

**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**

**EFEITO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS  
BENÉFICOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO *Fusarium  
oxysporum f. sp. cubense* EM BANANEIRA**

**Wanderley Diaciso dos Santos Oliveira**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2020**

**EFEITO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS  
BENÉFICOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO *Fusarium  
oxysporum f. sp. cubense* EM BANANEIRA**

**Wanderley Diaciso dos Santos Oliveira**

Biólogo

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Baiano  
(IF-baiano), 2018

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

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Janay Almeida dos Santos-Serejo**

**Coorientador: Dr. Fernando Haddad**

**Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Andresa Priscila de Souza Ramos**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE WANDERLEY  
DIACISO DOS SANTOS OLIVEIRA**

---

Dr<sup>a</sup>. Janay Almeida dos Santos-Serejo  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientadora)

---

Dr. Harllen Sandro Alves Silva  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Examinador Interno)

---

Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Examinador Interno)

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em....., conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em .....

À minha família, meu maior incentivo para  
buscar novas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

Ser grato é reconhecer que o outro é importante e necessário no espaço em que ocupa. É neste intento que agradeço a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida me dando força, coragem e motivação para seguir sempre em busca dos meus objetivos.

A todos os meus familiares que direta ou indiretamente me dão suporte sempre que necessário, em especial minha mãe “dona Maria”, razão que tenho para buscar meus sonhos e acreditar que eu sou capaz de lutar e conquistar sempre o melhor de Deus para minha vida.

Aos meus irmãos, Cosme, Cleide, Vera, Toi e Alex pelo apoio, carinho e pelas palavras de motivação que me encorajaram em todos os momentos desse processo. Vocês constituem a minha base.

A minha cunhada Claudia pelo carinho, atenção e suporte em meu processo de adaptação na cidade de Cruz das Almas.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Janay por ter aceitado me orientar e com certeza contribuiu com excelência com sua experiência, conhecimento, humanidade e confiança no meu potencial.

Ao meu co-orientador Dr. Fernando Haddad pelo suporte e contribuição na construção desse trabalho.

A minha co-orientador Dr<sup>a</sup>. Andresa, por se doar intensamente a tudo que chega a suas mãos para fazer e faz com muita excelência. Essa qualidade com certeza refletiu muito neste trabalho. Durante esse processo eu tive o prazer de conhecê-la de perto e seu exemplo de pessoa, profissionalismo e ser humano levarei para vida.

A todos meus amigos em especial Tiago, Neia, Debora, Jamile e Ailda por acreditarem, vibrarem comigo a cada momento e pelo suporte emocional. Amigos são dadas de Deus, amo muito vocês.

Aos amigos que ganhei na pós-graduação em especial Manasses, Wil, Railson, Mara, Luciana e Ilneide pelo suporte, atenção e companherismos.

A Sebastian Zapata pela participação e contribuição tão importante com sua experiência, conhecimentos e presteza no desenvolvimento desse trabalho

Aos meus amigos do LBM em especial Amanda, Anelita, Juliana e Zanon por todos os momentos bons, estar com vocês foi transformar os dias de trabalho em dias leves e agradáveis.

A todos os técnicos e analistas dos laboratórios em especial Andresa, Faby, Leandro, Vanderson e seu Raimundo que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso desse trabalho.

Aos professores do programa de pós graduação em especial Everton Hilo, Manuela e Cristina Nepomuceno, por tanto conhecimento passado nas aulas e contribuição na construção do meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UFRB, pela oportunidade de ingresso ao curso e suporte no que foi necessário.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela disponibilidade do espaço e pela contribuição para realização desse trabalho.

À Capes, pela contribuição financeira na realização desse sonho através da concessão de bolsa.

Deixo aqui minha gratidão e compartilho esse momento com todos que direta e indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui.

## EFEITO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS BENÉFICOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* EM BANANEIRA

### Resumo:

A bananeira (*Musa spp.*) é uma planta nativa do sudeste asiático, classificada entre as primeiras culturas agrícolas a serem exploradas e atualmente considerada como uma das mais importantes para a segurança alimentar. Todavia, a produtividade da cultura é afetada por diversas doenças, dentre elas, a murcha de fusarium, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Foc) está entre as doenças mais destrutivas da banana, podendo causar a perda de até 100% da produção em cultivares muito suscetíveis como a Maçã. A utilização de fungicidas no combate ao Foc, além de não ser eficiente, pode comprometer o equilíbrio natural do solo. Uma forma de manejo estudada é o controle biológico, realizado pela aplicação de microrganismos benéficos que, ao interagir com a planta podem induzir a ativação do seu sistema de defesa, gerando resposta que poderá servir de auxílio no combate ao patógeno. Por isso, estudos que visem entender os padrões de expressão dos genes envolvidos com a indução de resistência ao Foc são importantes, por identificarem respostas iniciais de defesa da planta. Dessa forma esse trabalho foi desenvolvido visando observar a interação benéfica de *Bacillus sp.* e *Trichoderma asperellum* em mudas de bananeira desafiadas ou não com Foc, analisando a influência desses microrganismos na promoção de crescimento e nos níveis de expressão de genes relacionados às respostas de defesas nas cultivares de bananeira BRS Princesa (tolerante) e Prata Anã (susceptível). Os microrganismos benéficos foram eficientes na promoção do crescimento das plantas quando avaliados os parâmetros de altura e diâmetro do pseudocaule. Em BRS Princesa e Maçã foram observadas diferenças significantes na altura das mudas inoculadas com *Bacillus sp.* e *T. asperellum* em todos os tempos de avaliação. Nas plantas de Prata Anã foram observadas diferenças significativas principalmente entre os tratamentos inoculados com os microrganismos benéficos e o tratamento Foc. Com o clareamento das raízes e coloração com azul de tripam observou-se a colonização do Foc nos tecidos radiculares de ambos os genótipos. No genótipo BRS Princesa, foi observado a colonização pelo patógeno com 10 DAI apenas no tratamento Foc. Em Prata Anã foi visto clamidósporo e hifas em todos os tratamentos inoculados com patógeno desde 10 DAI. Através da análise molecular foi observado que *Bacillus spp.* e *T. asperellum* induziram positivamente a expressão dos genes relacionados as respostas de defesa das plantas, com expressão diferencial em relação ao controle sem inoculação e ao tratamento inoculado apenas com Foc. Os tratamentos pre-inoculados com microrganismos benéficos quando desafiados com Foc, apresentaram níveis de expressão mais elevado que os demais tratamentos. Em uma abordagem global analisado pelo Heat Map observou-se em BRS Princesa que após a inoculação dos microrganismos benéficos, os genes CESA 7, KINLRR e AUXPL-1 apresentaram maior nível de expressão positiva. Enquanto em Prata Anã os genes melhor induzidos foram SRCFUN, STRANS e PER 64. Sendo assim esse trabalho traz respostas importantes que podem servir como subsídio para futuros estudos relacionados ao manejo integrado da murcha de fusarium e triagem de microrganismos benéficos como potencial indutor de resistência da bananeira ao Foc.

**Palavras-chave:** *Musa spp.*; Biocontrole; Expressão genica; Murcha de fusarium

## **EFFECT OF THE INTERACTION GENOTYPE X BENEFICIAL MICROORGANISMS ON INDUCING RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense IN BANANA TREE**

### **Abstract:**

The banana tree (*Musa* spp.) is a native plant to Southeast Asia, classified among the first agricultural crops to be explored and currently considered as one of the most important for food security. However, crop productivity is affected by several diseases, including fusarium wilt, caused by the soil fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) is among the most destructive diseases of bananas, and can cause the loss of up to 100% of production in very susceptible cultivars such as Apple. The use of fungicides to combat Foc, besides not being efficient, can compromise the natural balance of the soil. One form of management studied is biological control, performed by the application of beneficial microorganisms that, when interacting with the plant, can induce the activation of its defense system, generating a response that may serve to help fight the pathogen. For this reason, studies that aim to understand the expression patterns of the genes involved in the induction of resistance to Foc are important, for identifying initial plant defense responses. Thus, this work was developed aiming to observe the beneficial interaction of *Bacillus* sp. and *Trichoderma asperellum* in banana seedlings challenged or not with Foc, analyzing the influence of these microorganisms in the promotion of growth and levels of expression of genes related to the defense responses in banana cultivars BRS Princesa (tolerant) and Prata Anã (susceptible). The beneficial microorganisms were efficient in promoting plant growth when the parameters of height and diameter of the pseudostem were evaluated. In BRS Princesa and Maçã significant differences were observed in the height of seedlings inoculated with *Bacillus* sp. and *T. asperellum* at all times of evaluation. In Prata Anã plants significant differences were observed mainly between the treatments inoculated with the beneficial microorganisms and the Foc treatment. With the clearing of the roots and staining with blue of Tripán, colonization of the Foc was observed in the root tissues of both genotypes. In the BRS Princesa genotype, colonization by the pathogen with 10 DAI was observed only in the Foc treatment. In Prata Anã, chlamydospore and hyphae were seen in all treatments inoculated with pathogen since 10 DAI. Through molecular analysis it was observed that *Bacillus* spp. and *T. asperellum* positively induced the expression of genes related to plant defense responses, with differential expression in relation to control without inoculation and treatment inoculated only with Foc. Treatments pre-inoculated with beneficial microorganisms when challenged with Foc, showed higher levels of expression than the other treatments. In a global approach analyzed by the Heat Map, it was observed in BRS Princesa that after the inoculation of the beneficial microorganisms, the genes CESA 7, KINLRR and AUXPL-1 showed a higher level of positive expression. While in Prata Anã the best induced genes were SRCFUN, STRANS and PER 64. Thus, this work brings important answers that can serve as a subsidy for future studies related to the integrated management of fusarium wilt and screening of beneficial microorganisms as a potential inducer of banana resistance to Foc.

**Key words:** *Musa* spp; Biocontrol; Gene expression; Fusarium wilt



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	9
<b>1.1 Centro de origem, classificação botânica e potencial agrônomo da bananeira.</b> .....	9
<b>1.2 Murcha de fusarium em bananeira</b> .....	10
<b>1.3 Indução de resistência de plantas ao ataque de patógenos por meio do biocontrole</b> .....	12
<b>1.4 <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp como agentes de controle biológicos de doenças de plantas.</b> .....	14
<b>1.5 Análise de expressão gênica</b> .....	17
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18
<b>EFEITO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS BENÉFICOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> EM BANANEIRA</b> .....	26
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
<b>2.1 Material vegetal</b> .....	28
<b>2.2 Preparo dos inóculos e infestação do substrato.</b> .....	29
<b>2.3 Delineamento experimental e montagem do experimento em casa de vegetação.</b> .....	29
<b>2.4 Avaliação do crescimento das plantas</b> .....	30
<b>2.5 Análises histológicas</b> .....	30
2.5.1 Clarificação e coloração das raízes .....	30
<b>2.6 Extração de RNA total</b> .....	31
<b>2.7 Avaliação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)</b> .....	31
2.7.1 Seleção dos iniciadores .....	31
2.7.2 Tratamento com DNase .....	31
2.7.3 Síntese de cDNA .....	32
2.7.4 Análise dos iniciadores por RT-PCR .....	33
2.7.5 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) .....	33
<b>3. ANÁLISE DOS DADOS</b> .....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>4.1 Potencial de <i>Bacillus</i> sp. e <i>Trichoderma asperillum</i> na promoção de crescimento de bananeira sem e com a presença de Foc.</b> .....	34
<b>4.2 Histopatologia (clareamento de raiz)</b> .....	37
<b>4.3 Análise de expressão gênica</b> .....	40
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>ANEXOS</b> .....	53

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Centro de origem, classificação botânica e potencial agrônomo da bananeira.

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta nativa do sudeste asiático, classificada entre as primeiras culturas agrícolas a serem exploradas e atualmente considerada como uma das mais importantes para a segurança alimentar. A maior parte das bananas comestíveis são híbridos predominantes entre as espécies selvagens, *Musa acuminata* Colla (AA) e *Musa balbisiana* Colla (BB), que se combinaram em vários níveis de ploidias através de um longo e complexo processo de domesticação, inicialmente, provocado pelo homem através da exploração das florestas tropicais (DE LANGHE et al., 2009).

Em sua classificação botânica, o gênero *Musa* está dentro da classe das monocotiledôneas, ordem Scitaminales e da família Musaceae. O gênero *Musa* foi classificado em quatro seções sendo estas: Eumusa, Rhodochlamys, Australimusa e Callimusa. Na seção Eumusa se encontram as duas espécies fundadoras das bananas comestíveis comuns, sendo elas *Musa balbisiana* Colla e *Musa acuminata* Colla, (SIMMONDS, 1973). As plantas de *M. balbisiana* apresentam um bom desenvolvimento mesmo em baixa altitude, e são capazes de sobreviver em vários ambientes naturais (SIMMONDS, 1962; DE LANGHE et al., 2009). Já *M. acuminata* tem uma ampla variabilidade genética, que a torna uma espécie importante para fins de estudos no melhoramento, por causa da sua estreita afinidade genética com as bananas comerciais (SIMMONDS, 1959). Os híbridos gerados por essas duas espécies geralmente são triploides estéreis, podem facilmente ser propagados vegetativamente e seus frutos são partenocárpicos, onde combinam vigor com várias qualidades como a textura da polpa, tamanho da fruta e sabor (DE LANGHE et al., 2009).

Morfologicamente, a bananeira é considerada como ervas gigantes, podendo atingir até três metros de altura dependendo da variedade. Apresenta o tronco curto e subterrâneo denominado de rizoma, o qual origina raízes subterrâneas e ao pseudocaule, este último é iniciado na união das bainhas foliares, que emergem do solo e terminam com uma copa de folhas longas e largas. Os cachos geram frutos partenocárpicos em forma de bagas alongadas, inicialmente verdes, tornando-os amarelos com a maturação. O surgimento da partenocarpia ou ausência de sementes dos frutos foi uma das principais características de interesse que levaram os agricultores a cultivar a banana (BRASIL, 2008; DANTAS et al., 2016).

A bananicultura é uma atividade agrícola que exerce um importante papel social na fixação do homem no campo, conferindo renda e estabilidade (SILVA & CORDEIRO, 2000; HESLOP-HARRISON, & SCHWARZACHER, 2007). Os frutos produzidos por esta cultura são apreciados mundialmente e constituem a base alimentar de muitos países em desenvolvimento. A Índia está em primeiro lugar no ranking de produção mundial de banana seguido pela China, Filipinas e Brasil (FAO, 2018).

Os dados coletados pelo IBGE (2019) mostram que a banana ocupou em 2019 uma área de aproximadamente 491 mil hectares e produziu cerca de 7,2 milhões de toneladas no Brasil. Entre os principais estados produtores, destacam-se o Estado de

São Paulo, que em 2019 produziu 1,070 milhões de toneladas, em seguida aparece o estado da Bahia, com uma produção de 1,040 milhões de toneladas, e em terceiro lugar está Minas Gerais com a produção de 0,814 milhões de toneladas. No comércio brasileiro os variados tipos de bananas diferem com relação a forma que é consumida e às características do seu cultivo, as cultivares mais importantes são Grande Naine, Nanica, Nanicão, Prata, Maçã e Ouro. Outras variedades também encontradas são Prata-Anã, Pacovan, Mysore, D'Angola e Terra (BRASIL, 2008; Silva et al., 2016)

Dentre as limitações que impossibilitam um melhor desempenho da bananicultura, destacam-se a ocorrência de pragas e doenças provocadas por fungos, nematoides e outros agentes fitopatogênicos (CORDEIRO & MATOS, 2000). No cenário atual as doenças que mais afetam a produção de banana são as Sigatokas negra e amarela, causadas pelos fungos *Micosphaerella fijiensis* e a *Mycosphaerella musicola*, respectivamente, e também a murcha de fusarium que é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) (CORDEIRO, MATOS & HADDAD, 2016).

As doenças fúngicas, estão dentre as mais importantes que atacam a cultura da banana, constituindo os principais problemas fitopatológicos da bananeira, geralmente afetando em todos os seus ciclos vegetativos e reprodutivos e em diversos órgãos como raiz, pseudocaulo, folha e frutos, o que conseqüentemente implica na redução da produtividade e perdas nos bananais (CORDEIRO & MATOS, 2000). A murcha de fusarium, fusariose ou mais popularmente conhecida como mal-do-panamá está entre as doenças mais destrutivas da bananeira (FRASER-SMITH et al., 2013) podendo causar a perda de até 100% da produção em cultivares muito suscetíveis como, por exemplo, a Maçã (CORDEIRO, MATOS & MEISSNER FILHO, 2004; PLOETZ, 1994, 2006).

## 1.2 Murcha de fusarium em bananeira

Murcho de fusarium da bananeira é uma doença causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Sn e Hansen (Foc) que afeta todas as regiões produtoras de banana do mundo (CORDEIRO & MATOS, 2000; ARAUJO et al., 2017). Um dos maiores desafios no enfrentamento dessa doença está na alta capacidade de sobrevivência que o Foc apresenta mesmo na ausência do hospedeiro através da formação de clamidósporos, que são estruturas de resistência capazes de permanecer viáveis no solo por aproximadamente 30 anos (STOVER, 1962; BUDDENHAGEN, 2009).

A murcho de fusarium foi descrita pela primeira vez na Austrália por Bancroft (1876) e atualmente é uma das doenças fúngicas mais citadas pelo seu potencial de destrutibilidade em diversas culturas de importância agrônômica (PÉREZ-VICENTE, 2004). Os primeiros danos relevantes na bananicultura ocasionados pela murcho de fusarium foram relatados no Panamá, em 1904, sendo esta a provável razão do nome "mal-do-Panamá" (CORDEIRO & MATOS, 2003). No início do século XX, o número de relatos de ocorrência da murcho de fusarium aumentaram rapidamente, principalmente em plantações comerciais, disseminando-se por todos os países da América Central e do Sul (STOVER, 1993; WARDLAW, 1972), onde atualmente a doença ainda causa sérios danos, principalmente na variedade Gros Michel (PÉREZ-VICENTE & DITA, 2014). No Brasil, a murcho de fusarium foi observada pela primeira vez em 1930, em Piracicaba-SP, e após cerca de quatro anos da sua entrada no país, foi capaz de dizimar em torno de um milhão de plantas da cultivar Maçã, causando

sérios danos econômicos, principalmente para grandes produtores desta cultivar (CORDEIRO, MATOS & KIMATI, 2005; DIAS, ABREU & RESENDE, 2014).

A infecção pelo patógeno é iniciada pela reação de compatibilidade do mesmo com as raízes da planta, que ocorre primeiramente por meio da resposta do fungo ao reconhecimento dos exsudados radiculares liberados pela planta (LI et al., 2013). Após a germinação do conídio, as hifas colonizam a superfície da raiz, aderem e crescem nas junções entre as células da epiderme e os micélios avançam intracelularmente através do córtex e alcançam os vasos do xilema onde o fungo permanece produzindo microconídios e toxinas que se movem a montante na seiva da planta, colonizando os vasos adjacentes e produzindo novos esporos (GUO et al., 2015; DITA et al., 2018). O Foc produz três tipos de esporos assexuais, sendo estes, macroconídios, microconídios e clamidósporos que permitem sua dispersão e sobrevivência (GUO et al., 2014).

