição da produção de ácido oleico (18:1) simultaneamente, aumenta as respostas mediadas pelo (AS), inibindo as respostas de defesa induzida pelo Jasmonato e conseqüentemente aumentando a resistência das plantas contra fungos biotróficos (Gao et al. 2011). Como *M. fijiensis* é um fungo hemibiotrófico (Churchill et al. 2010), com uma fase biotrófica, considera-se que a aplicação do glicerol possa ser bem sucedida para a produção de compostos que atuem no aumento da resistência da bananeira à SN.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a eficiência do glicerol no controle do fungo *M. fijiensis* na cultivar Grande Naine de bananeira, suscetível à SN.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O experimento foi instalado na Unidade da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas (12°40'19' 'S, 39°06'22' 'W ', altitude 220 m acima do nível do mar), Bahia, Brasil. O clima é classificado como tropical quente úmido, Aw a Am, de acordo com a classificação de Köppen, com temperatura média anual de 24,5 °C, umidade relativa de 80% e precipitação média anual de 1250 mm (AGRITEMPO, 2018).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com 90 plantas de bananeira do subgrupo Cavendish, cultivar Grande Naine. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 15 parcelas, 3 repetições, 6 plantas por parcela e 5 tratamentos: controle, água + inoculação, 3, 5 e 8 % de glicerol. A solução de glicerol foi aplicada via spray nas folhas até escorrimento. Essa aplicação foi feita a cada 2 dias com intervalo de 2 dias, durante 6 dias. Foram coletadas folhas antes do tratamento e antes da inoculação (tempo zero), e nos tempos 72 horas após inoculação (HAI) 5, 15, 30 e 60 dias após inoculação (DPI). As amostras para análise molecular foram armazenadas em envelopes de papel alumínio, congelados com nitrogênio líquido em caixa de isopor até serem colocados no ultrafreezer -80 °C. O experimento montado encontra-se na Figura 1: A e B.

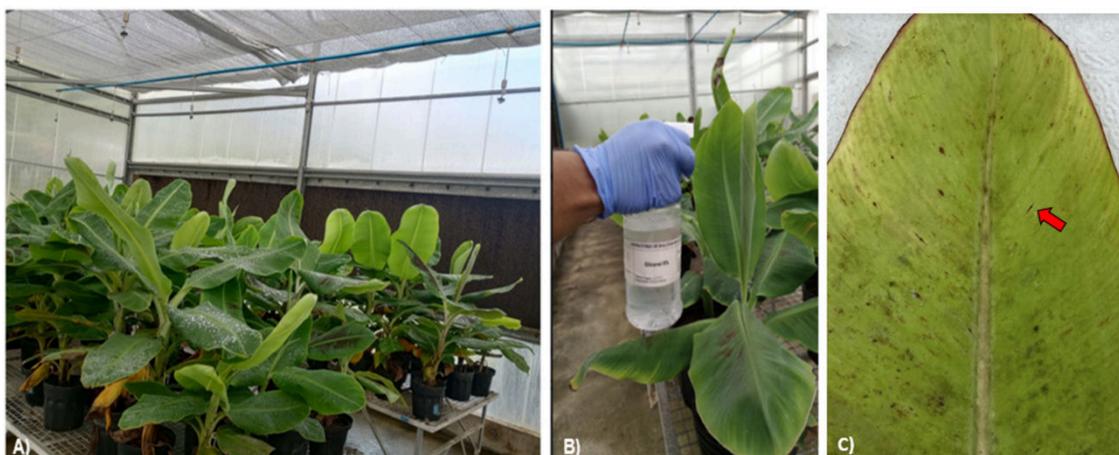


Figura 1: A) Experimento montado em DIC em casa de vegetação; B) Método de aplicação da solução de glicerol via spray até escorrimento das folhas; C)

Folha de bananeira cv Grande Naine – seta vermelha - início de lesão de *M. fijiensis*. Foto: Ana Paula da Silva Novaes, 2023.

Para o estudo de histologia, as amostras foram repicadas em cubos e armazenadas em fixador karnovsky e FAA em microtubo de 2 mL. Após cada coleta, as amostras foram colocadas no equipamento dessecador com vácuo por 10 minutos e posteriormente desidratadas em séries crescentes de etanol 30-100%.

2.2. Preparo do inóculo

O isolado foi preparado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Inicialmente foram realizadas repicagens em meio sólido (BDA), onde permaneceram até serem transferidos para meio v8 por 15 dias. Após crescimento de colônias foi feita raspagem com auxílio de escova de dentes de cerdas macia em todas as placas adicionando-se 10 mL de água destilada e realizada contagem de conídios em câmara de Neubauer para obtenção da suspensão 10^4 do isolado. Após 2 dias do último tratamento, as plantas foram inoculadas na face abaxial das folhas com auxílio de borrifador até o escorrimento.

2.3. Avaliação de sintomas

Foram avaliadas duas plantas de cada parcela, dessas duas plantas, 2 folhas foram avaliadas dando notas de 0-5, baseadas na escala diagramática de Ganry, Mayer (1972), e Stover (1989) (Fig. 2).

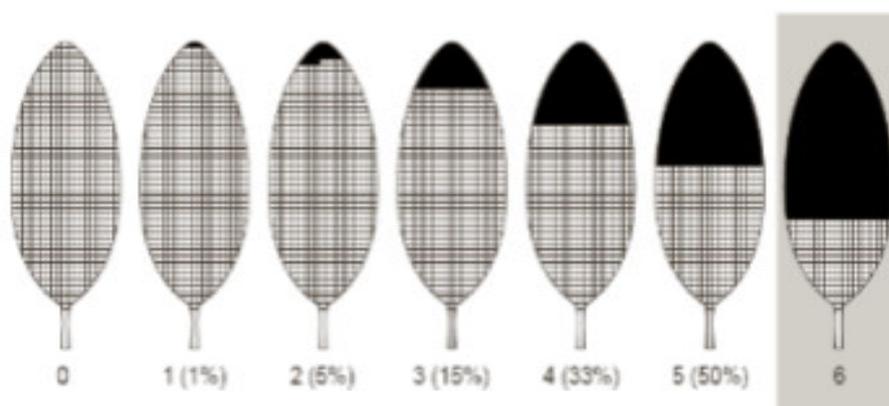


Figura 2. Escala diagramática de Ganry, Mayer (1972), e Stover (1989).

As notas obtidas em intervalos de 07 dias foram transformadas em índice de severidade da doença ID (%), baseado na fórmula disponibilizada por Mckinney (1923), representada abaixo:

$$ID (\%) = \left[\frac{\sum \text{nota da doença} \times \text{número de plantas com uma certa nota da doença}}{\text{número de plantas avaliadas por parcela} \times \text{maior nota adotada na escala}} \right] \times 100$$

Para cada tratamento, estimou-se o ID médio, com base nas avaliações realizadas a cada 07 dias e o número de folhas avaliadas.

