

**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**

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

**Wanderley Diaciso dos Santos Oliveira**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2020**

**INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS BENÉFICOS E  
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *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

O48i Oliveira, Wanderley Diaciso dos Santos.  
Interação genótipo x microrganismos benéficos e indução de resistência a *Fusarium oxysporum* F. sp. cubense em bananeira / Wanderley Diaciso dos Santos Oliveira. \_ Cruz das Almas, Bahia, 2020.  
56f.; il.

Orientadora: Janay Almeida dos Santos-Serejo.  
Coorientador: Fernando Haddad.  
Coorientadora: Andresa Priscila de Souza Ramos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

I. Banana – Doenças e pragas. 2. Banana – Fungos – Controle biológico. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Ramos, Andresa

CDD: 634.772

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**

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

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

**Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Wanderley Diaciso dos Santos Oliveira**

**Aprovada em: 15 de dezembro de 2020**

---

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

---

Dr. Harllen Sandro Alves Silva  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Examinador Externo ao Programa)

---

Dr. Carlos Augusto Dorea Bragança  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Examinador Externo ao Programa)

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 coorientador Dr. Fernando Haddad pelo suporte e contribuição na construção desse trabalho.

A minha coorientadora 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 companheirismos.

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, Fabiana Aud, Leandro, Vanderson e seu Raimundo que contribuíram muito com esse 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.

## INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS BENÉFICOS E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense EM BANANEIRA

**RESUMO:** A bananeira (*Musa* spp.) é considerada como uma das culturas agrícolas mais importante 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 bananeira. 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 defesa nas cultivares 'BRS Princesa' (tolerante) e 'Prata Anã' (suscetível). Os microrganismos benéficos foram eficientes na promoção do crescimento das plantas. Em 'BRS Princesa' e 'Maçã' foram notadas diferenças significantes na altura das mudas tratadas com *Bacillus* sp. e *T. asperellum* em todos os tempos de avaliação. Nas plantas de 'Prata Anã' foram observadas diferenças significativas principalmente em relação aos tratamentos que foram aplicados os microrganismos benéficos e inoculados com Foc. Foi observada a colonização do Foc nos tecidos radiculares de 'BRS Princesa' com 10 DAI, apenas no tratamento Foc. Em 'Prata Anã' foi visto clamidósporos e hifas em todos os tratamentos inoculados com Foc desde 10 DAI. No genótipo 'BRS Princesa' com 10 dias após o tratamento com *Bacillus* + Foc, foi observado pequenas pontuações no interior das células dos tecidos radiculares. Em 'Prata Anã' e 'Maçã', a mesma característica foi visualizada nos tratamentos *Bacillus* e *Trichoderma* com 17 dias após a aplicação desses microrganismos. *Bacillus* sp. e *T. asperellum* induziram positivamente a expressão dos genes relacionados às respostas de defesa das plantas, com expressão diferencial em relação ao controle sem inoculação e ao tratamento inoculado apenas com Foc. Os tratamentos pré-inoculados com microrganismos benéficos, quando desafiados com Foc, apresentaram níveis de expressão mais elevados que os demais tratamentos. Em uma abordagem global analisada pelo Heatmap observou-se em 'BRS Princesa' que após o tratamento com os microrganismos benéficos, os genes CESA 7, KINLRR e AUXPL-1 apresentaram maiores níveis de expressão positiva. Enquanto em 'Prata Anã' os genes melhores induzidos foram SRCFUN, STRANS e PER 64. Os resultados desse trabalho mostraram que o isolado de *Bacillus* sp. e *T. asperellum* podem ser utilizados como promotores de crescimento e indutores de resistência em bananeira. O *T. asperellum* apresenta melhor eficácia para o uso no manejo integrado da murcha de fusarium, e *Bacillus* sp. maior potencial como indutor de resistência de bananeira ao Foc.

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

## INTERACTION GENOTYPE X BENEFICIAL MICROORGANISMS AND INDUCING RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense IN BANANA TREE