Os sintomas típicos da murcha são os resultados de estresse hídrico devido a oclusão das placas perfuradas dos vasos do xilema, bem como pela combinação de atividade patogênica como acúmulo de micélio, produção de toxinas e resposta de defesa do hospedeiro, incluído produção de tilose, gomas e encolhimento dos vasos devido ao crescimento de células companheiras parenquimática (PÉREZ-VICENTE & DITA, 2014). As plantas de banana infectadas exibem externamente um amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, começando pelos bordos dos limbos foliares e evoluindo no sentido da nervura principal. Posteriormente as folhas murcham, secam e quebram juntas ao pseudocaule. Internamente o sintoma mais recorrente é o aparecimento de uma descoloração pardo-avermelhada provocada pela presença do patógeno nos vasos (CORDEIRO, MATOS & HADDAD, 2016).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. cubense (Foc) pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Hypocreales e a família Nectriaceae (STOVER, 1962). O gênero *Fusarium* apresenta um elevado número de espécies de fungos associado a plantas, com potencial para causar danos econômicos e reduzir a qualidade da cultura agrícola (LI et al., 2013). *Fusarium oxysporum* é um complexo de fungos anamórficos, filamentosos e morfologicamente semelhantes, que caracterizam saprófitos, endófitos e patógenos de plantas e animais (O'DONNELL et al., 1998; PLOETZ, 2006). As linhagens que causam doenças em plantas são divididas em forma *specialis* (f. sp.) de acordo com as espécies de planta hospedeira, e em raças de acordo com a especificidade das cultivares. A f. sp. designada como cubense é aplicada como base apenas em evidências de teste de patogenicidade em bananeira (FOURIE et al., 2011; PÉREZ-VICENTE & DITA, 2014; CZISLOWSKI et al., 2018).

A maioria das f.sp. de *F. oxysporum* são compostos por duas ou mais raças que são definidas por seu impacto em cultivares distintas. Foram descritas as raças 1, 2 e 4 de Foc. A raça 1 causa doenças em Gros Michel e cultivares com genoma AAB incluindo a Maçã, a raça 2 afeta a Bluggoe e bananeiras relacionadas ao genoma ABB. A raça 4 é patogênica para as bananas Cavendish e todas as cultivares suscetíveis a raça 1 e 2. Os isolados da raça 4 são subdivididos em tropical (TR4) e subtropical (STR4) (FRASER-SMITH et al., 2013). A TR4 é encontrada em Taiwan, Austrália, Indonésia e Colômbia na América Latina, é definida como isolados que causam doenças em Cavendish tanto em condições tropicais quanto subtropicais. Já STR4 causa grandes perdas na produção em regiões subtropicais da Austrália, África do Sul e Ilhas Canárias, sendo definido como aquele isolado que na ausência de fatores predisponente, são incapazes de infectar Cavendish nos trópicos. Com a

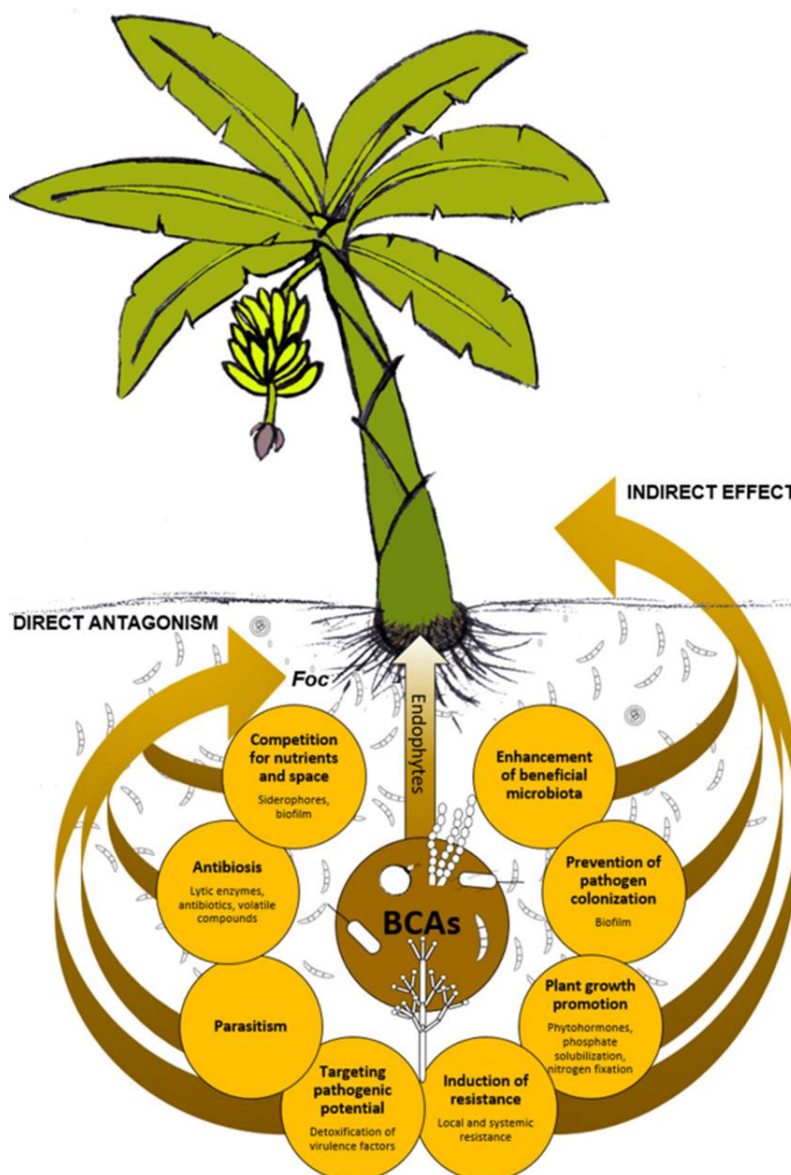
chegada da raça TR4 na América Latina a produção de bananas pode ser severamente afetada, pois não há cultivares que substituam as bananeiras do subgrupo Cavendish (PLOETZ, 2006; BUDDENHAGEN, 2009; GALVIS, 2019).

Sendo uma doença causada por um fungo de solo, a murcha de fusarium se torna difícil de controlar (SUM et al., 2014) e para minimizar os danos causados pela mesma, principalmente em cultivares suscetíveis, várias estratégias como uso de fungicidas, fumigação do solo, alagamento e rotação de culturas já foram desenvolvidas e testadas, no entanto, sem obter pleno sucesso no controle do fitopatógeno. O insucesso das estratégias pode ser devido a capacidade que *Foc* apresenta de sobreviver mesmo na ausência de seu hospedeiro. Desse modo o uso de microrganismos antagonistas que protegem e promovem o crescimento vegetal, colonizando e aprimorando a rizosfera das plantas tem sido uma abordagem alternativa e com potencial para o manejo da murcha de fusarium no cultivo da banana (PUSHPAVATHI et al., 2016).

### **1.3 Indução de resistência de plantas ao ataque de patógenos por meio do biocontrole**

A resistência genética do hospedeiro é a forma mais eficaz e desejável de combater o *Foc*. Essa estratégia foi bem sucedida nos anos 1950 quando as cultivares Cavendish substituíram a Gros Michel após a quase destruição da cultura pelo mesmo (DITA et al., 2011; BUBIC et al., 2019). O desenvolvimento de cultivares resistentes é um caminho promissor na luta contra o *Foc*, porém é uma técnica que prossegue lentamente devido a fatores limitantes, como as barreiras fisiológicas e reprodutivas característicos da própria cultura (BROWN et al., 2017). A urgência em combater a murcha de fusarium tem conduzido a busca por diferentes alternativas de controle aos já existentes, como métodos culturais, químicos e utilização de agentes biocontroladores. Essa última, vem chamando a atenção da comunidade científica por ser uma técnica de baixo custo e fácil manejo, onde, dentre outros mecanismos de ação, os microrganismos benéficos são capazes de induzir a resistência da planta a um amplo espectro de agentes fitopatogênicos, sem qualquer alteração em seu genoma (ENT, WEES & PIETERSE, 2009; CARVALHO, 2012; GANG et al., 2013).

O controle biológico pode ser entendido como o uso de organismos vivos para reduzir a densidade populacional ou o impacto de um organismo específico, tornando-o menos abundante ou menos nocivo do que antes (EILENBERG, HAJEK & LOMER et al., 2001). Os microrganismos benéficos podem atuar de forma direta ou indireta contra o *Foc*. O antagonismo direto pode ser causado por antibiose, parasitismo e competição por espaço e nutrientes. Como mecanismos indiretos eles atuam na promoção de crescimento, aprimoramento na microbiota do solo e na indução de resistência local e sistêmica da planta, qual ajuda na redução da infecção ou doença, ambos os mecanismos de ação podem ser observados na figura 1 (BUBIC et al., 2019).



**Figura 1.** Representação dos mecanismos de ação de agentes de controle biológico de doenças de plantas (BCAs). No antagonismo direto os BCAs atuam na competição por espaço e nutriente, antibiose, parasitismo e desintoxicação de fatores de virulência. Como efeito indireto a ação dos BCAs resulta no aprimoramento da microbiota do solo, prevenção da colonização de patógeno através da formação de biofilme, promoção de crescimento e indução de resistência da planta (BUBIC et al., 2019).

Estudos têm mostrado um elevado potencial dos microrganismos benéficos na indução de resistência de planta a patógeno, a qual pode ser expressa através de mecanismos estruturais e bioquímicos. Mecanismos estruturais incluem o reforço da parede celular das plantas pela deposição de moléculas pré-formadas de ligninas e compostos fenólicos. As alterações bioquímicas incluem o acúmulo de metabólitos secundários como fitoalexina e produção de proteínas relacionadas a patogênese (THANGAVELU & GOPI, 2015). Além disso, a indução de resistência é um estado fisiológico que envolve mecanismos de resistência latentes nas plantas, aumentando a capacidade de defesa em respostas a tratamentos prévios ativados por estímulos específicos aos quais a defesa inata vegetal é potencializada contra desafios bióticos ou abióticos (CARVALHO, 2012; PASCHOLATI, SOUZA & CARDOSO FILHO, 2019).

Existem duas formas de resistência de plantas à doenças: a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI), que embora culminando em resultados fenotipicamente semelhantes, são fenômenos distintos, diferenciados tanto pela natureza do eliciador, quanto pelas vias de sinalização envolvidas (BARROS et al., 2010). A RSA é mediada pelo ácido salicílico e, geralmente, está relacionada a exposição a patógenos biotróficos virulentos, avirulentos ou microrganismos não patogênicos. A ativação dessa via culmina no acúmulo de proteínas relacionadas a patogênese (proteínas-PR), como quitinase e glucanase (DURRANT & DONG, 2004). A RSI, por outro lado, é mediada pelos hormônios ácidos jasmônico e etileno, sendo associados a rizobactérias ou microrganismos benéficos da rizosfera (CHOUDHARY, PRAKASH & JOHRI, 2007).

Nesse contexto, as plantas são capazes de apresentar respostas imunológicas altamente específicas e manter uma memória duradoura frente ao ataque do patógeno. A primeira linha de defesa ativa é conhecida como resposta imune inata, que entra em funcionamento quando moléculas dos atacantes, conhecidas como padrões moleculares associados a microrganismos (microbe associated molecular patterns - MAMP), são detectadas por receptores denominados receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptors - PRR) que são localizados na membrana celular de cada célula vegetal (ENT, WEES & PIETERSE, 2009).

Quando se estimula um PRR, é gerada uma cascata de transdução de sinais que dá lugar a uma resposta imune conhecida como imunidade disparada por MAMPs. Como resultado, é induzida a fortificação das paredes celulares da planta com a deposição de calose e lignina. A produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana como fitoalexinas, acumulação de proteínas de defesa - conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) - e a acumulação de fitohormônios (como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno), são consideradas protagonistas principais da resposta imune cujo sinal se transmite sistemicamente pela planta (MONTE, BETTIOL & HERMOSA, 2019).

Dentre os microrganismos benéficos com potencial para o controle biológico de doenças de plantas, as bactérias do gênero *Bacillus* e fungo do gênero *Trichoderma* estão entre os mais utilizados (HAMAN et al., 2004; HADIWIYONO & SALIM, 2012; MULAW et al., 2013; KHAN, MAYMON & HIRSCH, 2017; JOGALIAH et al., 2018;). Esses microrganismos podem colonizar plantas de diversas espécies botânicas inclusive cultivares agronômicas, beneficiando o desenvolvimento e produção dessas culturas através da supressão do solo no controle de fitopatógenos, promoção de crescimento da planta e na indução de resistência do vegetal a estresse bióticos e abióticos (BOER et al., 2015; BAHOUN et al., 2017; PASCHOLATI, SOUZA & CARDOSO FILHO, 2019).

#### **1.4 *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp como agentes de controle biológicos de doenças de plantas.**

##### ***Trichoderma* spp.**

O gênero *Trichoderma* pertence a classe Sordariomycetes, do filo Ascomycota (ABREU & PFENNING, 2019). São fungos de vida livre, simbiotes oportunistas de plantas, componentes ativos do solo. Os fungos pertencentes a esse gênero podem ser encontrados tanto em locais com baixa temperatura quanto em regiões de clima

tropical, e essa versatilidade em ocupar diferentes habitats está relacionada à plasticidade genética, a qual permite a sua sobrevivência em diversas localidades e condições ambientais distintas (HAMAN et al., 2004; VINALE et al., 2008; RAMADA, LOPES & ULHOA, 2019).

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam uma grande importância para a agricultura, ocupando a função de agentes biocontroladores de doenças de plantas, os quais na maior parte das vezes são atuantes como antagonistas diretos ou indiretos de outros microrganismos, incluindo os patogênicos. Os mecanismos de ação utilizados por este gênero são mediante controle do crescimento dos fitopatógenos por meio da competição por espaço e nutrientes, síntese de enzimas hidrolíticas como as glucanases e quitinases, que são capazes de hidrolisar a parede celular de outros fungos, ação denominada como micoparasitismo (ATANASOVA et al., 2013), produção de metabólitos secundários que podem combater outros microrganismos através da antibiose (ZEILINGER et al., 2016), promoção de crescimento da planta e indução de resistência do vegetal (TARIBUKA et al., 2017).

A interação simbiótica do *Trichoderma* com as plantas é iniciada a partir da colonização da epiderme e das camadas corticais externas das raízes, nesse momento um número relativamente grande de comunicantes químicos liberados pelo fungo é reconhecido pela planta. Os fungos podem liberar três classes de compostos capazes de induzir a resistência nos vegetais, são eles proteínas com funções enzimáticas, oligossacarídeos e outros compostos de baixo peso molecular (HARMAN et al., 2004; HARMAN, 2011). Estabelecida a interação benéfica com as plantas, a sinalização provocada pelo fungo induz as respostas de defesa com efeitos sistêmicos por todos os órgãos vegetais, esses efeitos são capazes de limitar o crescimento do *Trichoderma* em camadas mais internas dos tecidos, ativar a expressão dos genes envolvidos nas respostas de defesa das plantas, melhorar a absorção de nutrientes pelas raízes e promover o crescimento de toda a planta (VINALE et al., 2008; HARMAN, 2011).

A primeira evidência da indução de resistência sistêmica mediada por *Trichoderma* foi relatada por Calderon et al. (1993) em estudo com culturas de células de videira tratadas com um eliciador de *Trichoderma viride*. Esse estudo mostrou uma resposta do tipo hipersensível caracterizado por morte celular localizada. Posteriormente, Bigirimana et al. (1997) evidenciaram que o tratamento do solo com *Trichoderma harzianum* induziu resistência sistêmica a doenças causadas por patógenos fúngicos em plantas de feijão. O *Trichoderma* em sua forma de simbiote oportunista, utiliza exsudatos das raízes, supera as respostas iniciais de defesa das plantas e mantém uma comunicação química capaz de induzir a expressão dos genes que determinam as respostas de resistência sistêmica qual a planta é capaz de recordar e expressar esses genes mais rapidamente na presença de estresse biótico e abiótico (MONTE, BETTIOL & HERMOSA, 2019).

Para combater o ataque de microrganismos invasores, as plantas se defendem gerando respostas moleculares, dentre elas a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzindo um estresse oxidativo que dificulta o acesso dos invasores aos tecidos do hospedeiro, incluindo os microrganismos benéficos (SILAVA et al., 2008). Uma das características que permite a permanência de *Trichoderma* spp. na rizosfera é a sua capacidade tolerar o estresse oxidativo. Algumas cepas de *Trichoderma* spp. podem tolerar maiores níveis de ROS quando comparados a outras cepas ou fungos de outros gêneros (MORAN-DIEZ et al., 2010). Em sua relação com as plantas, o *Trichoderma* aprimora os mecanismos antioxidantes das plantas e induz



nas raízes e na parte aérea uma diminuição no nível de ROS quando são prejudiciais para planta, fato que leva a uma melhor tolerância ao déficit hídrico e outros estresses abióticos. (HARMAN, 2011; MONTE, BETTIOL & HERMOSA, 2019).

### ***Bacillus* spp.**

O sistema radicular das plantas libera constantemente uma variedade de compostos orgânicos que se difundem nos poucos milímetros da camada circundante do solo, criando assim um nicho favorável ao desenvolvimento de populações microbianas que se beneficiam da rizosfera e promovem ações benéficas para a planta (CAWOY et al., 2014). Dentre a microbiota benéfica do solo, as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são as mais estudadas devido ao seu potencial de supressão de doenças e promoção de crescimento das plantas, tornando-as desejáveis para uma agricultura saudável e sustentável (GOMES et al., 2003).

O gênero *Bacillus* pertence à família *Bacillaceae*, representa um grande grupo de bactérias gram-positivas, em forma de bastão, geralmente positivas para a produção de catalase, com metabolismo aeróbico ou facultativamente anaeróbico e produzem estruturas de resistência (endósporos) que apresentam morfologia oval ou cilíndrica, o que lhes permite sobreviver no ambiente sob condições desfavoráveis por um longo período de tempo (LAYTON et al., 2011; FIRA et al., 2018).

*Bacillus* spp. estão entre as rizobactérias de interesse agrônomo mais investigadas. Os diversos estudos dessas espécies se justificam pelo potencial de promover o crescimento de plantas e no antagonismo direto e indireto à fitopatogênese. As mesmas colonizam e estabelecem uma interação robusta com as raízes aumentando a captação de nutrientes através da produção de sideróforos e ácidos orgânicos envolvidos na solubilização e disponibilização de minerais como o fósforo (KHAN, MAYMON & HIRSCH, 2017). Como agentes de biocontrole, atuam por meio de diversos mecanismos de ações contra doenças, incluindo a competição direta com patógenos pelo nicho ou substrato ecológico, produção de metabólitos que podem atuar como antibióticos e como elicitores capazes de induzir as atividades do sistema de defesa do vegetal (CAWOY et al., 2014.; ALOO, MAKUMBA & MBEGA, 2018).

Estudos experimentais mostram que as espécies de *Bacillus* podem induzir a planta a um amplo espectro de resistência a diferentes fitopatógenos bacterianos e fúngicos mediante ativação de um mecanismo denominado Resistência Sistêmica Induzida (RSI). O processo de RSI é iniciado com a otimização do potencial defensivo da planta e ativação de seu mecanismo imunológico, para isso uma variedade de elicitores são emitidos pelas bactérias e percebidas pelas células vegetais, conferindo-lhes a capacidade de resistir a um patógeno ao qual foi inicialmente suscetível (CHOWDHURY et al., 2015). Embora a RSI mediada por rizobactérias não seja normalmente específica para patógenos e não possa conferir proteção total às plantas, o fato é altamente desejável, pois é duradouro e confere um amplo espectro de proteção às plantas (ALOO, MAKUMBA & MBEGA, 2018).