Estimou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de acordo com a fórmula proposta por Mandden et al. (2007), onde n é o número de avaliações, ID é o índice de severidade da doença e $(T1-T2)$, o intervalo de tempo entre duas avaliações consecutivas, como pode ser observado na seguinte fórmula:

$$AACPD = \frac{\sum n - 1n[(ID1 + ID2)]}{2} \times (T2 - T1)$$

A AACPD foi padronizada pelo número de avaliações realizadas a cada 07 dias até o final das avaliações.

2.4. Análise dos dados

Com o intuito de classificar os tratamentos como resistentes à Sigatoka negra, utilizou-se o teste de agrupamento de Scott e Knott (1974) a 5% de significância, utilizando-se o pacote “ExpDess” do programa estatístico R (CORE DEVELOPMENT TEAM, 2018). Estimou-se um índice de severidade da doença e a área abaixo da curva de progresso da doença.

Para a análise da quantificação relativa de expressão gênica foi utilizado o Microsoft Excel empregando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ proposto por Livak e Schmittgen, (2001). Os Heatmaps com dendrogramas correspondentes foram baseados em um agrupamento de ligação completo pelo método de distância Euclidiana usando a função heatmap. 2 do pacote “gplots” e “devtools” implementado no R (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2018).

2.5. Histoquímica

Para análise histoquímica, os cortes de 1 cm foram colocados em solução fixadora karnovsky e FAA, submetidos a vácuo por 10 min,

armazenados em solução fixadora por 8 dias, desidratados em série crescente de etanol (30-100%) 1h cada. Posteriormente, foi realizada a infiltração utilizando parte de etanol+historesina. A polimerização foi realizada com o Kit Historesin (hidroxietilmetacrilato; Leica Heldelberg, Alemanha). Os cortes foram realizados em micrótomo rotativo (8mm), colocados em lâminas e corados com corante conforme objetivo.

2.6. Clarificação e coloração de folhas

As amostras fixadas em FAA, foram embebidas em solução de Hidróxido de Potássio (KOH) (10%) por 72h, e depois lavadas com água destilada e colocadas em Ácido Clorídrico (HCL) por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram coradas com 0,05% de azul de tripano em solução (2:1:1, ácido láctico:glicerol:água) por 2h. Imediatamente após o descarte do corante, os fragmentos foliares foram imersos em solução de lactoglicerol (2:1:1, ácido láctico:glicerol:água) e microfotografados em microscópio de luz objetiva com alcance de 40x.

2.7. Análise molecular

2.7.1 Extração de RNA total

Para extração de RNA total foram coletadas folhas de plantas de 'Grande Naine' antes do tratamento com glicerol, tempo 0 (antes da inoculação), 72 horas após inoculação (HAI), 5, 15, 30 e 60 dias após inoculação. Durante a coleta, as amostras foram conservadas em nitrogênio líquido e logo após, armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da extração.

No processo de extração, foi utilizada a metodologia de Ferreira et al. (2019) com modificações, onde foi utilizado nitrogênio líquido na maceração das amostras. Para conferir a integridade e a concentração do RNA após extração, uma alíquota de 5 µl das amostras, mais 2 µl de GelRed® foram observadas via eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x (Tris; ácido acético glacial; água Milli-Q®). O RNA extraído foi armazenado em ultrafreezer -80°C para utilização posterior.

2.7.2 Tratamento com DNase

O RNA total extraído foi tratado com DNase TURBOFREE (Ambion®), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante: em 15µl de RNA total de cada amostra foi adicionado 1 µl de água DNase free, 1 µl do Inibidor (RNase out), 2 µl de Tampão (10x turbo DNase buffer) e 1µl DNase (turbo DNase). A reação foi incubada em termociclador Veriti (Applied Biosystems®) a 37°C por 25 min. Em seguida, acrescentou-se 2 µl de DNase Inactivation, e a amostra incubada por 2 min. em temperatura ambiente. Posteriormente centrifugada por 1,5 minutos a 10000 rpm, e o sobrenadante transferido para novos tubos foram armazenados em ultrafreezer a -80°C. A qualidade do RNA tratado foi conferida em gel de agarose a 1% com TAE 1 x (Tris; ácido acético glacial; água MQ) e utilizou-se 3 µl de cada amostra. Os genes e primers utilizados no estudo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica na interação *Musa spp. X Mycosphaerella fijiensis*. Genes alvos e suas respectivas funções: Signal transduction (STRANS) - transdução de sinais; Kinase, LRR domains, protein-protein interaction (KINLRR) - reconhecimento e sinalização e referências.

ID	Gene	Descrição	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)	Referência
GSMUA_Achr3T09360_001	STRANS	Transdução de sinais	F:CAACCTCCCCCATCAATG G R:TTGCTGCGCGCTGTGT	128	Velame 2017
GSMUA_Achr6T33720_001	KINLRR	Domínios kinase, LRR, interação proteína-proteína	F:CGGTCCGGTGCCATTGG R:CTGGCCGTGTGGGAGATT	110	Velame 2017
25SMU	25S*	25S rRNA*	F: TGTTGCATCCTGGTACTGCT R:GGCTTTCTTGCACTGGTACAC	122	Podevin et al, 2012
L2MU	L2*	Ribonucleoproteína	F: AGGGTTCATAGCCACACCA C R: CCGAACTGAGAAGCCCCTA C		Podevin et al, 2012

2.7.3. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription para obtenção do volume final de 20 µl conforme o protocolo: 5 µl do RNA tratado, mais 1 µl de 20x enzyme mix, 10 µl de 2x RT Buffer e 4 µl de água Nuclease Free. Posteriormente a reação foi incubada no termociclador Veriti (Applied Biosystems®) por 60 minutos a 37 °C + 97 °C por 5 min + hold 4 °C. Os cDNAs foram armazenados a -80 °C. Para verificar a viabilidade do

cDNA foi realizada a PCR convencional com primer beta tubulina (PODEVIN et al, 2012).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação de sintomas

A presença de sintomas e confirmação de presença do fungo *M. fijiensis* nas plantas ocorreram aos 25 DAI. Os sintomas iniciais foram pontuações de cor marrom clara na face abaxial das folhas. Sintomas em forma de estrias começaram a surgir a partir dos 55 DAI em plantas tratadas com água e 8% de glicerol.

No primeiro momento, os tratamentos 3, 5 e 8% apresentaram valores de ID estatisticamente superiores ao tratamento inoculado tratado com (Tabela 2).

Tabela 2- Índice de severidade da doença (ID) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas tratadas com glicerol nas concentrações de 3, 5 e 8%, plantas tratadas com água e controle. Cruz das Almas, 2023.

Tratamento	ID	AACPD
Controle	87.225 a	2740.280 a
Inoc+H2O	3.890 b	77.775 b
Glicerol 3%	110.560 a	3527.780 a
Glicerol 5%	101.670 a	3179.165 a
Glicerol 8%	151.665 a	4130.555 a

Mesma letra na coluna pertence ao mesmo agrupamento, de acordo com o teste de Scott e Knott.

A análise de regressão para avaliação do índice da doença (ID) e da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) indicam que houve uma queda da severidade a 5% de glicerol e maior severidade no tratamento com 8% de glicerol (Fig. 3 A e B).