**ABSTRACT:** The banana tree (*Musa* spp.) it is considered as one of the most important agricultural crops 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 banana tree. The use of fungicides to combat Foc, in addition to not being efficient, can compromise the natural balance of the soil. One form of management studied is biological control, carried out by the application of beneficial microorganisms, which, when interacting with the plant, can induce the activation of its defense system, generating a response that may serve as an aid in combating the pathogen. For this reason, studies that aim to understand the expression patterns of the genes involved with the induction of resistance to Foc, are important, as they identify initial defense responses of the plant. Thus, this work was developed in order 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 in the levels of expression of genes related to the defense responses in the cultivars 'BRS Princesa' (tolerant) and 'Prata Anã' (susceptible). The beneficial microorganisms were efficient in promoting plant growth. In 'BRS Princesa' and 'Apple', significant differences were noted in the height of seedlings treated with *Bacillus* sp. and *T. asperellum* at all times of evaluation. In the 'Prata Anã' plants significant differences were observed mainly in relation to the treatments that were applied to the beneficial microorganisms and inoculated with Foc. Colonization of Foc was observed in the root tissues of 'BRS Princesa' with 10 DAI, only in the Foc treatment. In 'Prata Anã', chlamydospores and hyphae were seen in all treatments inoculated with Foc since 10 DAI. In the 'BRS Princesa' genotype 10 days after the treatment with *Bacillus* + Foc, small punctuations were observed inside the cells of the root tissue. In 'Prata Anã' and 'Apple', the same characteristic was seen in the treatments *Bacillus* and *Trichoderma* with 17 days after the application of these microorganisms. *Bacillus* sp. and *T. asperellum* positively induced the expression of genes related to plant defense responses, with differential expression in relation to the control without inoculation and the treatment inoculated only with Foc. Pre-inoculated treatments with beneficial microorganisms, when challenged with Foc, showed higher levels of expression than the other treatments. In a global approach analyzed by Heatmap it was observed in 'BRS Princesa' that after treatment with beneficial microorganisms, the genes CESA 7, KINLRR and AUXPL-1 showed higher levels of positive expression. While in 'Prata Anã' the best induced genes were SRCFUN, STRANS and PER 64. The results of this work showed that the isolate of *Bacillus* sp. and *T. asperellum* can be used as growth promoters and resistance inducers in banana. *T. asperellum* is more effective for use in the integrated management of fusarium wilt, and *Bacillus* sp. greater potential as an inducer of banana resistance to Foc.

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



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	9
1.1 Potencial agronômico da bananeira .....	9
1.2 Murcha de fusarium em bananeira .....	10
1.3 Indução de resistência de planta a patógenos por meio do Biocontrole .....	11
1.4 <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp. como agentes indutores de resistência de planta a fitopatógeno.....	14
1.5 Análise de expressão gênica na interação <i>Musa</i> x microrganismos .....	16
REFERÊNCIAS.....	18
INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS BENÉFICOS E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A <i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i> EM BANANEIRA .....	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
2.1 Material vegetal e microbiano .....	27
2.2 Preparo dos inóculos. ....	27
2.3 Delineamento experimental e montagem do experimento em casa de vegetação. ....	28
2.4 Avaliação do crescimento das plantas .....	29
2.5 Análises histológicas .....	29
2.5.1 Clarificação e coloração das raízes .....	29
2.6 Extração de RNA total.....	29
2.7 Avaliação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) .....	30
2.7.1 Seleção dos iniciadores .....	30
2.7.2 Tratamento com DNase.....	30
2.7.3 Síntese de cDNA .....	30
2.7.4 Análise dos iniciadores por RT-PCR.....	31
2.7.5 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) .....	31
2.8. Análise dos dados .....	32
3. RESULTADOS .....	32
3.1 Potencial de <i>Bacillus</i> sp. e <i>Trichoderma asperellum</i> na promoção de crescimento de bananeira sem e com a presença do Foc. ....	32
3.2 Histopatologia (clareamento de raiz) .....	34
3.3 Análise de expressão gênica .....	37
4. DISCUSSÃO .....	42
5. CONCLUSÕES .....	47
REFERÊNCIAS .....	47
ANEXOS.....	53

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Potencial agrônômico da bananeira.

A bananicultura é uma atividade agrícola que exerce 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).

De acordo com dados coletados pelo IBGE (2019) o cultivo da bananeira ocupou, em 2019, uma área de aproximadamente 491 mil hectares e produziu cerca de 7,2 milhões de toneladas de frutos 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 o estado da Bahia, com uma produção de 1,040 milhões de toneladas, e em terceiro lugar Minas Gerais com a produção de 0,814 milhões de toneladas. No comércio brasileiro os variados tipos de bananas diferem com relação à forma como é consumida e 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)

A banana '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 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Em 2008 a Embrapa lançou o híbrido 'BRS Princesa' (tipo Maçã, tetraploide AAAB), que é uma planta de porte médio alto, oriunda do cruzamento entre a cultivar Yangambi nº 2 com o híbrido diploide M53 (AA). Seu fruto tem o sabor e a morfologia externa parecidos com os da banana Maçã, em relação às doenças fúngicas a 'BRS Princesa' é uma cultivar resistente à Sigatoka amarela, tolerante à murcha de fusarium e suscetível à Sigatoka negra. A 'Prata Anã' (tipo Prata, triploide AAB) é uma cultivar com bom potencial em produtividade e bem conhecida no mercado brasileiro, porém seu cultivo também pode ser limitado por sua suscetibilidade às Sigatokas negra e amarela e à murcha de fusarium (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, além da murcha de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (CORDEIRO, MATOS & HADDAD, 2016).