Membros do gênero *Bacillus* são conhecidos como produtores de uma vasta gama de moléculas biologicamente ativas de diferentes estruturas, possuindo entre 5 a 8% do genoma total dedicado a biossíntese de metabólitos secundários (FIRA et al., 2018). Os principais metabólitos identificados nesse gênero como elicitores potencialmente indutores das respostas de defesa das plantas são os compostos voláteis, principalmente o 2,3-butanodiol e 3-hidroxi-2-butanona (acetoina) (TAHIR et

al., 2017) e lipopeptídeos representados por três famílias principais, por exemplo, iturina, surfactina, e fengicina, sendo estes compostos responsáveis por funções cruciais no potencial de biocontrole (CAWOY et al., 2014; GOND et al., 2014).

O papel dos voláteis microbianos na indução de RSI foi investigado por Ryu et al. (2004) em um experimento onde mudas de *Arabidopsis* foram expostas a compostos voláteis produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, onde foi observado que a gravidade da doença causada pelo patógeno bacteriano *Erwinia carotovora* sp. foi significantemente menor em comparação ao tratamento controle. Com relação aos lipopeptídeos, as iturinas e fengicinas exibem atividades antifúngicas (ORGENA & JACQUES, 2007), enquanto as surfactinas geralmente contribuem com a capacidade de formação de biofilme e apresentam um grande potencial como indutor de resistência das plantas. A redução de doenças induzidas pela surfactina foi associada a fatores relacionados a alterações de defesas metabólicas que ocorrem muito cedo após a percepção da célula vegetal, como fluxo de íons através da membrana plasmática e explosão oxidativa gerando espécies reativas de oxigênio, ou expressas posteriormente como mecanismos de defesa que limita ou inibe a penetração de patógenos nos tecidos vegetais do hospedeiro (CAWOY et al., 2014.).

### 1.5 Análise de expressão gênica

A evolução de diferentes linhagens de raças virulentas de Foc levou os pesquisadores a uma busca incessante por cultivares resistentes e por formas alternativas de controle integrado do patógeno, as quais tem se destacado atualmente o uso de agentes biocontroladores que são capazes de induzir a resistência das plantas ao ataque de diferentes patógenos. Para entender a interação das plantas com os microrganismos, muitos estudos estão focados na abordagem molecular para identificar e analisar quais genes e seu papel nos mecanismos de resposta de defesa contra fitopatógenos (SWARUPA, RAVISHANKAR & REKHA, 2014).

Os crescentes estudos do transcriptoma e de expressão gênica, em diversas espécies sob condições experimentais específicas, vem propiciando o acúmulo de informações que permitem o melhor entendimento de processos celulares e fisiológicos (MORGANTE & BLAWID, 2016). Dessa forma, quantificar os níveis de expressão gênica tornou-se um marco na maioria dos laboratórios de biologia molecular, o que faz da análise de expressão gênica uma importante ferramenta para quantificar a expressão de genes regulados nas interações da planta frente a estresses bióticos e abióticos (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

Ao medir a quantidade de RNA celular, é possível determinar em que medida um determinado gene está sendo expresso. A reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR) é uma ferramenta poderosa para quantificar a expressão do gene (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008). A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma técnica de biologia molecular que permite amplificação e quantificação simultânea de uma molécula de DNA direcionada (PABINGER et al., 2014), é definitiva para quantificar diferenças nos níveis de expressão gênica entre as amostras e fornece a base para aplicações em pesquisas de diversas áreas da ciência como a pesquisa agrícola, ambiental, industrial e médica (BUSTIN *et al.*, 2009; TAYLOR et al., 2010).

A técnica de qPCR é caracterizada por 3 principais fases: a fase exponencial, a fase linear e a fase platô. A dinâmica dessas fases consiste basicamente numa

sucessão de ciclos de amplificação, no qual o ácido nucleico molde (template) é desnaturado, anelado com oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos e estendido para gerar uma cadeia complementar utilizando uma DNA polimerase termoestável. Isso resulta em um aumento exponencial de amplicons (produtos de amplificação) que podem ser monitorados em cada ciclo (em tempo real), utilizando um repórter fluorescente como TaqMan ou SYBR Green. O aumento na fluorescência relacionado ao número do ciclo é plotado em um gráfico, para gerar a curva de amplificação. O ciclo de PCR no qual o sinal fluorescente do corante repórter atravessa um limiar é denominado de ciclo de quantificação (Cq) (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

O Cq é o valor observado na maioria dos experimentos de qPCR e é a primeira medida de interesse estatístico (YUAN *et al.*, 2006). O Cq sumariza os resultados e quanto maior o número de templates no início da reação, menor é o número de ciclos é necessário para alcançar o ponto, em que o sinal da fluorescência é primeiramente reconhecido como estatisticamente significativo, acima de um limiar arbitrário (threshold) (LOBO & LOBO, 2014). Durante a fase exponencial, o produto de PCR irá dobrar a cada ciclo, caso a eficiência de amplificação seja perfeita, ou seja, 100%. É possível obter uma eficiência de amplificação próxima a 100% na fase exponencial se as condições de PCR, as características do primer, a pureza do template e o comprimento dos amplicons forem ótimos (BROEDERS *et al.*, 2014; MARCELINO-GUIMARÃES *et al.*, 2018)

Desde que a quantificação relativa se tornou objetivo da maioria dos experimentos que utilizam a qPCR, vários procedimentos têm sido sugeridos para a análise de dados de expressão gênica relativa. O modelo de eficiência calibrada proposto por Pfaffl (2001), método Cq comparativo (também conhecido como método  $\Delta\Delta Cq$  ou método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ), proposto por Livak e Schmittgen (2001), são os mais utilizados para determinar a quantificação relativa de um gene alvo em comparação com um gene de referência (LOBO & LOBO, 2014; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

## REFERÊNCIAS

- ALOO, B. N.; MAKUMBA, B. A.; MBEGA. E. R.; The Potential of *Bacilli* rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, Muenchen, v.219, p. 26-39, 2018.
- ARAUJO, N. A. F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ALVES, E.; MOURA, N. M.; COSTA, S. S. Identification and aggressiveness of four isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense from Latundan banana in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 165, p. 1-8, 2017.
- ATANASOVA, L.; CROM, S. L.; GRUBER, S.; COULPIER, F.; SEIDL-SEIBOTH, V.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I S. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC Genomics**, London, v. 14, p. 1-15, 2013.
- BAHROUN, A.; JOUSSET A.; MHAMDI, R.; MRABET, M.; MHADHBI, H. Anti-fungal activity of bacterial endophytes associated with legumes against *Fusarium solani*: Assessment of fungi soil suppressiveness and plant protection induction. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 124, p. 131-140, 2018

BANCROFT, J. Report of the board appointed to inquire into the cause of disease affecting livestock and plants. **Votes and Proceedings**, Queensland, v. 3, p. 1011-1038, 1876.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, p. 231-239, 2010.

BIGIRIMANA, J.; MEYER, G.; POPPE, J.; ELAD, Y.; HOFTE, M. J. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. **Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent**, v. 62, p. 1001–1007, 1997.

BOER, W.; HUNDSCHIED, M. P. J.; GUNNEWIEK, P. J. A. K.; RIDDER-DUINE, A. S.; THION, C.; VEEN, J. A. V.; WAL, A. V. Antifungal rhizosphere bacteria can increase as response to the presence of saprotrophic fungi. **Plos One**, San Francisco, v. 10, p. 1-15, 2015.

BRASIL. **Banana**: relatório completo. SEBRAE, 2008.

BROEDERS, S.; HUBER, I.; GROHMANN, L.; BERBEN, G.; TAVERNIERS, I.; MAZZARA, M.; ROOSENS, N.; MORISSET, D. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 39, p. 115-126, 2014.

BROWN, A.; TUMUHIMBISE, R.; AMAH, D.; UWIMANA, B.; NYINE, M.; MDUMA, H.; TALENGERA, D.; KARAMURA, D.; KURIBA, J.; SWENNEN, R. Bananas and plantains (*Musa spp.*). In: CAMPOS, H.; CALIGARI, P. D. S. **Genetic Improvement of Tropical Crops**, New York, 2017.

BUBICI, G.; KAUSHAL, M.; PRIGIGALLO, M. I.; CABANÁS, C. G. L.; MERCADO-BLANCO, J. Biological control agents against fusarium Wilt of Banana. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 1-33, 2019.

BUDDENHAGEN, I. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and history of introduction of 'tropical Race 4' to better manage banana production. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 828, p. 193-204, 2009

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 55, p. 611-622, 2009.

CALDERON, A. A.; ZAPATA, J. M.; MUNOZ, R.; PEDRENO, M. A.; BARCELO, A. R. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. **New Phytologist**, Oxford, v. 124, p. 455-463, 1993.

CARVALHO, N. L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 7, p. 1379-1390, 2012.

CAWOY, H.; DEBOIS, D.; FRANZIL, L.; PAUW, E.; THONART, P.; ONGENA, M. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/ amyloliquefaciens*. **Microbial Biotechnology**, West Sussex, v. 8, p. 1-15, 2014.

CAWOY, H.; MARIUTTO, M.; HENRY, G.; FISHER, C.; VASILYEVA, N.; THONART, P.; DOMMES, J.; ONGENA, M. Plant defense stimulation by natural isolates of bacillus depends on efficient surfactin production. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 27, p. 87-100, 2014.

CHOUDHARY, D. K.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology**, Cham, v. 47, p.289-297, 2007.

CHOWDHURY, S. P.; HARTMANN, A.; GAO, X. W.; RAINER, B. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1-11, 2015.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Mal-do-panamá: fim do bananal? **Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 3, n. 18, 2003.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P. de. Doenças fúngicas e bacterianas. In: CORDEIRO, Z.J.M. **Banana: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

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

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; MEISSNER FILHO, P.E. Doenças e Métodos de Controle. In: BORGES, A.L.; SOUZA, L.S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004.

CORDEIRO, Z.J.N.; MATOS, A.P.; HADDAD, F. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. **O agronegócio da banana**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

CZISLOWSKI, E.; FRASER-SMITH, S.; ZANDER, M.; O'NEILL, W. T.; MELDRUM, R. A.; TRAN-NGUYEN, L. T.; BATLEY, J.; AITKEN, E. A. B. Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, reveals evidence of horizontal gene transfer, **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 19, p. 1155-1171, 2018.

DANTAS, A.C.V.L.; ALMEIDA, W. A. B.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J. Estrutura da planta. In: FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. **O agronegócio da banana**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

DANTAS, J. L. L.; SILVA, S. O.; FILHO, W. S. S.; CARVALHO, P. C. L. Filogenia, história, evolução, distribuição geográfica e habitat. In: FERREIRA, A. C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E.P.; SEREJO, J. A. S. (Eds.). **O agronegócio da banana**, Brasília-DF: Embrapa, p. 17-28, 2016.

DANTAS, J.L.L.; SILVA, S.O.; SOARES FILHO, W.S.; CARVALHO, P.C.L. Filogenia, história, evolução, distribuição geográfica e habitat. In: FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. **O agronegócio da banana**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

DE LANGHE, E.; VRYDAGHS, L.; MARET, P.de; PERRIER, X.; DENHAM, T. Why bananas matter: an introduction to the story of banana domestication. **Ethnobotany Research and Application**, v.7, p. 165-178, 2009.

Dias, J. S. A.; Abreu, M. S.; Resende, M. L. V. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 4, p. 60-65, 2014.

DITA, M. A.; WAALWIJK, C.; PAIVA, L.V.; SOUZA, M.T.; KEMA, G.H.J. A Greenhouse Bioassay for the *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense x 'Grand Naine' (Musa, AAA, Cavendish subgroup) interaction. **Acta horticulturae**, Leuven, v. 897, p. 377-380, 2011.

DITA, M.; BARQUERO, M.; HECK, D.; MIZUBUTI, E. S. G.; STAVIER, C. P. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-21, 2018.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 42, p.185-209, 2004.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biocontrol**, Cham, v. 46, p. 387-400, 2001.

ENT, S. V.; WEES, S. C. M. V.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 70, p. 1581–1588, 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2018. **Production (2018)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> >. Acesso em: 22 Ago. 2020.

FIRA D, DIMKIC I, BERIC T, LOZO J, STANKOVIC S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

FOURIE, G.; STEENKAMP, E. T.; PLOETZ, R. C.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis cubense within the *Fusarium oxysporum* complex. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, p. 533-542, 2011.

FRASER-SMITH, S.; CZISLOWSKI, E.; MELDRUM, R. A.; ZANDER, M.; O'NEILL, W.; BALALI, G. R.; AITKEN, E. A. B. Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense. **Plant Pathology**, Adelaide, v. 63, p. 1-9, 2013.

GALVIS, Sabine. Colombia confirms that dreaded fungus has hit it's banana plantations. **Science**, 2019. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/news/2019/08/colombia-confirms-dreaded-fungus-has-hit-its-banana-plantations>. Acessado em: 29 de outubro de 2020

GANG, G.; BIZUN, W.; WEIHONG, M.; XIAOFEN, L.; XIAOLIN, Y.; CHAOHUA, Z.; JIANHONG, M.; HUICAI, Z. Biocontrol of fusarium wilt of banana: Key influence factors and strategies. **African Journal of Microbiology Research**, Victoria Island v.7, p. 4835-4843, 2013.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 699-703, 2003.

GOND, S. K.; BERGEN, M. S.; TORRES, M. S.; WHITE JR, J. F. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, Muenchen, v. 172, p. 79-87, 2014.

GUO, L.; HAN, L.; YANG, L.; ZENG, H.; FAN, D.; ZHU, Y.; FENG, Y.; WANG, G.; PENG, C.; JIANG, X.; ZHOU, D.; NI, P.; LIANG, C.; LIU, L.; WANG, J.; MAO, C.; FANG, X.; PENG, M.; HUANG, J. Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense causing banana vascular wilt disease. **Plos One**, San Francisco, v. 9, p. 1-17, 2014.

GUO, L.; YANG, L.; LIANG, C.; WANG, G.; DAI, Q.; HUANG, J. Differential Colonization Patterns of Bananas (*Musa* spp.) by Physiological Race 1 and Race 4 Isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 163, p. 807-817 2015.

HADIWIYONO.; WIDONO, S. Endophytic Bacillus: the Potentiality of Antagonism to Wilt Pathogen and Promoting Growth to Micro-Plantlet of Banana in Vitro. **Biomirror**, v.3, p. 1-4, 2012.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, Oxford, v.189, p. 647-649, 2011.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R. VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.2, p. 43-56, 2004.

HESLOP -HARRISON. J. S.; SCHWARZACHER. T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, Oxford, v.100, p. 1073-1084, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>. Acessado em: 15 de dez. de 2019.

JOGAIAH, S.; ABDELRAHMAN, M.; TRAN, L. S. P.; ITO, S. I. Different mechanisms of Trichoderma virens-mediated resistance in tomato against Fusarium wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 19, p. 870-882, 2018.

KHAN, N.; MAYMON, M.; HIRSCH, A. M. Combating *Fusarium* infection using Bacillus-based antimicrobials. **Microorganisms**, Basel, v. 5, p. 1-13, 2017.

LAYTON, C.; MALDONADO, E.; MONROY, L.; CORRALES, L. C.; SÁNCHEZ, L. C. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. **Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**, v. 9, 177- 187, 2011.

LI, C.; ZUO, C.; DENG, G.; KUANG, R.; YANG, Q.; HU, C.; SHENG, O.; ZHANG, S.; MA, L.; WEI, Y.; YANG, J.; LIU, S.; BISWAS, M. K.; VILJOEN, A.; YI, G. Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense. **Plos One**, San Francisco, v. 8, p. 1-11, 2013.

LI, X.; BAI, T.; LI, Y.; RUAN, X.; LI, Huaping. Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4-inoculated response to Fusarium wilts in the banana root cells. **Proteome Science**, v. 11, p. 1-14, 2013.

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.

LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Considerações estatísticas na análise de dados de expressão gênica gerados pela técnica de RT-qPCR. **Embrapa Caprinos e Ovinos Documentos (INFOTECA-E)**, Sobral, 2014.

MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; DARBEN, L. M.; CARVALHO, K.; MARIN, S. R. R. Aplicações da qPCR. In: PEREIRA, T. C. **Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2018.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. Trichoderma e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M. SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**, Brasília, DF: Embrapa, 2019.

MORAN-DIEZ, M. E.; CARDOZA, R. E.; GUTIERREZ, S.; MONTE, E.; HERMOSA, R. TvDim1 of *Trichoderma virens* is involved in redox-processes and confers resistance to oxidative stresses. **Current Genetics**, Heidelberg, v. 56, p. 63-73, 2010.

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

MULAW, T. B.; DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P.; ATANASOVA, L. Novel Endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from Healthy *Coffea arabica* Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomycosis. **Diversity**, Basel, v. 5, p. 750-766, 2013.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 2044-2049, 1998.

ONGENA, M.; JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.16, p. 115-125.

PABINGER, S.; RÖDIGER, S.; KRIEGNER, A.; VIÉRLINGER, K.; WEINHÄUSEL, A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 1, p. 23-33, 2014.

PASCHOLATI, S. F.; SOUZA, V. H. M.; CARDOSO FILHO, J. A. Indução de resistência por *Trichoderma*. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M. SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**, Brasília, DF: Embrapa, 2019.

PÉREZ-VICENTE, L. Fusarium wilt (Panama disease) of bananas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. **XVI Reunión Internacional Acobat**, p.1-16, 2004.

PÉREZ-VICENTE, L.; DITA, M. A. Fusarium Wilt of Banana or Panama Disease by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense: A Review on History, Symptoms, Biology, Epidemiology and Management. In: Pérez-Vicente, L., Dita, M.A. and Martínez-de la Parte, E., Eds., Technical Manual Prevention and Diagnostic of Fusarium Wilt (Panama Disease) of Banana Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 (T4R), **FAO**, Rome, 2014.

PFÄFFL, M. W.; A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.39, p. 2002- 2007, 2001.

PLOETZ, R. C. Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **American Phytopathological Society**, v. 6, p. 653-1521, 2006.

PLOETZ, R.C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6. 2006.



- PLOETZ, R.C. Fusarium-Induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, 2006.
- PLOETZ, R.C. Panama-disease - return of the first banana menace. **International Journal of Pest Management**, Oxon, v. 40, 1994.
- PUSHPAVATHI, Y.; DASH, S. N.; MADHAVI, N.; DEEPIKA, D. Biological control of fusarium wilt disease in banana with emphasis on *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp. **Plant Archives**, v. 16 p. 51-59, 2016.
- RAMADA, M. H.; LOPES, S. F. A. C.; ULHOA, C. J. Trichoderma: metabólitos secundários. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M. SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**, Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- RYU, C. M.; FARAG, M. A.; HU, C. H.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W.; PARE, P. W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 134, p. 1017- 1026, 2004.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, p. 1101- 1108, 2008.
- SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BORGES, A. L. Cultivares. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J. A. **O agronegócio da banana**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.
- SILVA, J.R. da; CORDEIRO, Z.J.M. Fitossanidade na exportação de banana. In: CORDEIRO, Z.J.M. **Banana: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.
- SILVA, R.A.; REIS, V. M.; BALDANE, J. I.; OLIVEIRA, F. L. Defesa de plantas contra ataque de fitopatógenos. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2008.
- SIMMONDS, N. W. **Bananas**. London: Longman, 1959
- SIMMONDS, N. W. **Los plátanos**. Barcelona: Blume, 1973.
- SIMMONDS, N. W. **The Evolution of the Bananas**. Longman, London, 1962.
- STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. **Bananas**. Longman Sci. and Tech., Burnt Mill, Harlow, UK, ed. 3, pp. 468, 1987.
- STOVER, R. H. Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other Musa species. **Commonwealth Mycological Inst.**, Kew, UK, 1962.
- STOVER, R. H. Fusarium wilt of banana: some history and current status of the disease. In: PLOETZ, R.C. **Fusarium wilt of banana**. Minnesota, USA: APS Press, v.2, 1993.
- SUN, Y.; YI, X.; PENG, M.; ZENG, H.; WANG, D.; LI, B.; TONG, Z.; CHANG, L.; JIN, X.; WANG, X. Proteomics of *Fusarium oxysporum* race 1 and race 4 reveals enzymes involved in carbohydrate metabolism and ion transport that might play important roles in banana fusarium wilt. **Plos One**, San Francisco, v. 9, p. 1-20, 2014.
- SWARUPA, V.; RAVISHANKAR, K. V.; REKHA, A. Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. **Planta**, v. 239, p. 735-751, 2014.
- TAHIR, H. A. S.; GU, Q.; WU, H.; NIU, Y.; HUO, R.; GAO, X. Bacillus volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and

induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, p. 1-15, 2017.