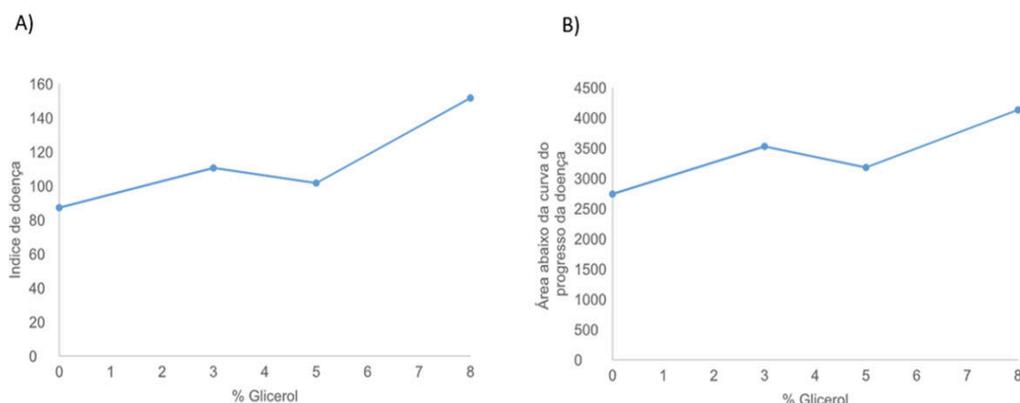


Figura 3. A) Gráficos da regressão do índice da doença (ID) e B) da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) de plantas de bananeira Grande Naine, infectadas com *Sigatoka negra*.

3.2. Análises Histológicas

3.2.1. Clarificação e coloração das folhas

A Figura 4: (A a P) mostra o clareamento e coloração de estruturas fúngicas com azul de tripan em folhas de bananeira Grand Naine antes da inoculação até 5 DAI. Antes da inoculação, tempo zero (Figura 4: A-E), não foram encontradas estruturas fúngicas.

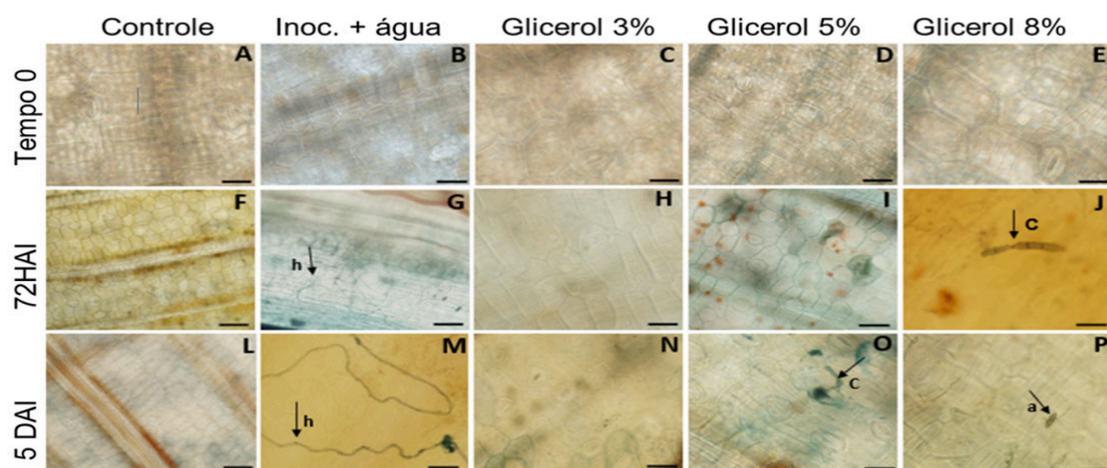


Figura 4 (A a P): Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em folhas de bananeira Grande Naine antes da inoculação até 5 DAI. A, F e L- controle; B, G, M- planta inoculada sem glicerol; C, H e N- plantas inoculadas e tratadas com 3% de glicerol; D, I e O- plantas inoculadas e tratadas com 5% de glicerol; E, J e P- plantas inoculadas e tratadas com 8% de glicerol. DAI= dias após

inoculação, HAI= horas após inoculação, h- hifa, c= conídio, a= ascósporo não germinado, e= estômatos. Barras: 200 μ m. Cruz das almas-BA, 2023.

As amostras coletadas em 72 HAI mostram estruturas fúngicas no tratamento com água (Figura 4 G) com presença de hifa, como também, em plantas inoculadas e tratadas com 8% de glicerol (Figura 4 J), com presença de conídio, esporo da reprodução assexuada. Desta forma, presume-se que nos cinco primeiros dias após inoculação, a planta estava sendo infectada no tecido do parênquima com penetração através dos estômatos (BEVERAGGI et al., 1995).

Aos 5 DAI nos tratamentos controle (Figura 4 L) e glicerol 3% (Figura 4 N), não foram encontradas estruturas fúngicas. No tratamento com água continuou a aparecer hifa (Figura 4 M); conídio colonizando estômato em 5% de glicerol (Figura 4 O) e ascósporo, esporo sexual, não germinado, em 8% de glicerol (Figura 4 P). Os ascósporos produzidos desde os 5 dias são considerados a principal estrutura, podendo ser disseminados para áreas distantes pelo vento. (FAVRETO; MODEL; TONIETTO, 2007).

O clareamento e coloração de estruturas fúngicas em folhas de bananeira Grande Naine com 15, 30 e 60 DAI, estão apresentados na Figura 5 (A a P). Aos 15 DAI houve avanço da doença em plantas tratadas com água (Fig. 5 B), com aparecimento de ascósporo, hifas no entorno dos estômatos no tratamento 5% de glicerol (Figura 5 D) e conidióforos (Figura 5 E). O controle e o tratamento 3% continuaram sem apresentar estruturas.