As doenças fúngicas, estão entre as mais importantes na cultura da bananeira, constituindo os principais problemas fitopatológicos, geralmente afetando os seus ciclos vegetativos, reprodutivos e em diversos órgãos como raiz, pseudocaule, 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 a 'Maçã' (CORDEIRO, MATOS & MEISSNER FILHO, 2004; PLOETZ, 1994, 2006b).

## 1.2 Murcha de fusarium em bananeira

Murcha 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, por meio de clamidósporos, que são estruturas de resistência capazes de permanecerem viáveis no solo por aproximadamente 30 anos (STOVER, 1962; BUDDENHAGEN, 2009).

A murcha 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 destruição em diversas culturas de importância agrônômica (PÉREZ-VICENTE, 2004). Os primeiros danos relevantes na bananicultura, ocasionados pela murcha 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 murcha de fusarium aumentou 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 murcha de fusarium foi observada pela primeira vez em 1930, em Piracicaba, estado de São Paulo, e após cerca de quatro anos da sua constatação no país, foi capaz de dizimar em torno de um milhão de plantas da cultivar 'Maçã', causando sérios prejuízos 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 aos exsudatos radiculares liberados pela planta (LI et al., 2011). Após a germinação dos conídios, as hifas colonizam a superfície da raiz, aderem e crescem nas junções entre as células da epiderme e o micélio, avança intracelularmente através do córtex e alcançam os vasos do xilema, onde o fungo permanece produzindo toxinas e microconídios, 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). 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, incluindo a produção de tiloses, gomas e encolhimento dos vasos devido ao crescimento de células companheiras parenquimática (PÉREZ-VICENTE & DITA, 2014). As plantas 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 se quebram junto 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).

*F. oxysporum* f. sp. cubense pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Hypocreales e a família Nectriaceae (STOVER, 1962). O gênero *Fusarium* apresenta um elevado número de espécies associadas a plantas, com potencial para causar danos econômicos e reduzir a qualidade da cultura agrícola (LI et al., 2013). As linhagens que causam doenças em plantas são divididas em formaes 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* é composta 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, mais recentemente, na Colômbia, 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 resistentes que substituam as bananeiras do subgrupo Cavendish (PLOETZ, 2006a; BUDDENHAGEN, 2009; GALVIS, 2019).

Sendo uma doença causada por um fungo de solo, a murcha de fusarium é de difícil controle (SUM et al., 2014). 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, sem obter pleno sucesso no controle do fitopatógeno, no entanto o insucesso das estratégias pode ser devido a capacidade que o Foc apresenta de sobreviver, mesmo na ausência de seu hospedeiro. Desse modo, o emprego de microrganismos que protejam e promovam o crescimento vegetal, colonizando a rizosfera das plantas, tem sido uma abordagem com potencial para o manejo da murcha de fusarium em bananeira (PUSHPAVATHI et al., 2016).

### **1.3 Indução de resistência de planta a patógenos por meio do Biocontrole**

A resistência genética do hospedeiro é a forma mais eficaz 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 pela murcha de fusarium (DITA et al., 2011; BUBIC et al., 2019). O desenvolvimento de cultivares resistentes promovem resultados positivos na luta contra o Foc, porém é uma técnica que depende tempo, 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 à busca por diferentes alternativas de