TARIBUKA, J.; WIBOWO, A.; WIDYASTUTI, S.M.; SUMARDIYONO, C. Potency of six isolates of biocontrol agents endophytic *Trichoderma* against fusarium wilt on banana. **Journal of degraded and mining lands management**, v. 4, p. 723-731, 2017.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M.; NGUYEN, M. A practical approach to RT-qPCR- publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, p. 51–55, 2010.

THANGAVELU, R.; GOP, M. Combined application of native *Trichoderma* isolates possessing multiple functions for the control of *Fusarium* wilt disease in banana cv. Grand Naine. **Biocontrol Science and Technology**, New York, v. 25, p. 1147-1164, 2015.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 1-10, 2008.

WARDLAW, C.W. **Banana diseases including plantain and abaca**. 2 ed. London: Longman, 1972.

YUAN, J. S; REED, A.; CHEN, F.; STEWART JR, C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC bioinformatics**, London, v. 7, p.1-12, 2006.

ZEILINGER, S.; GRUBER, S.; BANSAL, R.; MUKHERJEE, P. K. b. Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30 p. 74-90, 2016.

**EFEITO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS BENÉFICOS NA  
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* EM  
BANANEIRA**

## 1. INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa spp.*) é uma espécie frutífera oriunda do sudeste asiático e atualmente cultivada em diversos países do mundo, são plantas monocotiledôneas, capazes de produzir frutos partenocárpicos comestíveis e ricos em carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e minerais (DE LANGHE *et al.*, 2009; GHAG, SHEKHAWAT & GANAPATHI, 2015). O cultivo da bananeira apresenta um grande potencial na distribuição de renda e geração de emprego, percorrendo cenários de grandes produtores a agricultores familiares que se beneficiam da planta tanto para a comercialização como para seu próprio consumo (SILVA & CORDEIRO, 2000).

A bananicultura é uma atividade agrícola com importante relevância socioeconômica em vários países do mundo. Nos países em desenvolvimento essa cultura sacia a fome de milhares de pessoas sendo considerada como fonte de alimentação básica para diversas famílias (SILVA & CORDEIRO, 2000). Segundo os dados divulgados pela FAO (2018) a Índia é o país que ocupa o primeiro lugar no ranking de produção mundial de banana, seguido pela China, Filipinas e Brasil. No Brasil, os dados coletados pelo IBGE (2019) mostraram que a banana ocupou uma área de aproximadamente 491 mil hectares e produziu cerca de 7,2 milhões de toneladas em todo país. Nessa estatística os estados brasileiros que se destacaram como maiores produtores de banana se encontra, São Paulo, que produziu em 2019 cerca de 1,070 milhões de toneladas, em seguida o estado da Bahia aparece com uma produção de 1,040 milhões de toneladas e em terceiro lugar, Minas Gerais entra na lista com a produção de 0,814 milhões de toneladas.

Como observadas em todas as culturas, algumas situações se estabelecem como ameaça impossibilitando a produção e o desempenho da bananicultura, dentre os fatores limitantes da cultura da banana está a ocorrência de pragas e doenças provocadas por fungos, nematóides e outros agentes patogênicos. (CORDEIRO & MATOS, 2000; CORDEIRO, MATOS & HADDAD, 2016). No quadro das doenças fúngicas que afetam a bananicultura a fusariose causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) é considerada uma das mais importantes, por apresentar dificuldade no manejo e grande potencial de destrutibilidade, que pode causar a perda de até 100% da produção em cultivares muito suscetíveis, como é o caso da cultivar Maçã. O Foc é um fungo de solo que usa o sistema radicular como porta de entrada para infectar a planta, e após a infecção, o patógeno migra até o xilema obstruindo o sistema condutor de água, induz a murcha e mata a planta hospedeira. Uma vez presente no solo, o patógeno pode sobreviver até 30 anos mesmo na ausência do hospedeiro, pela formação de clamidósporos, que funcionam como estruturas de resistência (CORDEIRO, MATOS & MEISSNER FILHO, 2004; PLOETZ, 1994, 2006).

A utilização de medidas como aplicação de fungicidas e outros produtos químicos são inviáveis no combate ao *Fusarium* e pode comprometer a saúde e equilíbrio do solo. Dentre as estratégias utilizadas para minimizar a murcha de fusarium, a substituição de cultivares suscetíveis por cultivares resistentes é uma das maneiras mais efetivas, outra forma alternativa é a utilização do biocontrole por meio da introdução de microrganismos benéficos, que com estratégias como o antagonismo microbiano podem ser capazes de inibir o crescimento da população de patógenos ou das ações negativas de um organismo específico, reduzindo seus danos na cultura (EILENBERG, 2006).

Ao interagir com a planta, os agentes de biocontrole, podem induzir a ativação do seu sistema de defesa, gerando resposta instantânea que servirá como uma barreira no combate ao patógeno. Microrganismos como fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* são importantes alternativas para o manejo da fusariose em bananeira. Estes, podem induzir a resistência da planta através do acúmulo de enzimas relacionadas a defesa, antes mesmo do ataque do patógeno, então o agente patogênico pode ser repelido e os danos à planta minimizados (JANKI, SAMIKSHA & PINAKIN, 2013).

Estudos da expressão gênica constituem uma ferramenta importante para entender os mecanismos envolvidos na interação planta-microrganismos. As plantas respondem ao ataque do patógeno regulando um conjunto de genes específicos e sobrepostos com funções curativas e protetoras. As repostas envolvem ativação e repressão de genes, sendo que a importância desses processos está na coordenação das vias de sinalização e efetores para minimizar o efeito do estresse biótico (SWARUPA, RAVISHANKAR & REKHA, 2013).

Visto a complexidade em minimizar a incidência da fusariose em cultivares suscetíveis de bananeira e sabendo que os microrganismo benéfico pode ser um importante aliado no protagonismo direto e indireto no processo de manejo integrado contra essa doença, esta pesquisa foi desenvolvida visando observar a interação benéfica de *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum* em mudas de bananeira desafiadas ou não com *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, analisando a influência desses microrganismos na promoção de crescimento e nos níveis de expressão de genes relacionados às respostas defesas em genótipos contrastantes de bananeira. Os resultados obtidos nesse estudo podem contribuir para o manejo integrado da murcha de fusarium e triagem de microrganismos benéficos como potencial indutor de resistência ao Foc nessa cultura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Foram utilizadas 460 mudas de bananeira micropropagadas *in vitro*, de genótipos contrastantes para a resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (raça 1), sendo estes, 200 mudas de BRS Princesa, 200 mudas de Prata-Anã e 60 mudas de Maçã.

BRS Princesa (tipo Maçã, tetraploide AAAB), híbrido criado e lançado pela Embrapa em 2008 é uma planta de porte médio alto, oriunda do cruzamento entre a cultivar Yangambi nº 2 com o híbrido diploide (AA) M53. Seu fruto tem o sabor e a morfologia externa parecido com o da banana Maçã. Em relação às doenças fungicas a BRS Princesa é uma cultivar resistente a Sigatoka amarela, tolerante a murcha de fusarium e suscetível a sigatoka negra (SILVA *et al.*, 2016).

Prata Anã (tipo Prata, triploide AAB) é uma cultivar com bom potencial em produtividade e bem conhecida no mercado brasileiro, porém seu cultivo pode ser limitado por sua suscetibilidade as sigatokas negra e amarela e a murcha de fusarium (SILVA *et al.*, 2016).

Maçã (subgrupo Maçã, triploide AAB) é uma cultivar de alto interesse para o consumidor brasileiro tanto pelo seu sabor adocicado quanto por sua utilidade

medicinal na regulação intestinal, no entanto sua produção tem sido dizimada devido a sua alta suscetibilidade ao Foc (SILVA *et al.*, 2016).

As mudas foram aclimatadas e transferidas para recipientes de 2 litros contendo substrato de fibras de coco. Ao completarem aproximadamente 15 cm as plantas foram inoculadas com a suspensão microbiana através da infestação do substrato.

## 2.2 Preparo dos inóculos e infestação do substrato.

Foram preparados três inóculos separadamente, dois com os microrganismos benéficos (*Trichoderma asperellum* e *Bacillus* sp.) e um com o patógeno (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, isolado CNPNF218, raça 1). Estes microrganismos fazem parte da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. Os isolados fúngicos foram reativados em meio de cultura BDA (200 g L<sup>-1</sup> batata; 20 g L<sup>-1</sup> dextrose e 20 g L<sup>-1</sup> ágar), onde foram repicados e incubados em BOD por 7 dias a 25°C com fotoperíodo de 12 horas de luz. O isolado bacteriano foi reativado em meio de cultura nutriente-ágar (1,5 g L<sup>-1</sup> extrato de carne; 5 g L<sup>-1</sup> cloreto de sódio; 1,5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 5 g L<sup>-1</sup> peptona; ágar 15 g L<sup>-1</sup>), incubados a 25 °C em BOD por 24 horas.

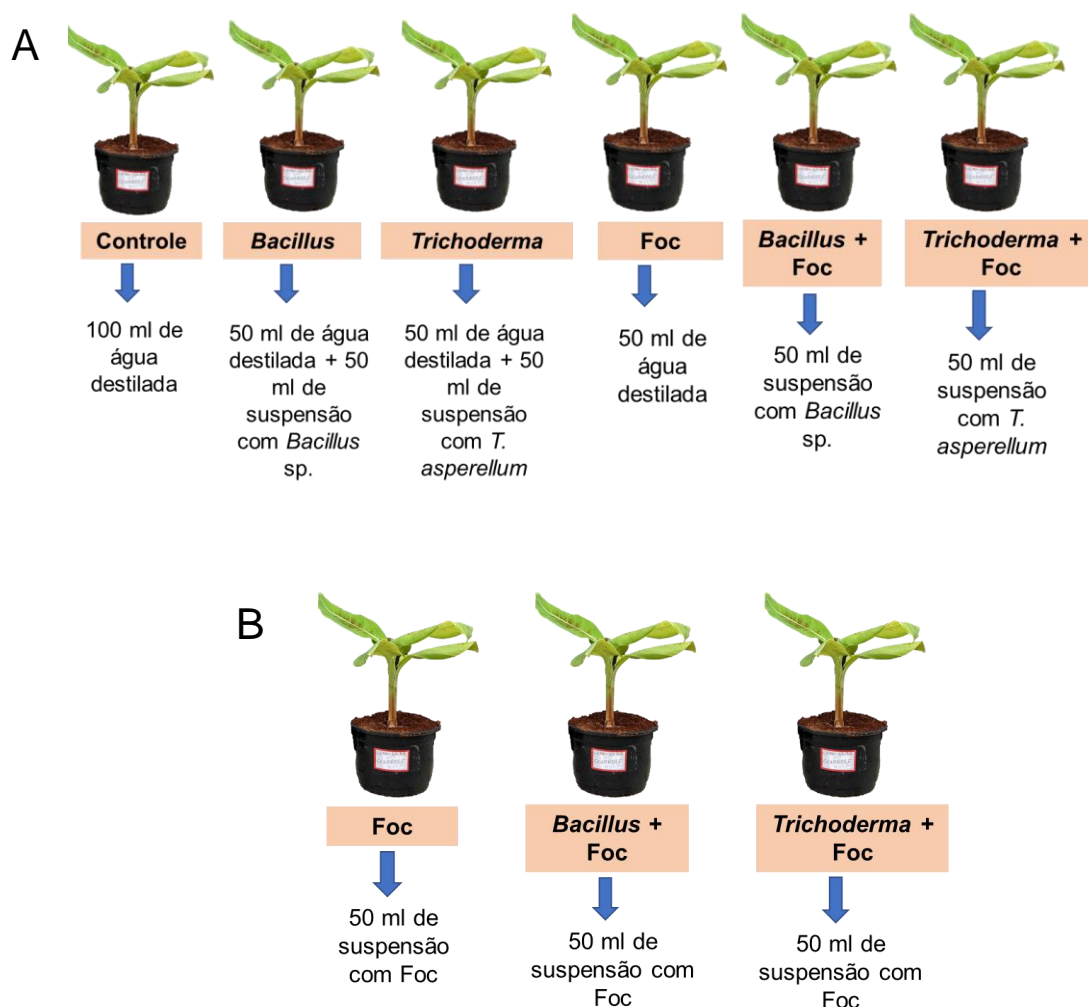
Para aumentar a quantidade de inóculo fúngico, foi utilizado o arroz como meio de cultura, onde foi autoclavado a 120°C por 20 minutos em sacos plásticos. Após a esterilização, cada saco com em média 500g de arroz foi infestado com 10 mL de suspensão de esporos fúngicos e incubados em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas de luz durante 15 dias. Para o preparo da suspensão utilizado na infestação do substrato, o inóculo fúngico foi quantificado através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Para tanto, foi retirado uma amostra de 1g do arroz infestado e depositado em um tubo de ensaio, onde foi acrescentado 9 mL de água destilada esterilizada, obtendo dessa forma uma suspensão. Posteriormente a suspensão foi diluída até a concentração 10<sup>6</sup> UFC/grama de arroz.

A multiplicação do isolado de *Bacillus* sp. foi realizada utilizando meio líquido nutritivo (1,5 g L<sup>-1</sup> extrato de carne; 5 g L<sup>-1</sup> cloreto de sódio; 1,5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 5 g L<sup>-1</sup> peptona). Para isso, as células bacterianas foram coletadas com auxílio de uma alça Drigalski do meio de cultura onde foram reativadas e vertidas para erlenmeyers de três litros contendo o meio previamente preparado. Os erlenmeyers foram vedados com gaze levados para mesa agitadora orbital por 36h. Após o período de crescimento, a absorvância de UFC das bactérias foi analisada por espectrofotometria.

## 2.3 Delineamento experimental e montagem do experimento em casa de vegetação.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 6 tratamentos sendo estes nomeados de T1 - controle; T2 - *Bacillus*; T3 - *Trichoderma*; T4 - Foc; T5 - *Bacillus* + Foc e T6 - *Trichoderma* + Foc.

As fases de inoculação aconteceram em dois dias consecutivos, como demonstrado na (Figura 1)



**Figura 1.** Fases de inoculação. (A) Primeiro dia de inoculação: infestação do substrato apenas com *Bacillus* sp e *Trichoderma asperellum*. (B) segundo dia de inoculação: infestação do substrato com *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense 24 horas após da inoculação de *Bacillus* sp e *Trichoderma asperellum*.

## 2.4 Avaliação do crescimento das plantas

A medição da altura nas plantas de BRS Princesa, Prata Anã e Maçã foi realizada nos períodos de 30, 45 e 60 dias após a inoculação. A espessura do pseudocaule foi medida nas mesmas plantas com 60 dias. Para essa análise foram utilizadas 10 repetições para cada tratamento, a medição da altura foi feita iniciando pela base do pseudocaule até a inserção da folha vela e a espessura foi medida logo na base inferior do pseudocaule.

## 2.5 Análises histológicas

### 2.5.1 Clarificação e coloração das raízes

Fragmentos radiculares das plantas de BRS Princesa e Prata Anã com 1-2 cm de comprimento foram coletados aos 10 e 17 dias após a inoculação (DAI) e fixados em solução de Carnoy (3:1; v:v; ácido acético glacial; álcool etílico absoluto) por 24 horas, em seguida foram conservados em álcool etílico 70%. Para avaliar a

colonização do Foc nos tecidos do hospedeiro foi utilizado o método proposto por (PHILLIPS; HAYMANM, 1970; BRUNDRETT et al., 1996), para isso os fragmentos foram acondicionados em recipientes contendo solução de 10% de hidróxido de potássio (KOH) por 48h. A solução foi descartada e o material biológico lavado com água até a completa remoção do KOH. Em seguida as raízes foram transferidas para a solução de 1% de ácido clorídrico (HCL) durante 5 min. Posteriormente a solução foi descartada e as raízes coradas com azul de tripan em solução de 0,05% lactoglicerol (2:1:1; v:v:v ácido láctico: glicerina; água) em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, o corante foi descartado e as raízes imersas em solução de lactoglicerol (2:1:1; v:v:v ácido láctico: glicerina; água) para a retirada do excesso do corante. As raízes foram visualizadas e fotografadas em microscópio de luz.

## 2.6 Extração de RNA total

Para extração de RNA total foram coletadas raízes de plantas de BRS Princesa e Prata Anã nos tempos 0, 1, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após inoculação (HAI). No momento da coleta, as amostras foram imediatamente imersas no nitrogênio líquido e logo após, armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração de RNA.

Para o processo de extração, foi utilizada a metodologia 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 3 µl das amostras 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 Avaliação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

### 2.7.1 Seleção dos iniciadores

Foram avaliadas as expressões relativas de 7 genes (Tabela 1) selecionados de acordo com a categoria funcional baseadas em estudos preliminares da análise de transcriptoma da interação *Musa spp.* x Foc para genes diferencialmente expressos de genótipos contrastantes para a resistência (COSTA, 2013). Para normalização da expressão gênica foram utilizados os genes TUBMU (Beta tubulina) e 25SMU (25S rRNA) como genes de referência em *Musa spp.* (PODEVIN et al, 2012).

### 2.7.2 Tratamento com DNase

O RNA total foi tratado com o kit 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, foi incubado por 2 min em temperatura ambiente, centrifugou por 1,5 minutos a 10000 rpm, e o sobrenadante armazenado em ultrafreezer a -80°C. A qualidade do RNA tratado foi conferida em gel de agarose a 1% co TAE 1 x (Tris; ácido acético glacial; água MQ) e utilizou 3 µl de cada amostra.



**Tabela 1-** Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica na interação *Musa spp.* x *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.

ID	Descrição	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
GSMUA_Achr5T15720_001	<i>Cellulose synthase A catalytic subunit 7</i>	F: GAGAATGGAGAACGGGTGCA R: CCCCTCCATGTCTCTCTCCA	108
GSMUA_AchrUn_randomT16840_001	<i>Peroxidase 64</i>	F: GTTTGCTCACTGCTCCTCCT R: TGGCTGATCCTGCGTTCTTT	146
GSMUA_Achr2T13240_001	<i>Pathogenesis-related protein 1C</i>	F: GGGAGAACATCTTCTGGGGC R: GTACTGCTTCTCGTCGACCC	80
GSMUA_Achr10T07820_001	Sinalização por reconhecimento de peptídeo da parede celular de fungos	F: AGATCGTCGCCCCAAGTG R: GCCGGCGGCATCAAG	140
GSMUA_Achr3T09360_001	Transdução de sinais	F: CAACCTCCCCATCAATGG R: TTGCTGCGCGCTGTGT	128
GSMUA_Achr6T33720_001	Domínios kinase, LRR, interação protein - proteína	F: CGGTGCGTGCCATTGG R: CTGGCCGTGTGGGAGATT	110
GSMUA_Achr8T02300_001	<i>Auxin transporter-like protein 1</i>	F: GGTTTCAGCTGCTCCTCCAAT R: AGAACAGCTGCAGGATCACC	161
TUBMU	Beta Tubulina	F: ACATTGTCAGGT GGG GAGTT R: CCTTTTGTTCACAC GAGATT	102
25SMU	25S rRNA	F: TGTTGCATCCTGGTA CTGCT R: GGCTTTCTTGCACTGGTACAC	122

Genes alvos e suas respectivas funções: (Cellulose synthase A catalytic subunit 7 [CESA 7]) fortalecimento da parede celular, (Peroxidase 64 [PER 64]) reações antioxidantes no processo estresse oxidativo, (Pathogenesis-related protein 1C [PRMS-1]) ação antifúngica, (Signaling by recognition of peptides in the cell wall of fungi [SRCFUN]) sinalização e reconhecimento da parede celular do fungo, (Signal transduction [STRANS]) transdução de sinais, (Kinase, LRR domains, protein-protein interaction [KINLRR]) reconhecimento e sinalização, (Auxin transporter-like protein 1 [AUXPL-1]) sinalização hormonal.