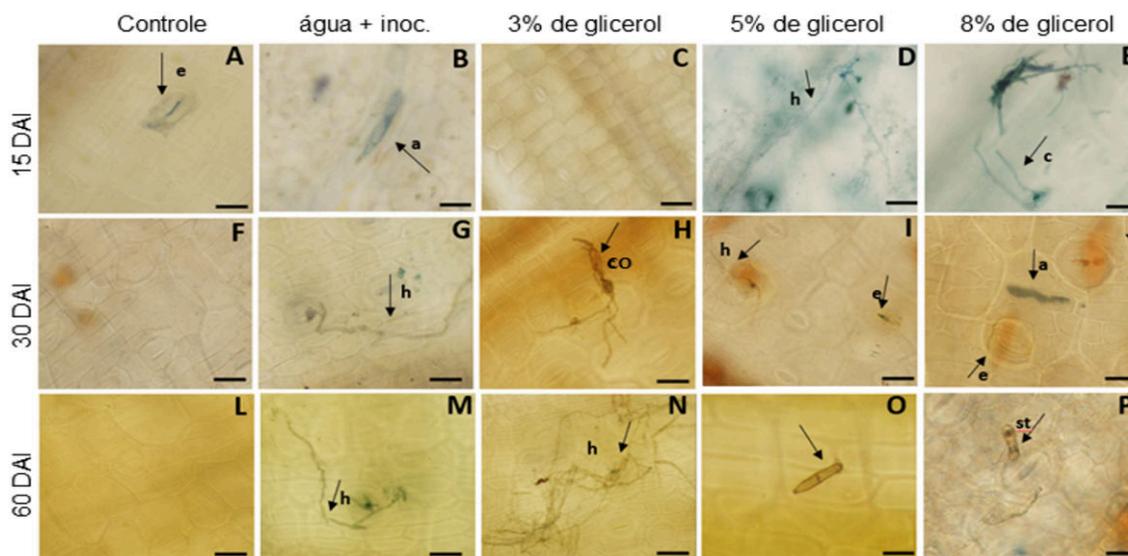


Figura 5. Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em folhas de bananeira Grande Naine com 15, 30 e 60 DAI. A, F e L- controle; B, G, M- planta inoculada sem glicerol; C, H e N- plantas inoculadas e tratadas com 3% de glicerol; D, I e O- plantas inoculadas e tratadas com 5% de glicerol; E, J e P- plantas inoculadas e tratadas com 8% de glicerol. DAI= dias após inoculação, h- Hifa, c= conídio, co= conidióforo a= ascósporos, st= estomatopódio, e= estômatos. Barras: 200 µm.

Aos 30 dias foram encontradas estruturas em todos os tratamentos, exceto controle. Hifas colonizando estômatos nos tratamentos com água e no glicerol 5% (Figura 5 G e I), conidióforos em 3% de glicerol (Fig. 5 H) e ascósporo germinado em glicerol 8% (Fig. 5 J).

Aos 60 DAI foi visualizado hifa colonizando estômato no tratamento com água (Fig. 5 M), micélio em 3% de glicerol (Figura 5 N), ascósporo não germinado em 5% (Figura 3 O) e presença de estomatopódio no tratamento 8% (Figura 5 P). Até o final das avaliações não foram encontradas estruturas fúngicas no tratamento controle.

3.3. Análise de Expressão Gênica

Para verificar a interação das plantas de Grande Naine tratadas com glicerol em interação com a *Sigatoka negra* em análise molecular, dois genes envolvidos na interação planta-patógeno com função de reconhecimento e sinalização (KINLRR, Kinase, LRR domains, protein-protein interaction) e transdução de sinais (STRANS, Signal transduction) (Velame, 2017), foram analisados via RT-qPCR, conforme (Figura 6). A expressão foi normalizada pelos genes de referência de *Musa spp.*, 25S e L2MU (PODEVIN et al, 2012).

De acordo com a Figura 6 (A e B), os genes foram expressos diferentemente entre os tratamentos e tempos avaliados. A maior expressão dos genes no tempo final (60 dias) ocorreu com 5% de glicerol.

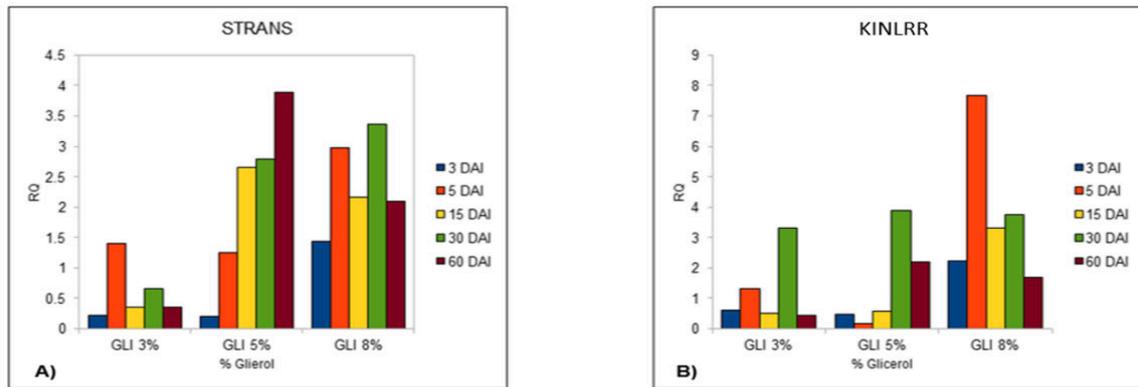


Figura 6. Perfil de expressão relativa dos genes em amostras de Grande Naine tratadas com glicerol e inoculadas com isolado de *M. fijiensis* em relação ao controle não inoculado no tempo 0h. (A) STRANS (Sinal de transdução) e (B) KINLRR (Kinase, LRR domínios, interação proteína-proteína). As quantificações foram normalizadas utilizando os genes de referência 25S e L2MU. DAI: Dias após inoculação.

A expressão global dos dois genes selecionados é mostrada no mapa de calor (Fig. 7). As análises mostram o agrupamento hierárquico da cultivar Grande Naine de acordo com os perfis de expressão dos dois genes analisados. As linhas do dendrograma representam os tempos de coleta, e as colunas representam os tratamentos, demonstrando que as respostas foram diferentes entre os genes em relação aos tratamentos e os tempos avaliados.

Dentre os tratamentos, o 3% de glicerol foi o que obteve menor expressão dos dois genes, enquanto o tratamento com 5% de glicerol, demonstrou maior expressão de ambos os genes alvos, principalmente aos 60 dias. Esse resultado corrobora as análises de ID e AACPD (Figura 3).

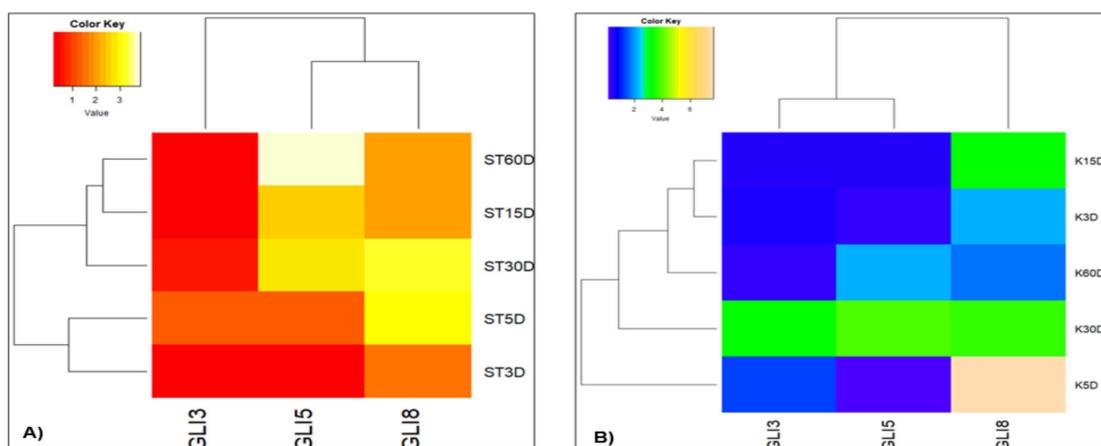


Figura 7. Heatmaps dos perfis de expressão relativa dos STRANS (Signal transduction), KINLRR (Kinase, LRR domínios, interação proteína-proteína em

amostras de Grande Naine, em seis tempos de coletas após o tratamento com glicerol em relação ao controle não inoculado no tempo 0h. As quantificações foram normalizadas utilizando os genes de referência 25S e L2MU.