### 2.7.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, seguindo o protocolo: em 5µl do RNA tratado anteriormente, foi acrescentado 1 µl de 20x enzyme mix, 10 µl de 2x RT Buffer e 4 µl de Água Nuclease Free, com um volume final de 20 µL, em seguida a reação foi incubada no termociclador Veriti (Applied Biosystems®) por 60 min à 37°C + 95°C por 5 min + hold 4°C. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

#### 2.7.4 Análise dos iniciadores por RT-PCR

Para confirmar o funcionamento dos iniciadores selecionados e verificar a integridade do cDNA transcrito, foi conduzida a reação de amplificação, utilizando 5 µl do cDNA na diluição 1:100 (v:v); 2 µl na concentração inicial de 2,5 mM de dNTP; 2 µl na concentração inicial de 2 pmol.µL<sup>-1</sup> de cada iniciador; 1,6 µl na concentração inicial de 2 mM de MgCl<sub>2</sub> 1 µl na concentração inicial de 5 U/µl da enzima Taq DNA polimerase; 2 µl de tampão HCL10x e 6,4 µl de Água Nuclease Free num volume final de 20 µl. A termociclagem foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems<sup>®</sup>) à 94 °C por 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 45 s e extensão final à 72 °C por 5 min. O produto da amplificação foi visualizado em gel 1% agarose com tampão 0,5X TBE (Tris; ácido bórico; água destilada).

#### 2.7.5 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Para cada gene foram conduzidas três repetições técnicas, três biológicas e o controle negativo da reação (água). As análises de qPCR foram conduzidas no equipamento ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems<sup>®</sup>), utilizando 1 µl de cDNA tratado com DNase na diluição 1:100 (v:v); 0,3 µl de cada iniciador na concentração inicial 0,3 µM; 5 µl de SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix (Applied Biosystems) e 3,4 µl de Água Nuclease Free em um volume final de 10 µl. A amplificação foi realizada com o seguinte ciclo: holding inicial 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min e seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. A curva de melt foi determinada após o término dos ciclos de reações de cada produto amplificado entre 72 e 95°C.

A eficiência de amplificação foi testada para cada par de iniciadores. Foram determinadas utilizando diluições seriadas na proporção de 1:2 dos cDNAs para a geração de uma curva padrão, onde nestas foram avaliados o slope da curva, o valor de R<sup>2</sup> e a porcentagem da eficiência.

Em seguida os valores dos C<sub>q</sub> (quantification cycle) utilizados para determinar a diferença da expressão gênica entre os tratamentos inoculados e controle para os diferentes tempos de coletas utilizados, foram determinados pela expressão baseada na reação exponencial de PCR,  $QR = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ , em que: QR (Quantificação Relativa) determina o nível de expressão gênica, o (C<sub>T</sub>) indica o ciclo de amplificação;  $\Delta C_T$  expressa a diferença entre o C<sub>T</sub> da amostra amplificada para o gene específico e o C<sub>T</sub> da mesma amostra amplificada para o gene normalizador (de referência). Assim, o  $\Delta\Delta C_T$  representa a diferença entre o  $\Delta C_T$  da amostra de interesse em determinado tempo e o  $\Delta C_T$  da amostra de referência (controle) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para as análises e obtenção dos C<sub>T</sub> das reações foram utilizados como genes normalizadores Tubulina e 25S, de acordo com o método de Pfaffl et al. (2002).

### 3. ANÁLISE DOS DADOS

Para análise dos dados da avaliação da altura das plantas e espessura do pseudocaule, as médias dos tratamentos para ambas as avaliações foram agrupadas por meio do método de agrupamento de Scott e Knott (1974) a 5% de significância utilizando-se o pacote “ExpDess” do programa estatístico R.

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

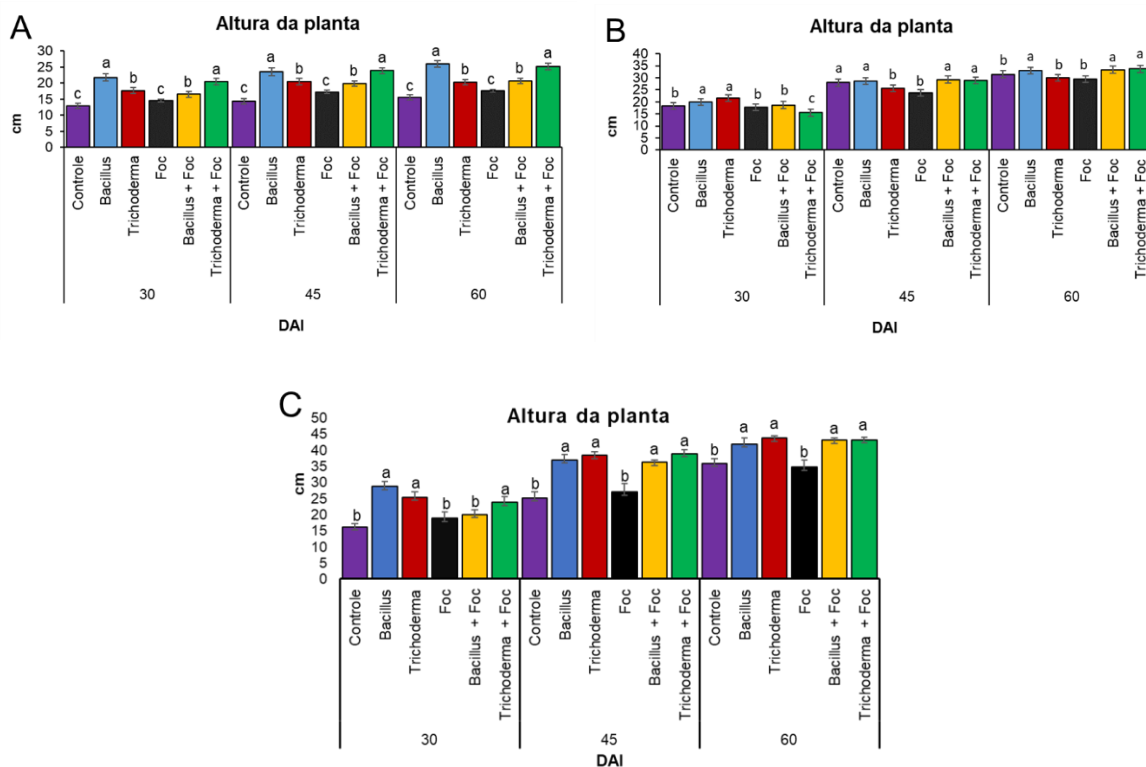
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Potencial de *Bacillus sp.* e *Trichoderma asperillum* na promoção de crescimento de bananeira sem e com a presença de Foc.

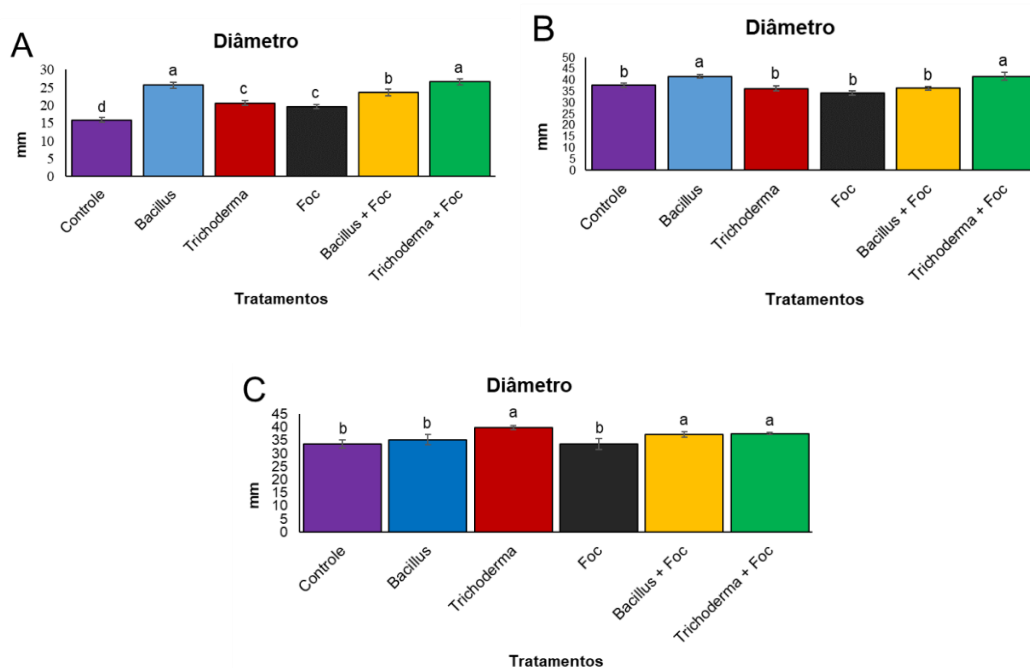
Os microrganismos benéficos mostraram-se eficientes na promoção do crescimento das plantas quando avaliados os parâmetros de altura e diâmetro do pseudocaule. Os valores médios para os tratamentos foram significantes pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), evidenciando o potencial efetivo desses agentes biocontroladores como promotores de crescimentos das mudas de bananeira.

Para as plantas de BRS Princesa (Figura 2A) foram observadas diferenças significantes na altura das mudas inoculadas com *Bacillus sp.* e *Trichoderma asperillum* em todos os tempos de avaliação, principalmente para os tratamentos *Bacillus* e *Trichoderma* + Foc, que se destacaram em relação aos demais. As plantas de Maçã (Figura 2C) apresentaram resultados semelhantes, com alturas estatisticamente diferenciadas em relação ao controle e ao tratamento Foc, os quais não se diferenciaram estatisticamente. Já nas plantas de Prata Anã (Figura 2B), as medias das alturas dos tratamentos inoculados com os microrganismos benéficos não se diferiram do tratamento controle como nos outros genótipos, isso pode ter ocorrido devido a origem das mudas utilizadas no experimento a qual apresentavam tempo de aclimação e sistema radicular em estágio de desenvolvimento diferenciados dos outros genótipos, mesmos assim foram observadas diferenças em todos os tempos de avaliação nos níveis de significância entre os tratamentos inoculados com *Bacillus.sp* e *T. asperillum* em relação ao tratamento Foc.

Com 60 dias após a inoculação do *Bacillus sp.* e *T. asperillum* (Figura 3) foi observado, no parâmetro espessura do pseudocaule, que as mudas de bananeira dos três genótipos avaliados apresentaram diferenças significantes em relação ao controle. Em BRS Princesa (Figura 3A) essa diferença foi notada principalmente nos tratamentos *Bacillus* e *Trichoderma* + Foc. Em Maçã (Figura 3C) o *T. asperillum* estimulou a espessura do pseudocaule nos tratamentos com e sem a presença do Foc enquanto os tratamentos inoculados com *Bacillus sp.* so notou essa diferença em relação ao controle no tratamento *Bacillus* + Foc. Em Prata Anã (Figura 3B) as medias dos tratamentos que apresentaram maior espessura do pseudocaule foi visto nos tratamentos *Bacillus* e *Trichoderma* + Foc.



**Figura 2.** Influência de *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum* na altura (cm) das cultivares (A) BRS Princesa, (B) Prata Anã e (C) Maçã desafiada com Foc em 30, 45 e 60 DAI em casa de vegetação. Letras minúsculas repetidas nas barras não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ). DAI: Dias após a inoculação.



**Figura 3.** Influência de *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum* na espessura do pseudocaule (mm) das cultivares (A) BRS Princesa, (B) Prata Anã e (C) Maçã desafiadas com Foc em 60 DAI em casa de vegetação. Letras minúsculas repetidas nas barras não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ). DAI: Dias após a inoculação.

Nas últimas décadas os microrganismos benéficos como bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Trichoderma*, atuantes no biocontrole de doenças de plantas tem chamado atenção para novas pesquisas abordando recursos como a sua forte influência na promoção de crescimento vegetal. A utilização de *Bacillus* spp. na promoção de crescimento já foi estudado em várias culturas como a do milho (IDRISS et al., 2002), arroz (BENEDUZI et al., 2008) e feijão (KUMAR, DUBEY & MAHESHWARI, 2012) e *Trichoderma* spp. em culturas como a do cacau (TCHAMENI et al., 2011), melão (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2014) e alface (WONGLOM, ITO & SUPAPAO, 2020).

No presente trabalho, mesmo não fazendo uso de adubação orgânica ou química durante os períodos de avaliação foi observado uma diferença significativa nos parâmetros altura e espessura do pseudocaule dos genótipos inoculados com *Bacillus* sp. e *T. asperellum* quando comparados com o tratamento controle e o tratamento inoculado apenas com Foc. Esses resultados permitem inferir a ocorrência de uma interação efetiva desses microrganismos no desenvolvimento das plantas. Os fatores que explicam a promoção de crescimento proporcionada pela interação planta-microrganismo benéfico, principalmente dos gêneros selecionados para esse estudo já foram confirmados em trabalhos anteriores, atribuindo esse mecanismo a capacidade desses agentes biocontroladores de produzir ácido indol-3-acético (AIA), (WANG et al., 2016; IDRIS et al., 2007; ORTEGA-GARCIA, et al., 2015; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009) solubilizar fosfato (BENEDUZI et al., 2008; CHAKRABORTY, CHAKRABORTY & BASNET, 2006; ALTOMARE et al., 1999) produzir sideróforos (BENEDUZI et al., 2008; QI & ZHAO, 2012) e até mesmo giberelinas (GUTIÉRREZ-MAÑERO et al., 2001)

Nos resultados aqui apresentados foi possível observar diferenças significativas na altura das plantas inoculadas com *T. asperellum*, inclusive nos tratamentos em conjunto com Foc, o que possibilita afirmar que esse agente biocontrolador pode ter minimizado a ação fitopatogênica que poderia interferir no crescimento da planta hospedeira, resultados parecidos foi encontrado em um trabalho realizado por Thangavelu & Gopi (2015), onde avaliaram em casa de vegetação a aplicação de isolados de *Trichoderma* em plantas da cultivar Grande Naine desafiadas com Foc e observaram a supressão significativa da doença e o aumento do caráter de crescimento das plantas. Taribuka et al., (2017) realizaram um estudo que avaliou a capacidade de biocontrole de duas espécies de *Trichoderma* contra o Foc, confirmando também a ação antagônica do mesmo, onde o *T. asperellum* e *T. harzianum* suprimiram a intensidade da murcha de fusarium em 8,33% em mudas de bananeira. Em outro experimento desenvolvido por Al-Ani & Albaanyit (2018) trinta e um isolados de *Trichoderma* spp. foram testados *in vitro* quanto a sua capacidade em produzir compostos voláteis capazes de inibir o crescimento da cepa LJ27 do Foc raça TR4 e foi confirmado que dentre os isolados testados oito cepas de *Trichoderma* spp. produziram metabólito com forte atividade antagônica contra a cepa LJ27, inibindo o crescimento do micélio.

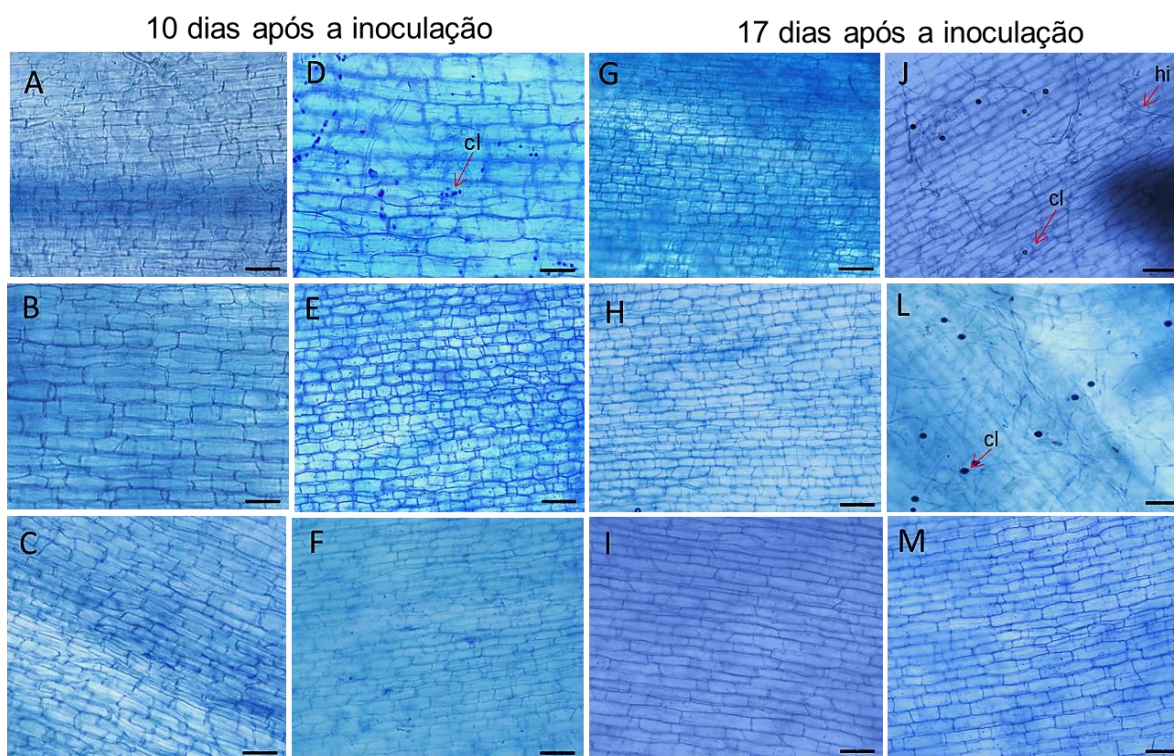
O isolado de *Bacillus* sp. utilizado nesse estudo promoveu o crescimento das plantas em todos os genótipos, sendo melhor observado em BRS Princesa e Maçã, principalmente quando inoculado isoladamente. Comparando a influência de ambos os microrganismos benéficos no crescimento das mudas de bananeiras pode-se inferir que a eficiência de *Bacillus* spp. para os tratamentos sem a interferência do Foc superou ao do *T. asperellum* em tratamento semelhante. Um estudo que também destaca *Bacillus* spp. como potencial promotor de crescimento foi realizado por

Hadiwiyono e Widono (2012), em que se analisou o potencial de 10 isolados de *Bacillus spp.* na promoção de crescimento de bananeira, constatando diferenças significativas no crescimento das mudas em relação ao controle. Em outro estudo realizado por Kavino e Manoranjitham (2017), foi observado um rápido crescimento de bananeira micropropagadas após a bacterização utilizando cepas de *Bacillus subtilis* e rizobacterias *Pseudomonas fluorensceus*, onde as plantas estudadas apresentaram maiores números de folhas e raízes quando comparado ao controle.