3.4. Análise Histoquímica

A Figura 8 (A a P) mostra imagens da detecção de calose através de fluorescência após coloração com azul de anilina + lugol do tempo zero até 5 DAI. Foram visualizadas produção deste composto a partir das 72 HAI em plantas inoculadas. Aos 5 DAI foi detectada deposição de calose nos parênquimas paliçádico e lacunoso no tratamento 5% de glicerol.

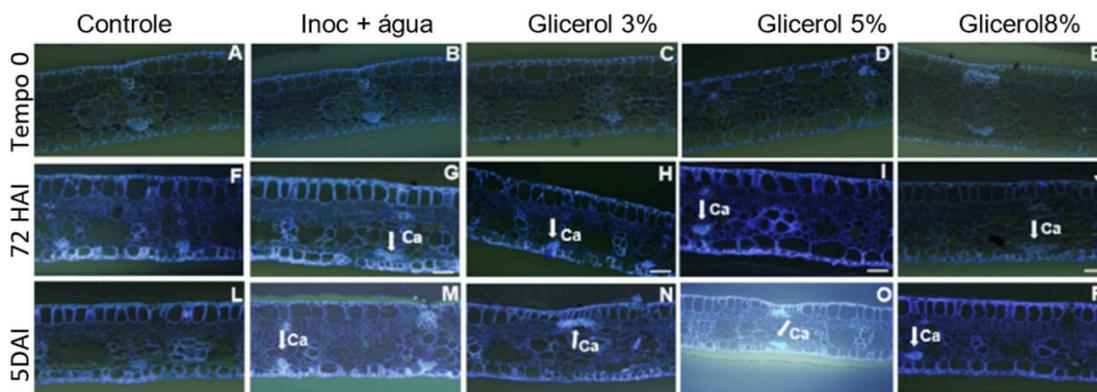


Figura 8- Secções transversais de folhas de bananeira Grand Naine nos tratamentos controle (A, F, L), inoculação + água (B, G, M), glicerol 3% (C, H, N), glicerol 5% (D, I, O), glicerol 8% (E, J, P). As imagens são referentes aos T0, 72 HAI e 5 DAI. Teste histoquímico para detecção de calose. Ca: calose, HAI: horas após inoculação, DAI: dias após inoculação. Barra: 200 mm. Cruz das Almas-BA, 2023.

As secções transversais de folhas de bananeira Grande Naine nos tempos de 15 a 60 dias, estão apresentadas na Figura 9(A a P). Aos 15 DAI, não foi visualizada resposta de defesa em plantas não tratadas com glicerol. Aos 30 e 60 DAI foi detectada resposta de defesa em todos os tratamentos, inclusive no controle. Apesar da avaliação de calose ser qualitativa, é possível identificar maior detecção (partes fluorescentes) nos tratamentos 5 e 8% de glicerol aos 60 DAI.

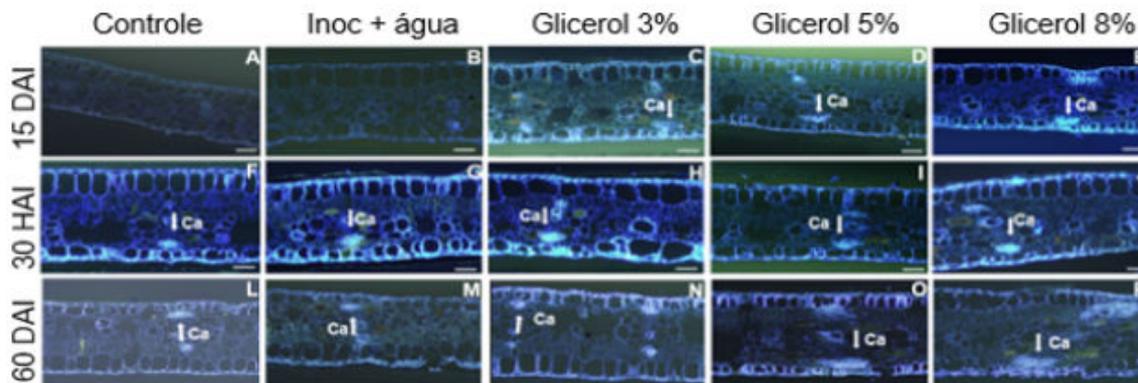


Figura 9. Secções transversais de folhas de bananeira Grande Naine nos tratamentos controle (A, F, L), inoculação + água (B, G, M), glicerol 3% (C, H, N), glicerol 5% (D, I, O), glicerol 8% (E, J, P). As imagens são referentes aos 15, 30 e 60 DAI. Teste histoquímico para detecção de calose; barra: 200 mm. Cruz das Almas-BA, 2023.

4. DISCUSSÃO

4.1. Avaliação dos sintomas e análise histológica

As manchas características de Sigatoka Negra são de cor amarela, que com o passar do tempo e a evolução do patógeno, se tornam marrons, crescem, e coalescem induzindo morte dos tecidos. As manchas na proporção que aumentam, se tornam necróticas prejudicando a fotossíntese da planta (BORAH et al., 2022).

Os ascósporos são produzidos em tecidos necrosados, completando o seu ciclo na fase necrotrófica (FAVRETO; MODEL; TONIETTO, 2007), no entanto, essa afirmação vai contra o observado em nosso estudo. A presença de ascósporos nos tratamentos com água e 8% de glicerol ocorreu em folhas não necrosadas. Poderia ser esperado este tipo de resultado nas plantas tratadas com 8% de glicerol pelo fato do alto nível deste composto, que consequentemente possui maior quantidade de carbono, estivesse atuando mais como fonte de energia para o fungo (CHANDA et al. 2008).

O *M. fijiensis*, como um fungo hemibiotrófico, tem seu ciclo biotrófico que dura de 3-4 semanas sem causar morte à planta (AGRIOS, 2019), o que explica a forma que os sintomas se deram durante as 5 semanas de avaliação, não chegando à fase de necrose. O tratamento com 8% de glicerol apresentou ascósporos e maior severidade de sintomas. Este resultado mais uma vez,

sugere o glicerol possivelmente atuando como fonte de carbono para o fungo, corroborando os resultados obtidos para análise de ID e AACPD.

Zhang et al. (2015) verificaram morte celular em plantas tratadas com doses mais altas de glicerol na cultura do cacauzeiro tratadas com doses acima de 300 mM, onde houve clorose e morte celular visualizada nas pontas das folhas. Em bananeira, cultivar Grande Naine, não foram visualizadas diferenças fenotípicas significativas em plantas tratadas com 3, 5 e 8% de glicerol em relação às plantas não tratadas.