Os resultados observados nos genótipos Prata Anã e Maçã nas análises das avalições em 45 e 60 DAI nos tratamentos *Bacillus* + Foc deixam evidente que esses isolados também podem atangonizar diretamente o Foc, minimizando a ação patogênica do mesmo e, cocomitantemente, promover o crescimento das plantas. Resultados semelhantes foram relatados por Chen et al. (2010) onde uma espécie desse gênero foi capaz de reduzir a incidência em 73,60% da murcha de fusarium em pepino e promoveu o crescimento das mudas em estudos experimentais em vasos. Em um experimento com a cultura do algodão Gajbhiye et al. (2010) observaram que dentre 22 isolados de *bacillus subtiles* da rizosfera do algodão com potencial no antagonismo para *Fusarium oxysporum*, 38% dos isolados apresentaram atividade competitiva contra o patógeno e exibiram mais de 50% de inibição micelial. O mesmo pode ter acontecido no presente trabalho como visto nos resultados apresentados.

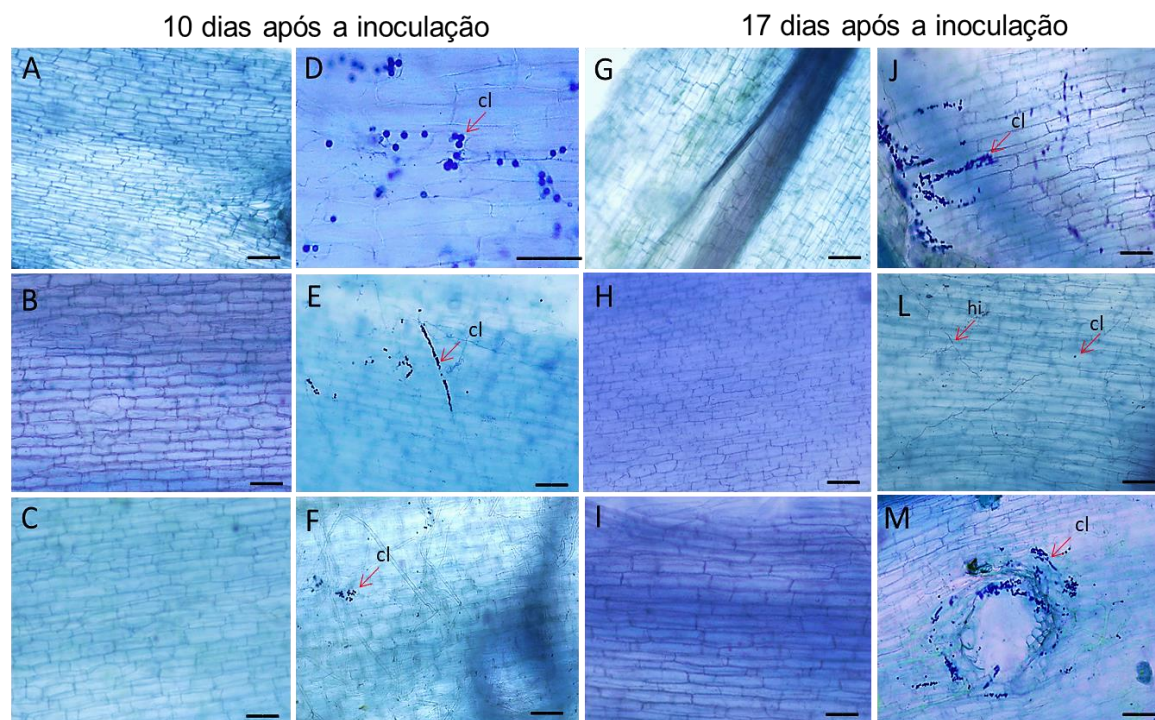
#### **4.2 Histopatologia (clareamento de raiz)**

Para o estudo histopatológico, foram aplicadas as técnicas de clareamento de raízes e coloração com azul de tripan nos genótipos BRS Princesa e Prata Anã. Observou-se com os resultados a colonização do Foc nos tecidos radiculares em ambos os genótipos. No genótipo BRS Princesa (Figura 4), foi observado a colonização pelo patógeno com 10 DAI, visualizando a presença de clamidósporo apenas no tratamento Foc e com 17 DAI essas estruturas fungicas também foram observadas no tratamento *Bacillus* + Foc. No genótipo Prata Anã (Figura 5) foi observada a presença de clamidósporo e algumas vezes hifas em todos os tratamentos inoculados com patógeno desde o decimo dia após a inoculação.



**Figura 4.** Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raiz de bananeira 'BRS Princesa' com 10 e 17 DAI. Tratamentos A e G- controle não inoculado; B e H- inoculado apenas por *Bacillus*; C e I- inoculado apenas por *Trichoderma*; D e J- inoculado por Foc com visualização de clamidósporo com 10 DAI e clamidósporo e hifa com 17 DAI; E e L- inoculado por *Bacillus* + Foc com visualização de clamidósporo com 17 DAI ; F e M- inoculado por *Trichoderma* + Foc não foi visualizado estruturas fúngicas. FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. DAI: Dias após a inoculação. hi: hifa; cl: clamidósporo. Barras: 200  $\mu$ m;





**Figura 5.** Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raiz de bananeira ‘Prata Anã’ com 10 e 17 DAI. Tratamentos A e G- controle não inoculado; B e H- inoculado por *Bacillus*; C e I- inoculado por *Trichoderma*; D e J- inoculado por Foc com visualização de clamidósporo com 10 e 17 DAI; E e L- inoculado por *Bacillus* + Foc com visualização de clamidósporo com 10 DAI e clamidósporo e hifa com 17 DAI; F e M- inoculado por *Trichoderma* + Foc com visualização de clamidósporo com 10 e 17 DAI. FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. DAI: Dias após a inoculação hi: hifa; cl: clamidósporo. Barras: A-C, E-M = 200  $\mu$ m; D= 50  $\mu$ m

A primeira linha de comunicação na interação planta-microrganismo é compreendida pela percepção por agentes microbianos aos exsudatos radiculares que podem ser compostos de aminoácidos, ácidos orgânicos, fenólicos, açúcares e proteínas (YUAN et al. 2015).

O método de clareamento de raiz e coloração com azul de tripan evidenciou a interação benéfica do isolado de *Bacillus spp.* e *T. asperellum* com o sistema radicular das plantas e isso pode ter contribuído para inibir a colonização do Foc nas raízes de BRS Princesa, onde não foi observada a presença de clamidósporo em nenhum dos tratamentos inoculados com *T. asperellum*, e nos inoculados com *Bacillus sp.* o Foc foi observado apenas com 17 DAI. Além do antagonismo direto, outros fatores como a resistência genética do hospedeiro e a ativação do sistema de defesa das plantas por esses microrganismos também podem inibir a invasão de agentes fitopatogênicos nos tecidos radiculares. Em um estudo realizado por Mohandas et al. (2010), foram notadas em amostras observadas em microscópio óptico e eletrônico a colonização de células epidérmicas e corticais de mudas de bananeiras por fungos micorrízicos arbusculares, *Trichoderma harzianum* e *Pseudomonas fluorescens* que foram capazes de promover o espessamento da parede celular das células corticais e consequentemente impedir ou retardar a invasão do Foc. O mesmo pode ter ocorrido com as plantas de BRS Princesa, a interação do sistema radicular com o *Bacillus sp.* e *T. asperellum* pode ter induzido de forma rápida o sistema de defesa das mudas de bananeira e promovido alterações estruturais na morfologia dos tecidos radiculares e estabelecido uma barreira mecânica, dificultando a entrada do Foc.



Embora o método de clareamento de raiz seja uma análise qualitativa, o resultado desse estudo mostrou que o *T. asperellum* apresentou um grande potencial no biocontrole do Foc para os genótipos investigados. Esta diferença em relação ao *Bacillus sp.* pode ser explicada pela ação do micoparasitismo desenvolvido pelo *T. asperellum*. O micoparasitismo descreve o tipo de interação biotrófica na qual os organismos se beneficiam à custa dos fungos, e a capacidade de antagonizar, parasitar ou mesmo matar outro fungo é particularmente comum no gênero *Trichoderma* (ANTASOVA et al., 2013).

### 4.3 Análise de expressão gênica

Para estudar a interação benéfica entre *Bacillus sp.* e *T. asperellum* com genótipos contrastantes de bananeira na indução de resistência ao Foc, sete genes que desempenham funções importantes no reconhecimento e sinalização (Kinase, LRR domains, protein-protein interaction [KINLRR]), reações antioxidantes no processo estresse oxidativo (Peroxidase 64 [PER 64]), transdução de sinais (Signal transduction [STRANS]), sinalização e reconhecimento da parede celular do fungo (Signaling by recognition of peptides in the cell wall of fungi [SRCFUN]), sinalização hormonal (Auxin transporter-like protein 1 [AUXPL-1]), ação antifúngica (Pathogenesis-related protein 1C [PRMS-1]) e fortalecimento da parede celular (Cellulose synthase A catalytic subunit 7 [CESA 7]) foram analisados via qPCR. Os valores de expressão gênica foram normalizados pelos genes de referências Tubulina e 25S. As análises foram realizadas nas amostras inoculadas e nos controles para cada tempo de coleta em relação ao tempo 0h sem inoculação.

A inoculação com *Bacillus sp.* e *T. asperellum* em BRS Princesa (Figura 6A) induziu a expressão do gene KINLRR na maior parte dos tempos, iniciando a partir de 1 HAI e chegando ao maior nível de expressão em 36 HAI do Foc no tratamento *Trichoderma* + Foc. Em Prata Anã (Figura 6B) a regulação desse gene foi reprimida na maioria dos tempos, sendo observada uma leve expressão a partir de 12 HAI dos microrganismos benéficos, após a inoculação Foc a expressão positiva desse gene foi observada apenas nos tratamentos Foc e *Bacillus* + Foc com 12 e 24 HAI.

Em BRS Princesa os microrganismos benéficos induziram a expressão do gene PER 64 (Figura 6C) em todos os tempos analisados, apresentando uma leve expressão no tratamento *Bacillus* desde 1 HAI, sendo que os maiores valores de expressão positiva desse gene aconteceram 36 HAI do Foc no tratamento *Bacillus* + Foc e 72 HAI nos tratamentos Foc e *Trichoderma* + Foc. Em Prata Anã o gene PER 64 (Figura 6D) foi reprimido na maioria dos tempos analisados, tendo um leve nível de expressão positiva mediado por *T. asperellum* a partir de 12 HAI e *Bacillus spp.* com 48 HAI. O maior nível de expressão de PER 64 nesse genótipo foi notado apenas em 1 HAI do Foc nos tratamentos *Bacillus* + Foc e *Trichoderma* + Foc.

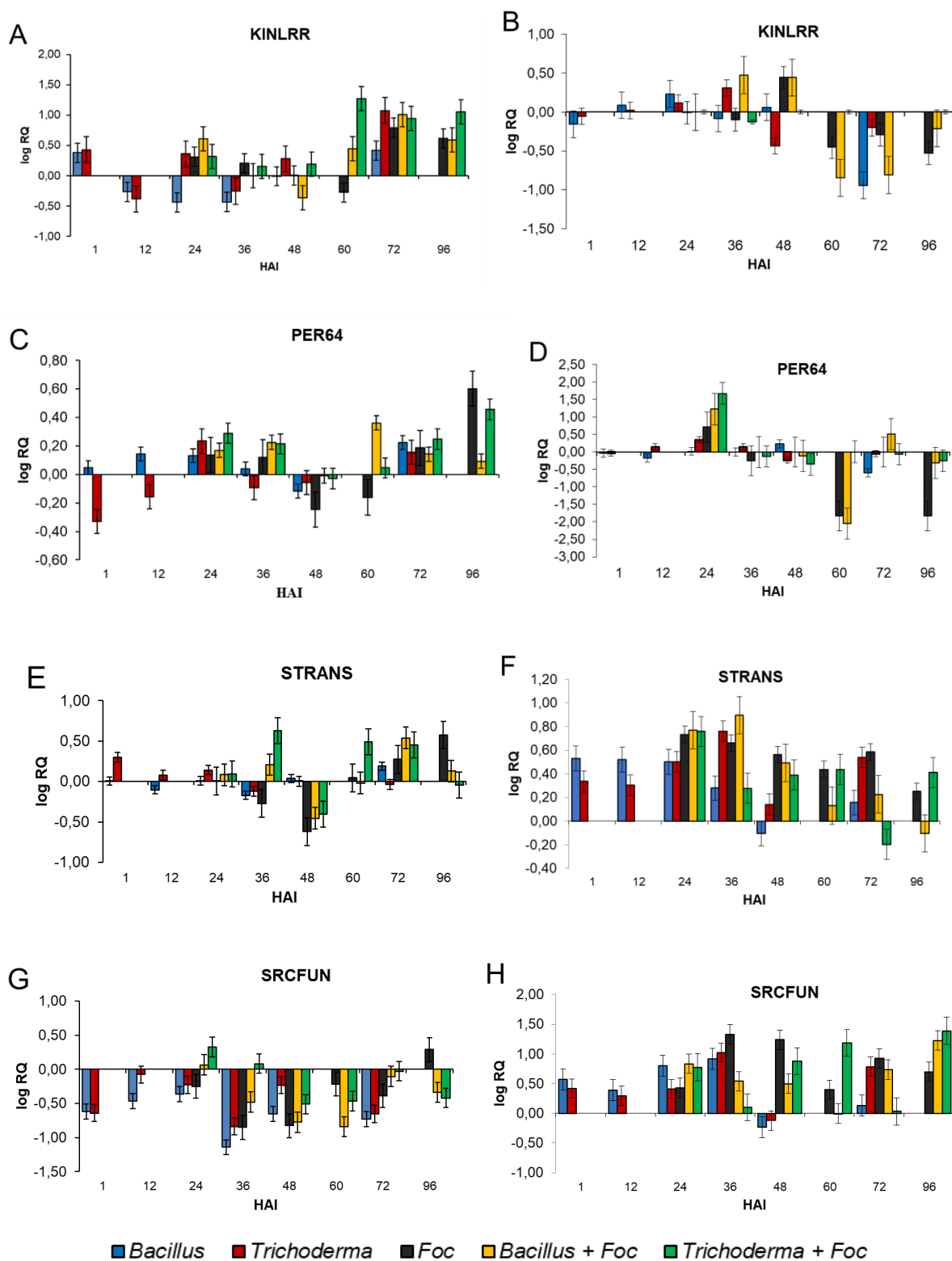
O gene STRANS (Figura 6E) apresentou uma regulação positiva na cultivar BRS Princesa desde 1HAI no tratamento *Trichoderma*. Nos tratamentos inoculados com Foc que tinham sido pré-inoculados com microrganismos benéficos foi notado um maior nível de expressão durante os tempos de avaliação, iniciando a partir de 1HAI nos tratamentos *Bacillus* + Foc e *Trichoderma* + Foc. Em Prata Anã (Figura 6F) esse gene apresentou um alto nível de expressão positiva em todos os tempos e para todos os tratamentos, destacando os tratamentos *Bacillus* + Foc e *Trichoderma* + Foc com 1HAI e *Bacillus* + Foc com 12 HAI.

O gene SRCFUN (Figura 6G) foi reprimido na cultivar BRS Princesa em praticamente todos os tempos analisados, apresentando uma leve indução apenas em 1HAI do Foc no tratamento *Bacillus* + Foc, 1 e 12 HAI nos tratamentos *Trichoderma* + Foc e com 72 HAI no tratamento Foc. Em Prata Anã (Figura 6H) o gene foi induzido em todos os tratamentos e em todos os tempos de inoculação apresentando maior nível de indução principalmente após a inoculação do patógeno.

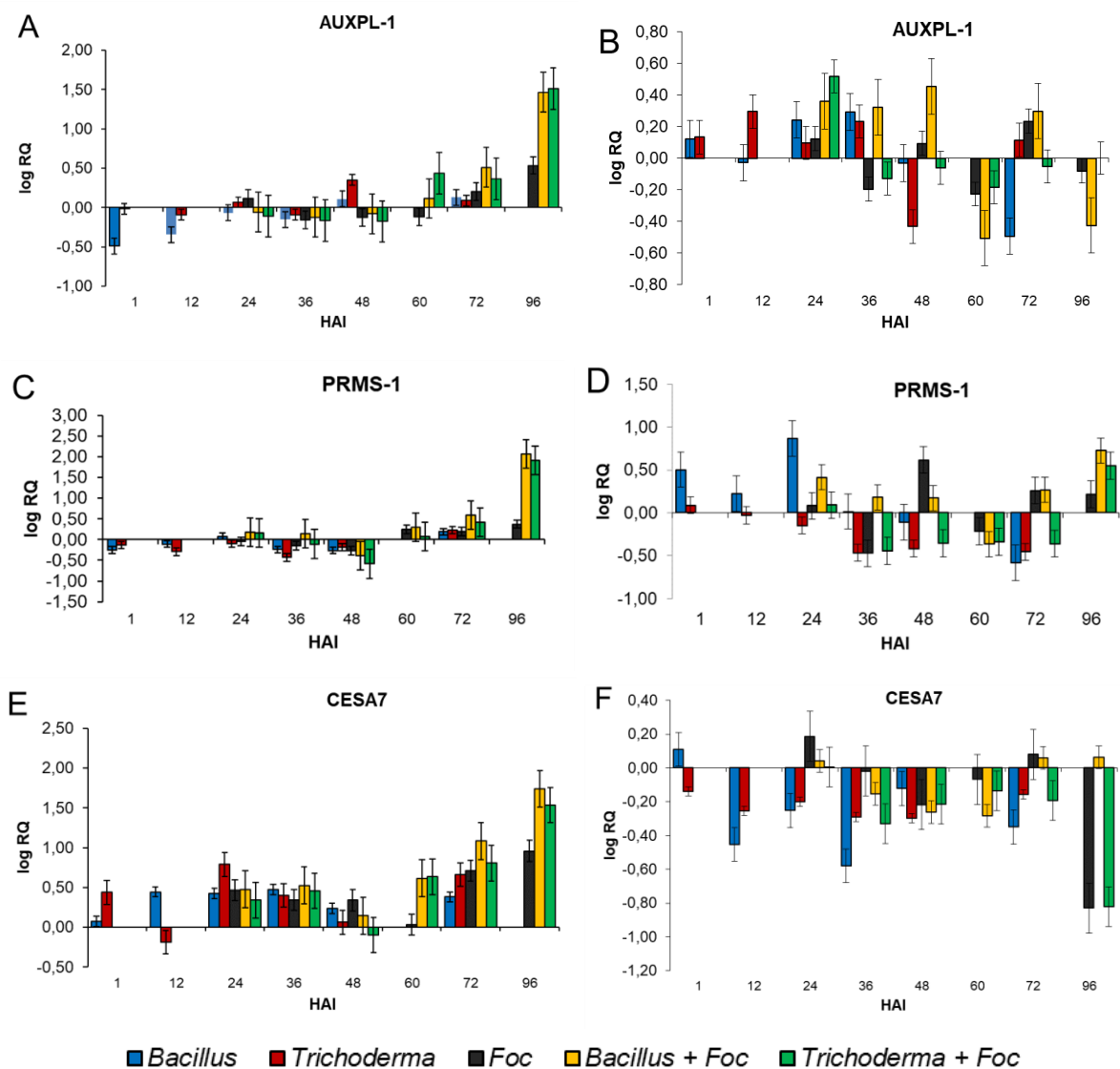
O gene AUXPL-1 (Figura 7A), foi expresso levemente e de forma positiva nas plantas de BRS Princesa a partir de 24 HAI no tratamento *Trichoderma* e a partir de 48 HAI no tratamento *Bacillus* + Foc, após a inoculação do Foc os tratamentos pré-inoculados com microrganismos benéficos tiveram a expressão positiva desse gene a partir de 36 horas HAI com maior nível de expressão em 72 HAI. Em Prata Anã (Figura 7B) os agentes biocontroladores induziu levemente a expressão de AUXPL-1 a partir de 1HAI, o maior nível de expressão aconteceu a partir de 1HAI do Foc nos tratamentos *Bacillus* + Foc e *Trichoderma* + Foc.

Em BRS Princesa o gene PRMS-1 (Figura 7C) foi regulado positivamente com mais frequências nos tratamentos inoculados com Foc e pré-inoculado com *Bacillus* spp. e *T. asperellum*, observando uma leve expressão desde 1HAI do Foc e com uma superexpressão com 72HAI. No genotipo Prata Anã (Figura 7D) esse gene se expressou de forma positiva a partir de 1 HAI dos microrganismos benéfico com maior nível de expressão no tratamento *Bacillus*, após a inoculação do Foc o gene PRMS-1 foi induzido após 1 h nos tratamentos *Bacillus* + Foc e *Trichoderma* + Foc e seguiu sendo expresso em praticamente todos os tempos de avaliação principalmente no tratamento *Bacillus* + Foc.

Em BRS princesa o gene CESA 7 (Figura 7E) apresentou uma expressão positiva a partir de 1 HAI dos microrganismos biocontroladores e permaneceu expresso em todos os tratamentos e por todos os tempos avaliados, com maior nível de expressão em ordem crescente em 48 e 72 HAI do Foc nos tratamentos *Bacillus* + Foc e *Trichoderma* + Foc. Em Prata Anã (Figura 7F) esse gene foi reprimido em praticamente todos os tempos de inoculação, dentre os agentes biocontroladores apenas o *Bacillus* foi capaz de induzir a expressão desse gene, o que foi observado em 1 HAI no tratamento *Bacillus* e com 48 e 72 HAI do Foc no tratamento *Bacillus* + Foc.



**Figura 6.** Perfil de expressão relativa dos genes em amostras de (A, C, E, G,) BRS Princesa e (B, D, F, H,) Prata Anã inoculadas com *T. asperellum*, *Bacillus* sp. e *Foc* em relação ao controle não inoculado no tempo 0 h. (A e B) Kinase, LRR domínios, interação proteína-proteína [KINLRR], (C e D) *Peroxidase 64* [PER 64], (E e F) Sinal de transdução [STRANS], (G e H) Sinalização por reconhecimento de peptídeos na parede celular de fungos [SRCFUN]. As quantificações foram normalizadas utilizando o gene de referência 25S e Tubulina. FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.



**Figura 7.** Perfil de expressão relativa dos genes em amostras de (A, C, E,) BRS Princesa e (B, D, F) Prata Anã inoculadas com *T. asperellum*, *Bacillus* sp. e *Foc* em relação ao controle não inoculado no tempo 0 h. (A e B) *Auxin transporter-like protein 1* [AUXPL-1], (C e D) Proteína relacionada à patogênese 1C [PRMS-1] e (E e F) Cellulose synthase A catalytic subunit 7 [CESA 7]. As quantificações foram normalizadas utilizando o gene de referência 25S e Tubulina. FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.

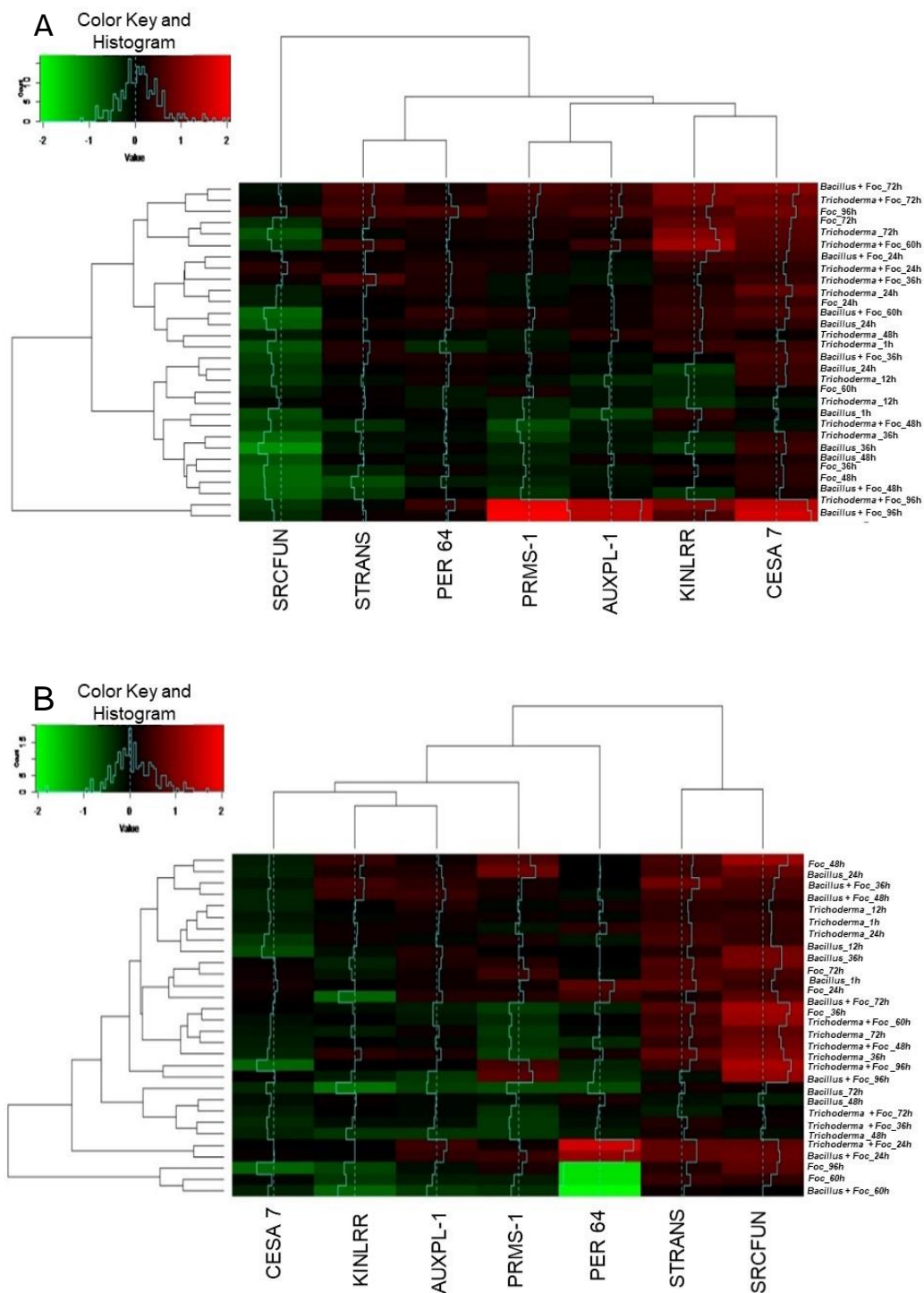
A representação dos 7 genes diferencialmente expressos selecionados está apresentada na (Figura 8 A e B) por meio de dendograma. Os gráficos mostram o agrupamento hierárquico das amostras dos genótipos BRS Princesa e Prata Anã, segundo o perfil de expressão gênica dos 7 genes analisados. As linhas do dendograma representam os tratamentos utilizados e os tempos de coleta. As colunas mostram cada um dos genes selecionados.

Os transcritos diferencialmente expressos, visualizados com a utilização da representação gráfica Heat Map mostram os valores de expressão representados por cores que variam em função da sua intensidade. Para visualizar os diferentes níveis de expressão foi atribuída a cor vermelha onde a tonalidade mais intensa representa um maior nível e da mesma forma a cor verde representa um menor nível de expressão do gene.

Analisando os perfis de expressão genica de forma global, observou-se que no genótipo BRS Princesa (Figura 8A) após a inoculação dos microrganismos benéficos, dentre os sete genes utilizados nesse estudo o CESA 7, KINLRR, AUXPL-1 e PRMS-1 apresentaram maior nível de expressão positiva. Enquanto no genótipo Prata Anã (Figura 8B) os genes melhor induzidos foram SRCFUN, STRANS e PER 64. Esses resultados deixam claro o contraste entre esses genótipos em relação aos perfis de expressão dos genes relacionados a defesa contra o Foc e através disso, pode ser considerado que a indução dos mesmos, mediados pela interação entre os genótipos de bananeiras x microrganismos benéficos pode variar de acordo com o padrão genético de resistência e suscetibilidade da cultivar, ou seja, os mesmos genes induzidos em um genótipo podem ser reprimidos em outro quando submetidos a iguais tratamentos.

A interação benéfica entre plantas e microrganismos estimulam a expressão de genes envolvidos nas repostas de defesa e induz a resistência do hospedeiro a posteriores ataques de microrganismos patogênicos (YEDIDIA et al., 2000; TING et al., 2010; SUNDARAMOORTHY et al., 2012). Neste trabalho, a interação de *Bacillus* sp. e *T. asperellum* com genótipos contrastantes de bananeiras foi tido com o propósito em analisar os efeitos nos níveis de expressão gênica via qPCR em plantas desafiadas ou não com Foc.

Através da análise molecular observou-se que ambos os isolados microbianos induziram a expressão dos genes relacionados as respostas de defesa nas plantas de bananeira, causando uma expressão diferencial em relação ao controle sem inoculação e ao tratamento inoculado apenas com Foc. Com esse estudo também foi possível notar que na maioria dos tratamentos pre-inoculados com microrganismos benéficos, quando desafiados com Foc, os níveis de expressão dos genes foram mais elevados que os demais tratamentos, esse resultado realça o efeito 'priming' proporcionados pelo *Bacillus* sp. e *T. asperellum* nas mudas de bananeira. Essa sensibilização dos tecidos vegetal induzidas por microrganismos benéficos para melhorar a expressão de defesa das plantas foi caracterizada como uma ativação mais rápida e/ ou mais forte das defesas celulares após o ataque de patógeno, resultando em maior resistência dos vegetais ao invasor (CONRATH, 2008; ENT, WESS & PIETERSE, 2009; GOELLNER & PIETERSEN et al., 2014).



**Figura 8.** Heat Map dos perfis de expressão relativa dos genes (SRCFUN) *Signaling by recognition of peptides in the cell wall of fungi*, (STRANS) *Signal transduction*, (PER 64) *Peroxidase 64*, (PRMS-1) *Pathogenesis-related protein 1C*, (AUXPL-1) *Auxin transporter-like protein 1*, (KINLRR) *Kinase, LRR domains, protein-protein interaction*, (CESA-7) *Cellulose synthase A catalytic subunit 7* em amostras de (A) BRS Princesa e (B) Prata Anã, em seis tempos de coletas após a inoculação com *T. asperellum*, *Bacillus* sp. e *Foc* em relação ao controle não inoculado no tempo 0 h. As quantificações foram normalizadas utilizando o gene de referência 25S e Tubulina.

Resultado semelhante a esse foi notado por Raman, Gopalakrishnan & Perumal, (2016) estudando os padrões de genes relacionados a defesa diferencialmente expresso de banana 'Grand Naine' na interação com Foc e *T. asperellum*, onde foi observado que a expressão dos genes endoquitinase, poliubiquitina, calmodulina-proteína de ligação, redutase de isoflavona e lectina de ligação a manose foi maior nas plantas inoculadas com *T. asperellum* + Foc em comparação às plantas inoculadas com Foc isoladamente.

As respostas imunes desencadeadas por microrganismos benéficos são iniciadas após a percepção pelas células vegetais de compostos elicitores microbianos, também chamados de padrões moleculares associados a microrganismos/patógeno (MAMP/PAMP) (BENT & MACKEY, 2007). Com base nessa afirmação é pertinente sugerir que a elicitação mediada pelos agentes biocontroladores utilizados nesse trabalho pode ter desempenhado um importante papel na expressão positiva dos genes analisados. Isso foi confirmado por ambos os genótipos: em BRS Picesa os genes KINLRR, PER 64, STRANS e CESA 7 foram induzidos logo nos tempos iniciais após a inoculação e Prata Anã manteve o mesmo padrão para praticamente todos os genes analisados e principalmente nos tratamentos inoculados com *Bacillus* sp.. A produção de compostos voláteis e lipopeptídeos sintetizados por *Bacillus* spp. são os principais metabolitos elicitores desse gênero. Cawoy et al. (2014) mostraram que os lipopeptídeo especificamente da família surfactina produzidos por isolados de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* foi eficiente na indução de resistências de mudas de tabaco ao patógeno fúngico *Bortrytis cinerea*, resultado este que foi confirmado com a inoculação de células vivas dos mesmos isolados em mudas de tomates, observando que todas as cepas produtoras de surfactinas protegeram significativamente as plantas da doença.

Em geral, quando a planta reconhece o ataque de um patógeno com a ajuda de genes de resistência (R), é ativado uma rede de sinalização de defesa e as principais moléculas sinalizadoras (ROS) podem induzir outras moléculas, tais como Cálcio ( $Ca^{2+}$ ), que por sua vez também estão envolvidas na rota de sinalização e respostas de defesa contra MAMPs/PAMPs. Esse evento provoca uma explosão oxidativa e induz a planta a produzir enzimas antioxidantes como as peroxidases para minimizar o efeito tóxico e destrutivo causado pelos ROS aos tecidos vegetais (SWARUPA, RAVISHANKAR & REKHA, 2013). As peroxidases são enzimas multifuncionais que atuam não apenas como antioxidantes durante o estresse oxidativo, mas também ajudam na formação de compostos fenólicos que lignificam a parede celular hospedeira (LI et al., 2011). No presente trabalho, a inoculação de *Bacillus* sp. e *T. asperellum* demonstrou eficiência na indução do gene peroxidase em ambos os genótipos, observando-se a expressão positiva desse gene desde os primeiros tempos de inoculação, principalmente nos tratamentos inoculados com microrganismos benéficos + Foc. Resultados semelhantes a esse foram encontrados por Yedidia et al. (2000), que observaram em um estudo com mudas de pepino, um aumento na produção de peroxidase a partir de 48 horas após inoculação com *Trichoderma harzianum*. Em bananeira, Ting et al. (2010) notaram que os níveis de enzimas relacionadas a resposta de defesa, dentre elas a peroxidase, foram evidentemente mais altos em plantas pré-tratadas com a endobactéria *Serratia marcescens* em comparação com o controle, e as plantas pré-tratadas apresentaram menor gravidade da doença (50%) em comparação com as plantas doentes sem a endobactéria (74%).

Semelhante à peroxidase, a ativação dos genes responsáveis pela percepção, reconhecimento, sinal de transdução, reforço da parede celular e proteínas relacionada a patogênese (PR) apresentaram regulações positivas em relação aos níveis de expressão basal nas mudas de bananeira em poucas horas após a inoculação com *Bacillus* sp. e *T. asperellum*. Os receptores quinases de plantas são os principais receptores de sinais atuando em várias vias de sinalização (ANTOLÍN-LOOVERA, BINDER & PARNISKE, 2012). A função crucial desse receptor é o reconhecimento de uma ligante extracelular, o que leva a ativação do domínio quinase intracelular e subsequente transdução das vias de sinalização, além de desempenhar papéis fundamentais no desenvolvimento, resposta ao estresse, resistência a doenças e simbiose (KEIKO & TORII, 2004). Os resultados desse trabalho permitem inferir que o genótipo Prata Anã que é suscetível ao Foc, mesmo apresentando um nível de expressão basal menor que BRS Princesa em relação ao gene KINLRR, também mostrou uma resposta de expressão positiva ao interagir com os microrganismos benéficos, confirmando a importância dessa interação para as respostas de defesa da bananeira.

A síntese de proteínas PR é uma característica proeminente das respostas de defesa das plantas ao estresse biótico. A proteína PR1 é uma das proteínas pertencentes ao grupo das que degradam a parede celular fúngica, digerindo os principais componentes da quitina ou glucana e, portanto, inibem o crescimento fúngico (LI et al., 2011). A expressão de proteínas PR está relacionada a resposta defensiva à infecção por fungo nas plantas, no entanto, em condições normais encontram-se expressas em baixos níveis, normalmente de forma constitutiva. No presente estudo, foi observado a regulação positiva do gene PRMS-1 em ambos genótipos após a inoculação com os microrganismos benéficos. Em BRS Princesa esse gene foi inicialmente induzido com 24 HAI, enquanto que em Prata Anã a indução aconteceu desde 1 HAI com maior nível de expressão principalmente nos tratamentos inoculados com *Bacillus* sp. Em milho, Gond et al. (2014) testando a indução da expressão de genes de defesa em planta após o tratamento com *B. subtilis* observaram que o mesmo também proporcionou a regulação positiva do gene PR1 de forma significativamente maior que o tratamento controle.

A parede celular compõem uma das principais barreiras de defesa ao ataque de patógenos em plantas, e a perturbação da mesma por fatores bióticos e abióticos pode levar a uma rápida reorganização por mecanismos compensatório, como a deposição de moléculas pré-formadas de ligninas e compostos fenólicos, que pode ajudar a minimizar os danos. Estas mudanças podem resultar em aumento nas respostas de defesa contra agentes patogênicos (DALLAGNOL & ARAUJO FILHO, 2018). As respostas de defesa induzidas pelos microrganismos benéficos utilizados nesse estudo para o gene CESA 7 apresentou um resultado contrastante entre os genótipos. Em BRS Princesa esse gene se expressou de forma positiva em praticamente todos os tempos, enquanto em Prata Anã o mesmo foi reprimido. Esse resultado pode estar relacionado com a diferença na resistência genética quantitativa em relação ao Foc entre ambos os genótipos e isso pode ter proporcionado as plantas de BRS Princesa uma melhor resposta quando em contato com microrganismos. Por outro lado, em Prata Anã a repressão desse gene pelos microrganismos no processo de resposta inicial de defesa ao Foc pode ser uma das causas que facilite a colonização desse patógeno no sistema radicular dessa cultivar aumentando assim, a gravidade da doença.



## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho confirmou a eficácia do isolado de *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum* como promotores de crescimento e indutores de resistência das plantas de bananeiras, destacando-os como microrganismos com potencial para o uso no controle biológico no combate a murcha de fusarium.

A visualização de estruturas fúngicas nos tecidos radiculares demonstrou que o uso dos microrganismos benéficos principalmente *Trichoderma asperellum* foi capaz de impedir a colonização do Foc nos tecidos radiculares do genótipo tolerante 'BRS Princesa'.

A avaliação de expressão genica via qPCR mostrou que os níveis de expressão dos genes relacionados as respostas de defesas foram potencializados nos tratamentos inoculados com Foc pre-inoculados com *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum*, comprovando a importância desses microrganismos benéficos na prevenção contra o Foc.

Os perfis de expressão gênica dos transcritos diferencialmente expressos, visualizados com a utilização da representação gráfica Heat Map mostrou um contraste na regulação dos genes entre o genótipo tolerante e suscetível ao Foc no processo de interação com os microrganismos.

## REFERÊNCIAS

- AL-ANI, L. K. T.; ALBAAYIT, S. F. A. Antagonistic of some *Trichoderma* against *Fusarium Oxysporum* sp. f. cubense Tropical Race 4 (FocTR4). **International Conference on Research in Education and Science (ICRES)**, v. 2, p. 35-38, 2018.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; RYMAN, T. B.; HARMAN, G. E. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2926-2933, 1999.
- 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.
- ATANASOVA, L.; CROM, S. L.; GRUBER, S.; COULPIER, F.; SEIDL-SEIBOTH, V.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I S. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC Genomics**, London, v. 14, p. 1-15, 2013.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **applied soil ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 311-320, 2008.
- BENT, A. F.; MACKAY, D. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 45, p. 399-436, 2007.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. Austrália: ACIAR Monograph, 1996. 374p.