A partir da clarificação, foi possível visualizar diversas fases de desenvolvimento da *Sigatoka* negra, desde hifas a esporos da reprodução sexuada nas formas germinadas e não germinadas. Já foi comprovado cientificamente que quanto maior a densidade de estômatos, local em que o fungo *M. fijiensis* infecta a planta, maior é a infecção. A Grande Naine, genótipo suscetível, possui alta densidade de estômatos, o que facilita a penetração do fungo (SOARES et al., 2022). A planta com respostas de defesa física e química usa mecanismos para tentar se defender do invasor. A parede celular restringe o tubo germinativo dos fungos e a defesa bioquímica é desencadeada por PTI e ETI pela produção de espécies reativas de oxigênio e outros. Os metabolitos secundários também agem como moléculas no desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida (SAR) (KAUR et al., 2022).

As plantas tratadas com 8% de glicerol apresentaram resultados semelhantes às plantas tratadas com água, com algumas estruturas fúngica nas primeiras horas de avaliação. No tratamento com 5% de glicerol, a primeira visualização de conídios foi aos 5 DAI, enquanto neste mesmo período o tratamento com 8% de glicerol apresentou ascósporos não germinados. Inicialmente, o tratamento com 3% de glicerol demonstrou maior nível de resistência, desenvolvendo estruturas a partir dos 15 DAI. Li et al., (2016) identificaram que quanto maior a dose de glicerol (1-4%), maior a resistência desenvolvida pelas plantas de trigo contra o oídio, mas consideraram a melhor dose a 3% pelo fato da 4% de glicerol apresentar morte celular nas pontas das folhas.

Li et al. (2020) verificaram germinação de esporos em ~90% das plantas tratadas com água, sugerindo que o glicerol induziu resistência contra o patógeno fúngico do trigo, o oídio. O que pode ser relacionado ao presente trabalho em que houve visualização de estruturas no tratamento controle desde os primeiros dias, mas também no tratamento com dose mais alta de glicerol, 8%.

Para o trigo, foram avaliados diferentes momentos de aplicação de glicerol, antes e após inoculação, e foi comprovado que o melhor momento para se iniciar o tratamento é 1-2 dias antes da inoculação. As plantas tratadas com glicerol foram altamente resistentes, enquanto as tratadas com água apenas, foram suscetíveis (LI et al., 2016).

4.2. Expressão gênica

A indução de defesa em plantas mediada pelo glicerol está relacionada com o aumento de glicerol-3-fosfato (G3P) e da diminuição do ácido oleico (18:1). O glicerol pode ser utilizado em plantas para indução de resistência contra patógenos, mas chegou a ser considerado tóxico em plantas quando utilizados em altas concentrações (ZHANG et al., 2015).

O estudo de expressão gênica em bananeira infectada pelo isolado de *M. fijiensis* contribui para a identificação do início de defesa da planta, já que visualmente isto não foi possível devida a fase inicial ser biotrófica e não apresentar sintomas inicialmente (RODRÍGUEZ et al, 2016). No estudo aqui realizado, foi possível identificar que o gene de sinalização foi expresso logo no início da infecção.

Em estudo com variedades resistente e suscetível, Rodríguez et al. (2016) conseguiram identificar vários genes de defesa no genótipo resistente, Calcutá 4, e indução diferente no suscetível, Williams. Na Calcutá 4, a indução foi precoce, assim como no presente trabalho, em plantas suscetíveis teve a indução de genes no início da infecção.

Um sinal de transdução desenvolvido pelas plantas após tratamento com glicerol em resposta ao agente patogênico pode ser o ácido salicílico, hormônio importante para resistência sistêmica adquirida (Xá et al., 2001) e ácido oleico Mendel et al. (2012); sua resposta é dependente da dose (ZHANG

et al., 2015). Isso explica a indução dos genes STRANS e KINLRR em plantas de bananeira, quanto maior a dose de glicerol, maior foi a expressão desses genes. A transdução de sinal é ativada quando a planta reconhece a presença do patógeno. Ao reconhecer libera a Ca^{2+} , considerado o principal mediador contra estresse de plantas (DING et al., 2022).

O gene KINLRR é um gene da quinase rico em leucina. Esse gene age como um receptor que detecta anormalidades criadas por fatores bióticos e abióticos em plantas (SENSEVERINO et al., 2010; ANTOLÍN-LOOVERA, BINDER & PARNISKE, 2012). As proteínas ricas em leucina são imunidade desencadeada por efetores (ETI). O ETI é ativado depois que o patógeno consegue superar a primeira linha de defesa do hospedeiro, atuando como uma segunda linha de defesa (NOMAM, AQEEL, LOU, 2019).

A transdução de sinais em plantas envolve várias linhas de defesa vegetal para impedir o desenvolvimento do agente patogênico, onde as respostas são a criação de espécies reativas de oxigênio (ROS), genes relacionados à patogênese, deposição de calose, ácido salicílico e sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), dentre outros (LIU; LAM, 2019). Os hormônios são moléculas que atuam na planta em vários processos fisiológicos, dentre eles a defesa das plantas. Entre os principais destaca-se o ácido jasmônico, o ácido salicílico, etileno, ácido abscísico, auxina, giberelina (SHIGENAGA e ARGUESO, 2016).

O tratamento com 5% de glicerol teve respostas positivas a longo prazo para os dois genes testados. A expressão do gene STRANS nesse tratamento se manteve alta aos 60 DAI, enquanto para o KINLRR, diminuiu em relação aos 30 DAI. Comparando os tratamentos 5 e 8% de glicerol, o tratamento que mais teve expressão dos genes, o de 5 % de glicerol, manteve esse resultado até o final das avaliações.

A forma como o glicerol age em plantas de bananeira ainda precisa de vários estudos para comprovar, mas aumento do G3P e a diminuição do ácido oleico, ocorre por meio da acilação entre os dois nos plasmídeos, a elevação do G3P contribui para a sinalização por meio do ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ) (KACHROO et al., 2004). O etileno também faz parte da

sinalização e cada hormônio ativa uma via de forma individual, juntos ou de forma antagônica, mas cada resposta depende da interação planta x patógeno (CHANDRA-SHEKARA et al., 2007). Relacionado à defesa de plantas contra patógenos, a indução contra microrganismos necrotróficos se dá por meio do AJ, hormônio responsável pela defesa contra patógenos necrotróficos (MATRIC et al., 2016).

O LRR é um gene de reconhecimento de efetores que faz com que as proteínas de virulência se tornem de avirulência, possui uma segunda linha de defesa conhecida como ETI, que anteriormente era chamada de gene-a-gene ou resistência raça-específica (JONES e DANGL, 2006). O LRR induz resistência em plantas atacadas por microrganismos biotróficos ou hemibiotrófico, ou seja, organismos que permitem que a planta permaneça viva por pelo menos um período (GLAZEBOOK, 2005), como o caso do fungo *M. fijiensis*, que é um fungo hemibiotrófico.

O gene KINLRR foi expresso desde a primeira hora de avaliação na interação de *Musa* spp. x *M. fijiensis*, demonstrando que a expressão desse gene foi rápida na detecção de estresse, reconhecendo a presença do patógeno em apenas 1 HAI e induziu resistência na maioria dos tempos avaliados (OLIVEIRA, 2020).