CAWOY, H.; MARIUTTO, M.; HENRY, G.; FISHER, C.; VASILYEVA, N.; THONART, P.; DOMMES, J.; ONGENA, M. Plant defense stimulation by natural isolates of bacillus depends on efficient surfactin production. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 27, p. 87-100, 2014.

CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.; BASNET, M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. **Journal of Basic Microbiology**. Berlin, v. 46, p. 186-195, 2006.

CHEN, F.; WANG, M.; ZHENG, Y.; LUO, J.; YANG, X.; WANG, X. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 26, p.675-684, 2010.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACIAS-RODRIGUEZ, L.; CORTES-PENAGOS, C.; LOPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 149, p. 1579–1592, 2009.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; HADDAD, F. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FERREIRA, A. C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E.P.; SEREJO, J. A. S. (Eds.). **O agronegócio da banana**, Brasília-DF: Embrapa, p. 547-575, 2016

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSINER FILHO, P. E. M. **Doenças e métodos de controle. O cultivo da bananeira**. (Eds. A. L. Borges e L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P. de. Doenças fúngicas e bacterianas. In: CORDEIRO, Z.J.M. **Banana: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

COSTA, J. L. **Estudos histológicos e moleculares da interação Musa spp. x Fusarium oxysporum f. sp. Cubense**. 2013.195f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Planta) – Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2013.

DALLAGNOL, L. J.; ARAUJO FILHO, J. V. Uma visão geral da resistência genética da planta a microrganismos. In: DALLAGNOL, L. J. **Resistência genética: de plantas a patógenos**. Pelotas, 2018.

DE LANGHE, E.; VRYDAGHS, L.; MARET, P.de; PERRIER, X.; DENHAM, T. Why bananas matter: an introduction to the story of banana domestication. **Ethnobotany Research and Application**, v.7, p. 165-178, 2009.

EILENBERG J.. Concepts and visions of biological control. In: EILENBERG J, HOKKANEN, H. M. T. **An ecological and societal approach to biological control**. Dordrecht, the Netherlands: Springer, p. 1–11, 2006.

ENT, S. V.; WEES, S. C. M. V.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 70, p. 1581–1588, 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2018. **Production (2018)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 22 Ago. 2020.

FERREIRA, C.F; GUTIERREZ, D.L; KREUZE, J.F; ISKRA-CARUANA, M.L; CHABANNES, M; BARBOSA, A.C.O; SANTOS, T.A.; SILVA, A.G.S.; SANTOS,

- R.M.F.; AMORIM, E.P.; OLIVEIRA, S.A.S. DE; JESUS, O.N. Rapid plant DNA and RNA extraction protocol using a bench drill. **Genetics and Molecular Research**. v. 18, n. 3, p.1-8, 2019.
- GAJBHIYE, A.; RAI, A. R.; MESHRAM, S. U.; DONGRE, A. B. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 26, p. 1187-1194, 2010.
- GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management, **International Journal of Pest Management**, London, v. 61, p. 250-263, 2015.
- GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, Cham, v. 121, p. 233-242, 2008.
- GOND, S. K.; BERGEN, M. S.; TORRES, M. S.; WHITE JR, J. F. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, Muenchen, v. 172, p. 79-87, 2014.
- GUTIERREZ-MANERO, F. J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F. R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 111, p. 206-211, 2001.
- HADIWIYONO.; WIDONO, S. Endophytic Bacillus: the Potentiality of Antagonism to Wilt Pathogen and Promoting Growth to Micro-Plantlet of Banana in Vitro. **Biomirror**, v.3, p. 1-4, 2012.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>. Acessado em: 15 de dez. de 2019.
- IDRIS, E. E.; IGLESIAS, DOMINGO. J.; TALON, M.; BORRIS, R. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects Level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 20, p. 619-626, 2007.
- IDRIS, E. E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, KRISTIN.; GREINER, RALF.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRIS, R.; Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, v. 148, p. 2097-2109, 2002.
- JANKI, N. T.; SAMIKSHA, P.; PINAKIN, C. D. Induction of defense-related enzymes in banana plants: effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, p.1-6, 2013.
- KAVINO, M.; MANORANJITHAM, S. K. In vitro bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates: Novel ways to combat Fusarium wilt. **European Journal of Plant Pathology**, Cham, v. 151, p. 371-387, 2017.
- KEIKO U. TORII. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. **International Review of Cytology**, Amsterdam, v. 234, p. 1-46, 2004.
- KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, Muenchen, v. 167, p. 493-499, 2012.

- Li, W. M.; Q, C. M.; Mo, Y. W.; Hu, Y. L.; Xie, J. H. Tolerance of banana for fusarium wilt is associated with early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the roots. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 10, p. 11378-11387, 2011.
- 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.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ALGUACIL, M. D. M.; PASCUAL, J. A.; WEES, S. C. M. V. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 40, p. 804-815, 2014.
- MOHANDAS, S.; MANJULA, R.; RAWAL, R. D.; LAKSHMIKANTHA, H. C.; CHAKRABORTY, S.; RAMACHANDRA, Y. L. Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents in managing *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense infection in banana cv. Neypoovan. **Biocontrol Science and Technology**, New York, v. 20, p.165-181, 2010.
- ORTEGA-GARCÍA, J. G.; MONTES-BELMONT, R.; RODRÍGUEZ-MONROYA, M.; RAMÍREZ-TRUJILLO, J. A.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, R.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 195, p. 8-16, 2015.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nuclei Acids Research**, Oxford, v. 30, 2002.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMANN, A.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. **Transactions British Mycological Society**, New York, v. 55, p. 158-161, 1970.
- PIETERSE, C, M. J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R, L.; WELLER, D. M.; WEES, S. C. M. V.; BAKKER, P. A. H. M. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 52, p. 347-75, 2014.
- PLOETZ, R.C. Fusarium-Induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 648-652, 2006.
- PLOETZ, R.C. Panama-disease - return of the first banana menace. **International Journal of Pest Management**, Oxon, v. 40, p. 326-336, 1994.
- PODEVIN, N.; KRAUSS, A.; HENRY, I.; SWENNEN, R.; REMY, S. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop *Musa*. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 30, p. 1237-1252, 2012.
- QI, W.; ZHAO, L. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 52, p. 1-10, 2012.
- RAMAN, T.; GOPALAKRISHNAN, V.; PERUMAL, G, D. Identification of differentially expressed genes from *Fusarium oxysporum* f. sp cubense and *Trichoderma asperellum* (prr2) interaction in the susceptible banana cultivar Grand Naine. **Turkish Journal of Botany**, Ancara, v. 40, p. 480-487, 2016.
- SILVA, J.R. da; CORDEIRO, Z.J.M. Fitossanidade na exportação de banana. In: CORDEIRO, Z.J.M. **Banana: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BORGES, A. L. Cultivares. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J. A. **O agronegócio da banana**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

SUNDARAMOORTHY, S.; RAGUCHANDER, T.; RAGUPATHI, N.; SAMIYAPPAN, R. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 60, p. 59-67, 2012.

SWARUPA, V.; RAVISHANKAR, K. V.; REKHA, A. Characterization of tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp., cubense infection in banana using suppression subtractive hybridization and gene expression analysis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 83, p. 1-7, 2013.

TARIBUKA, J.; WIBOWO, A.; WIDYASTUTI, S.M.; SUMARDIYONO, C. Potency of six isolates of biocontrol agents endophytic *Trichoderma* against fusarium wilt on banana. **Journal of degraded and mining lands management**, v. 4, p. 723-731, 2017.

TCHAMENI, S. N.; NGONKEU, M. E. L.; BEGOUDE, B. A. D.; NANA, L. W.; FOKOM, R.; OWONA, A. D.; MBARGA, J. B.; TCHANA, T.; TONDJE, P. R.; ETOA, F. X.; KUATÉ, J. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 30, p. 1321- 1327, 2011.

THANGAVELU, R.; GOP, M. Combined application of native *Trichoderma* isolates possessing multiple functions for the control of *Fusarium* wilt disease in banana cv. Grand Naine. **Biocontrol Science and Technology**, New York, v. 25, p. 1147-1164, 2015.

TING, A. S. Y.; MEONB, S.; KADIRB, J.; RADUC, S.; SINGHD, G. Induction of host defence enzymes by the endophytic bacterium *Serratia marcescens*, in banana plantlets. **International Journal of Pest Management**, London, v. 56, p. 183–188, 2010.

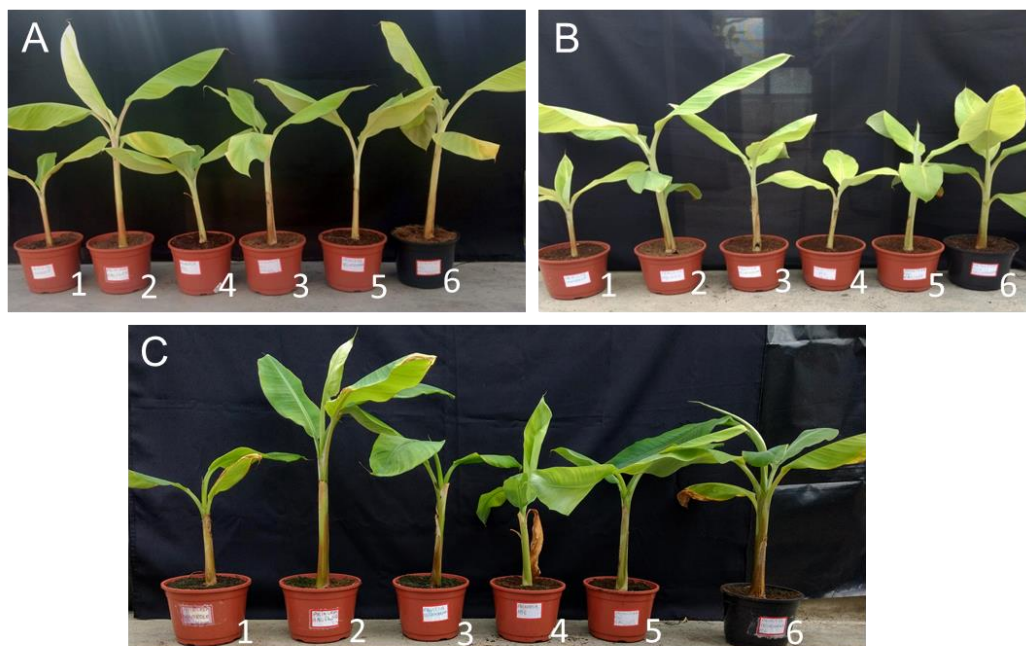
WANG, B.; SHEN, Z.; ZHANG, F.; RAZA, W.; YUAN, J.; HUANG, R.; RUAN, Y.; LI, R.; SHEN, Q. *Bacillus amyloliquefaciens* Strain W19 can Promote Growth and Yield and Suppress *Fusarium* Wilt in Banana Under Greenhouse and Field Conditions. **Pedosphere**, Beijing, v. 26, p. 733-744, 2016.

WONGLOM, P.; ITO, S.; SUNPAPAO, A. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). **Fungal Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 1-10, 2020.

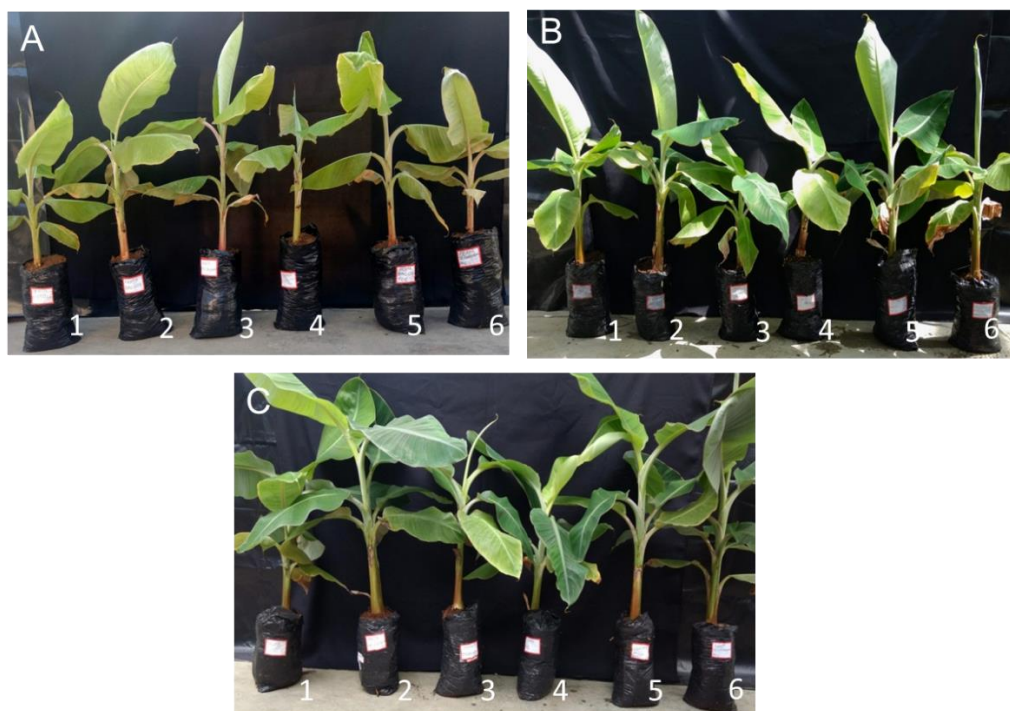
YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically?. **Fungal Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 53-59, 2015.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 38, p. 863-873, 2000.

## ANEXOS

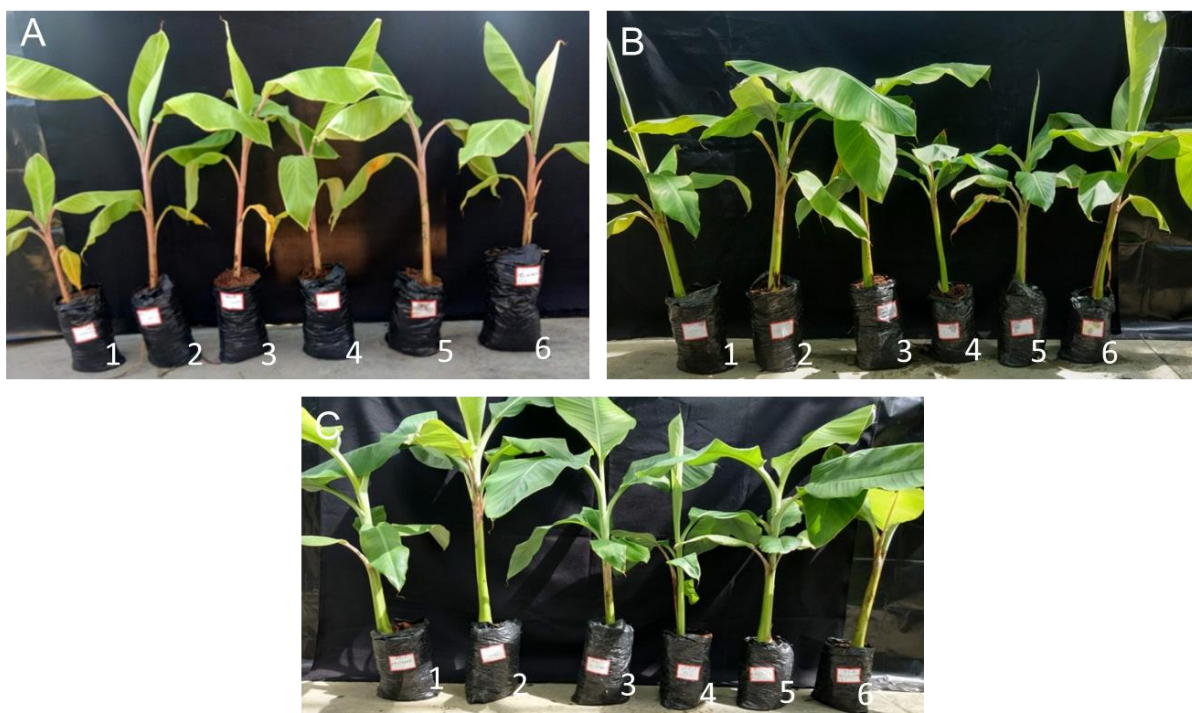


**Figura 9.** Influência de *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum* na altura da cultivar BRS Princesa desafiada com Foc em três períodos de avaliação em casa de vegetação. (A) 30 dias após a inoculação; (B) 45 dias após a inoculação; (C) 60 dias após a inoculação. Tratamento (1) controle; (2) *Bacillus*; (3) *Trichoderma*; (4) Foc; (5) *Bacillus* + Foc; (6) *Trichoderma* + Foc.



**Figura 10.** Influência de *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum* na altura da cultivar Prata Anã desafiada com Foc em três períodos de avaliação em casa de vegetação. A) 30 dias após a inoculação; (B) 45 dias após a inoculação; (C) 60 dias após a inoculação. Tratamento (1) controle; (2) *Bacillus*; (3) *Trichoderma*; (4) Foc; (5) *Bacillus* + Foc; (6) *Trichoderma* + Foc.





**Figura 11.** Influência de *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum* na altura da cultivar Maçã desafiada com Foc em três períodos de avaliação em casa de vegetação. A) 30 dias após a inoculação; (B) 45 dias após a inoculação; (C) 60 dias após a inoculação. Tratamento (1) controle; (2) *Bacillus*; (3) *Trichoderma*; (4) Foc; (5) *Bacillus* + Foc; (6) *Trichoderma* + Foc.

**Tabela B** – Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica na interação *Musa* spp.- microrganismos benéficos na indução de resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Valores de eficiência da reação (100%=1). Embrapa, Brasil, 2019.

ID	Descrição	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Eficiência
GSMUA_Achr5T15720_001	<i>Cellulose synthase A catalytic subunit 7</i>	F: GAGAATGGAGAACGGGTGCA R: CCCCTCCATGTCTCTCTCCA	108	0,99
GSMUA_AchrUn_random T16840_001	<i>Peroxidase 64</i>	F: GTTTGCTCACTGCTCCTCCT R: TGGCTGATCCTGCGTTCTTT	146	0,93
GSMUA_Achr2T13240_001	<i>Pathogenesis-related protein 1C</i>	F: GGGAGAACATCTTCTGGGGC R: GTACTGCTTCTCGTCGACCC	80	0,98
GSMUA_Achr10T07820_001	Signaling by recognition of peptides in the cell wall of fungi	F: AGATCGTCGCCCCAAGTG R: GCCGGCGGCATCAAG	140	0,96
GSMUA_Achr3T09360_001	Signal transduction	F: CAACCTCCCCCATCAATGG R: TTGCTGCGCGCTGTGT	128	0,89
GSMUA_Achr6T33720_001	Kinase, LRR domains, protein-protein interaction	F: CGGTCGGTGCCATTGG R: CTGGCCGTGTGGGAGATT	110	0,99
GSMUA_Achr8T02300_001	<i>Auxin transporter-like protein 1</i>	F: GGTTCAGCTGCTCCTCCAAT R: AGAACAGCTGCAGGATCACC	161	1,00
TUBMU	Beta Tubulina	F: ACATTGTCAGGT GGGGAGTT R: CCTTTTGTTCACACGAGATT	102	1,01
25SMU	25S rRNA	F: TGTTGCATCCTGGTA CTGCT R: GGCTTTCCTGACTGGTACAC	122	0,92