A transdução de sinais atua na planta quando ela é invadida por patógenos. Os sinais cooperam para resistência com ativação de moléculas como ácido salicílico, jasmonato e etileno, que são considerados como precursores da resistência sistêmica adquirida (YANG; SHAH e KLESSIG, 1997; Kachroo et al., 2003). Com a transdução de sinal, os mecanismos de defesa das plantas são ativados e o patógeno tem seu desenvolvimento prejudicado (DANGUE; JONES, 2001). Mandel et al. (2012) destaca que esses sinais estão envolvidos na via do ácido oleico (18:1), como o óxido nítrico. Não só os hormônios fazem parte da via de transdução de sinais, como também as espécies reativas e sinalização pendente de cálcio, e estas podem atuar em interação (TIWARI, 2018).

Na cultura do trigo, o glicerol induziu transdução de sinal de hormônio vegetal por meio de auxina, PP2C e Jasmonate Zim Domain (JAZ). A indução

positiva do JA pelo glicerol pôde contribuir para resistência do trigo ao fungo do Oídeo (Li et al., 2020).

Para o gene alvo KINLRR, a expressão positiva com a dose de 5% de glicerol, foi diminuindo nos momentos finais das avaliações, o que pode ser deduzido que sejam necessárias mais aplicações deste composto durante o período de infecção para que a planta mantenha um nível de resistência sem que ocorram tantas oscilações nas expressões desses genes de resistência.

No presente estudo, o resultado da regressão juntamente com os dados de expressão gênica, demonstraram uma tendência da cultivar Grande Naine de responder de forma mais resistente ao isolado de *M. fijiensis* na concentração de 5% de glicerol. Esse resultado é diferente das respostas com outras plantas em que a dose de 3% foi a que mais expressou resistência a plantas (LI et al., 2016; LI et al., 2020; Gazolla et al., 2019).

4.3 Histoquímica

Este é o primeiro estudo sobre a interação *Musa* spp. x *M. fijiensis* em resposta ao glicerol, como também o primeiro a utilizar histoquímica para visualização de mecanismos de defesa para os tratamentos definidos. A detecção de calose nos primeiros dias após a inoculação indica que a aplicação do glicerol levou a uma tendência em condicionar a planta a um estado de resistência ao ataque do fungo. Soares et al., (2022) não identificaram presença de calose em plantas de bananeiras em genótipos suscetíveis Grande Naine e Akondro Mainty infectadas com Sigatoka Negra, avaliadas até 21 dai.

A calose é um polissacarídeo beta-1,3-glucano que está presente na parede celular de várias plantas auxiliando no desenvolvimento e contribuindo como resposta de defesa contra fatores bióticos e abióticos (CHEN; KIM, 2009). Como um mecanismo estrutural, fornece resistência à parede celular como forma de contenção para impedir a penetração do patógeno, assim impedindo associações entre si (STANGARLIN et al., 2011).

Por ser um trabalho pioneiro, acredita-se que o uso de glicerol para o controle de SN em bananeira da cultivar Grande Naine, parece promissor. No

entanto, mais estudos envolvendo mais aplicações de glicerol antes da inoculação, bem como o uso de um número maior de genes no estudo de expressão gênica, poderão responder as respostas de forma mais robusta. A possibilidade do uso desse composto nos plantios de bananeira da cultivar GN trarão grandes benefícios para a cadeia produtiva da cultura, com grande impacto no ambiente e à saúde humana.

5. CONCLUSÕES

Com base nos estudos apresentados no presente trabalho, o glicerol parece ser um bom indutor de resistência para plantas de bananeira quando utilizado primeiramente, na dose de 5%, mas, mais estudos precisam ser realizados para verificar o melhor momento da aplicação dos tratamentos, inoculação, e doses a serem utilizadas.

6. REFERÊNCIAS

Agrios. Disponível em: <https://agrio.app/library/Sigatoka-negra>. Acesso em: 10/12/2023.

AGRITEMPO. **Agritempo: sistema de monitoramento agrometeorológico**. <http://www.agritempo.gov.br/agroclima/sumario>, acesso em 22/10/2021.

ANTOLÍN-LOOVERA, M.K., BINDER, A., PARNISKE, M.: Receptor kinase signaling pathways in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 50, p. 451-473, 2012.

BEVERAGGI, A.; MOURICHON, X.; Sallé, G. Étude comparée des premières étapes de l'infection chez des bananiers sensibles et résistants infectés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladies des raies noires. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p. 1328-1337. 1995. doi.org/10.1139/b95-144.

BORAH, S.; SAIKIA, B.; BORA, D.; BHORALI, P. Expression analysis of defense response genes upon Sigatoka infection in *Musa paradisiaca* cultivar Kachkal. **Indian Journal of Genetics**, p. 217-223, 2022. Doi: 10.31742/IJGPB.82.2.11.

CHANDA, B.; VENUGOPAL, S.C.; KULSHRESTHA, S. NAVARRE, D. A.; DOWNIE, B.; VAILLANCOURT, L.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Glycerol-3-phosphate levels are associated with basal resistance to the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* V. 147, P. 2017-2029. 2008. DOI: 10.1104/pp.108.121335.

CHANDRA-SHEKARA, A. C.; VENUGOPAL, S. C.; BARMAN, S. R.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Plastidial fatty acid levels regulate resistance gene-dependent defense signaling in *Arabidopsis*. **PNAS**, p. 7277-7282, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0609259104.

CHEN, X. Y.; KIM, J. Y. Callose synthesis in higher plants. **Plant signaling e Behavior**. P. 489-492, 2009. DOI: org/10.4161/psb.4.6.8359.

CHURCHILL, A. C. L. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. **Molecular Plant Pathology**. P. 307-328, 2010. DOI: 1111/j.1364-3703.2010.00672.x.

CORDEIRO, Z. J. M. **Pragas Quarentenárias e melhoramento preventivo**. III Simpósio Internacional de Fruticultura, 2015.

ELBAGOURY, M. M.; TUROOP, P.; RUNO, S.; SILA, D. N.; MADIVOLI. Postharvest treatments of banana (*Musa acuminata* cv.'Grand Nain', AAA) during cold and ripening temperatures with chitosan nanoparticles to alleviate chilling injury and maintain antioxidant activity. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**. V. 63, p. 677-699, 2022.

DANGUE, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**. 826–833 p., 2001.

DING, L. N.; YUE-TAO, L.; YUAN-ZHEN, W.; LI, T.; GENG, R.; CAO, J.; WEI, Z.; TAN, X. L. Plant disease resistance related signaling pathways: recent progress and Future prospects. *Int. J. Mol. Sci.* V.23, 20p. 2022 DOI: 10.3390/ijms232416200

FAVRETO, R.; MODEL, N. S.; TONIETTO, A. Sigatoka negra, fatores de ambiente e sistemas agroflorestais em bananis do Rio Grande do Sul. **Resvista Pag**. 2007.

GARRUTI, D. S.; MATIAS, M. L.; FACUNDO, H. V. V.; SILVA, E. O.; COSTA, J. N.; SILVA, M. A. A. P. Acceptance of banana cultivars resistant to black Sigatoka by the consumer market of northeast Brazilian region. **Ciência rural**, v. 42, 2012. DOI: 10.1590/s0103-84782012000500030.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. **Sigatoka Negra: desafio para a bananicultura brasileira**. VII Simpósio Brasileiro sobre bananicultura, São Paulo, 2010.

GAUHL, F.; PASBERG-GAUHL, C.; VUYLSTEKE, D; ORTIZ, R. Multilocational evaluation of black sigatoka resistance in banana and plantain. Abuja: **International Institute of Tropical Agriculture**, 1993. 59 p. (Research Guide, 47).

GAZOLLA, L. C. O. F.; ALMEIDA, D. P.; CASTRO, I. S. L.; CASTRO, A. G.; ARRUDA, L. V. S.; VIEIRA, N. M.; MANTOVANI, H. C.; ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E. T.; MENDES, T. A. O. Transcriptional regulation of glycerol-3-phosphate metabolism induces resistance to coffee rust. Vitória-ES, 5 p. 2019.

Guzmán, M., Pérez-Vicente, L., Carlier, J., Abadie, C., de Lapeyre de Belaire, L., Carreel, F. Doenças fúngicas da folhagem. Em: D. R. Jones (Ed.) *Funções especiais do Banana*, p. 57–171, 2019.

GLAZEBROOK, J. Mecanismos contrastantes de defesa contra patógenos biotróficos e necrotróficos. **Anu. Rev. Fitopatol.** 43, 205–227, 2005.

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

LI, Y.; QIU, L.; LIU, X.; ZANG, Q.; ZHAUNSON, X.; FAHIMA, T.; KRUGMAN, T.; SUN, Q.; XIE, C. Glycerol-Induced Powdery Mildew Resistance in Wheat by Regulating Plant Fatty Acid Metabolism, Plant Hormones Cross-Talk, and Pathogenesis-Related Genes. *International Journal of Molecular Sciences*. V. 21, 19 P., 2020. DOI: 10.3390/ijms21020673.

LI, Y.; SONG, N.; ZHAO, C.; LI, F.; GENG, M.; WANG, Y.; LIU, W.; XIE, C.; SUN, Q. Application of glycerol for induced Powdery Mildew resistance in *Triticum aestivum* L. *Frontiers in Physiology*. V. 7, 13 P., 2016. DOI: 10.3389/fphys.2016.00413.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

KACHROO, A.; VENUGOPAL, S. C.; LAPCHYK, L.; FALCONE, D.; HILDEBRAND, D.; KACHROO, P. Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in *Arabidopsis*. **PNAS**. V. 101, 2004.

KAUR, S.; SAMOTA, M. K.; CHOUDHARY, M.; PANDEY, A. K.; SHARMA, A.; THAKUR. How do plantas defend themselves against pathogens-biochemical mecanismos and genética interventions. **Physiology and Molecular Biologia of plants**. V.28,485-504 p. 2022. DOI: 10.1007/s1298-022-01146-y.

KUMAKECH, A.; JORGENSEN, H. J. L.; EDEMA, R.; OKORI, P. Efficient screening procedure for black sigatoka disease of banana. **African Crop Science Journal**. v. 23, n. 4, p. 387-397. DOI:10.4314/acsj.v23i4.8

MANDAL, M. K.; CHANDRA-SHEKARA, A. C.; JEONG, R. D.; Yu, K.; ZHU, S.; Chanda, B. ; NAVARRE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Oleic acid dependent modulation of nitric oxide associated1 protein levels regulates nitric oxide mediated defense signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. V. 24, P. 1654–1674. 2012. DOI:10.1105/tpc.112.096768.

Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br>. Acesso em 23 de novembro de 2021.

NOMAN, A.; AQEEL, M.; LOU. PRRs and NB-LRRs: From sinal perception to activation of plant innate immunity. **Internacional Jornal of Molecular Sciences**. 21 p. 2019. DOI: 10.3390/ijms20081882.

OLIVEIRA, W. D. S. **Interação genótipo x microrganismos benéficos e indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense em bananeira**. Dissertação, Recursos Genéticos Vegetais- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 56 f. 2020.

PODEVIN, N.; KRAUSS, A.; HENRY, I.; SWWENNEN, R.; REMY, S. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression. *Studies of the non-model crop Musa*. **Mol Breeding**, v. 30, p. 1237-1252, 2012. DOI: 10.1007/s11032-012-9711-1.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

RODRÍGUEZ, H. A.; RODRIGUEZ-ARANGO, E.; MORALES, J.; KEMA, G.; RANGO, R. E. Defense gene expression. Associated with biotrophic pgase of *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelaet infection in banana. **The American phytopathological Society**, p. 1170-1175, 2016. DOI: 10.1094/PDIS-08-15-0950-RE.

SENSEVERINO, W.; ROMA, G.; SIMONE, M.; FAINO, L.; MELITO, S. STUPKA, E.; FRUSCIANTE, L.; ERCOLANO, M. R. PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. **Nucleic Acids Research**, V. 38, 814–821 p., 2010. DOI:10.1093/nar/gkp978.

SHIGENAGA, A. M.; ARGUESO, C. T. No hormone to rule them all: interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Seminars in cell e developmental biology**. v. 56, p. 174-189, 2016. Doi: 10.1016/j.semcdb.2016.06.005.

SOARES, J. M. S.; ROCHA, A. J.; NASCIMENTO, F. S.; AMORIM, V. B. O.; RAMOS, A.; FERREIRA, C. F.; HADDAD, F.; AMORIM, E. P. Gene expression., histology and histochemistry inthe interaction between *Musa* sp. And *Pesudocercospora fijiensis*. **Plants**. V. 11, 2022. DOI: 10.3390/plants1151953.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V. ; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. 29 p. 2011 DOI: 10.18188/sap.v10i1.5268.

STOVER, R. H. Banana, plantain and abaca disease. London: **Commonwealth Agricultural Bureaux**, 1972. 316 p.

TIWARI, S. Lata C. Estresse, Sinalização e Tolerância ao Metal Pesado Devido a Micróbios Associados a Plantas: Uma Visão Geral. **Frontiers**. 2018; 9:452. DOI: 10.3389/fpls.2018.00452.

VELAME, K. V. C. validação diferencialmente expressos e estimativa da agressividade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense. Tese- em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. 79f. 2017.

XÁ, J.; KACHROO, P.; NANDI, A.; KLESSIG, D. F. Uma mutação recessiva no O gene SSI2 de *Arabidopsis* confere expressão independente de SA e NPR1 de genes PR e resistência contra patógenos bacterianos e oomicetos. **Planta**, J.25, 563–574. 2001.

YANG, Y.; SHAH, J.; KLESIG, D. F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes Development**. 1621-1639 p. 1997. DOI: 10.1101/gad.11.13.1621.

ZHANG, Y.; TH, P. L. S.; IMOVA, S. E. N. M.; INAN, G. L. Application of glycerol as a foliar spray activates the defence response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. **Molecular Plant Pathology**. p. 27-37. 2015. DOI: 10.1111/mpp.12158.