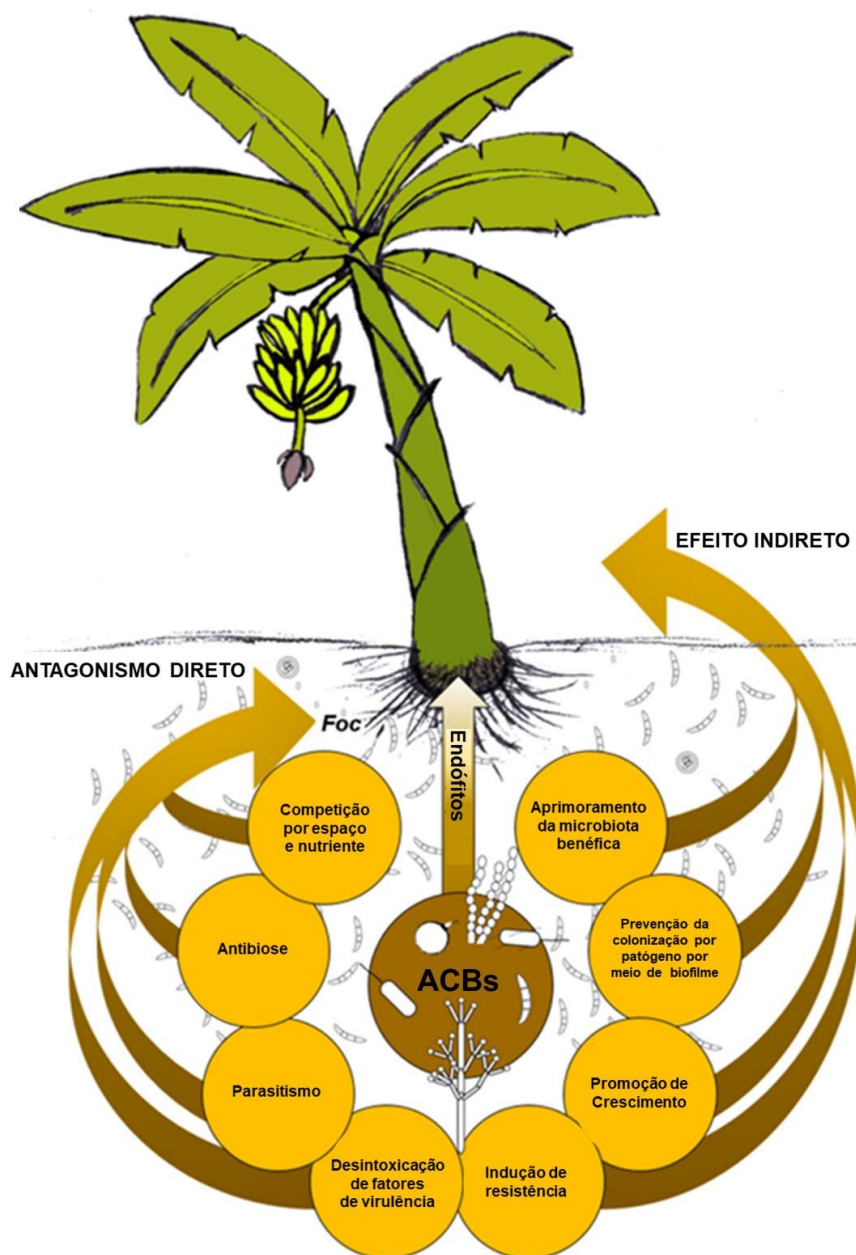
controle já existentes, como métodos culturais, químicos e utilização de agentes biocontroladores. Essa última, vem chamando a atenção da comunidade científica por ser uma técnica de baixo custo e fácil manejo, onde dentre outros mecanismos de ação, os microrganismos benéficos são capazes de induzir 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 (EILENBERG, HAJEK & LOMER, 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 vegetal, aprimoramento na microbiota benéfica do solo e indução de resistência local e sistêmica da planta, os quais atuam na redução da infecção ou doença. Ambos os mecanismos de ação podem ser observados na figura 1 (BUBIC et al., 2019).

De acordo com estudos, há um elevado potencial para utilização dos microrganismos benéficos como indutores de resistência sistêmica em plantas a patógeno, a qual pode ser expressa por meio de mecanismos de defesa 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 a produção de proteínas relacionadas à 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, os quais a defesa inata vegetal é potencializada contra desafios bióticos ou abióticos (CARVALHO, 2012; PASCHOLATI, SOUZA & CARDOSO FILHO, 2019).

Existem duas formas de resistência induzida de plantas a 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 elicitador, quanto pelas vias de sinalização envolvidas (BARROS et al., 2010). A RSA é mediada pelo ácido salicílico e, geralmente, está relacionada à 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 reguladores de crescimento vegetal 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 de defesa 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 é desencadeada quando moléculas do agente microbiano, 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).



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

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 proteínas PR e a acumulação de fitormônios (como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno), são considerados

protagonistas principais da resposta imune, cujo sinal se transmite sistemicamente pela planta (MONTE, BETTIOL & HERMOSA, 2019).

Dentre os microrganismos com potencial para o controle biológico de doenças de plantas, algumas bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os mais utilizados (HAMAN et al., 2004; HADIWIYONO & WIDONO, 2012; MULAW et al., 2013; KHAN, MAYMON & HIRSCH, 2017; JOGAIAH et al., 2018;). Esses microrganismos podem colonizar plantas de diversas espécies botânicas, inclusive cultivares agronômicas, beneficiando o desenvolvimento e produção dessas culturas pela supressão do solo no controle de fitopatógenos, promoção de crescimento da planta e na indução de resistência do vegetal a estresses 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 indutores de resistência de planta a fitopatógeno.**

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

O gênero *Trichoderma* pertence à classe Sordariomycetes, do filo Ascomycota (ABREU & PFENNING, 2019). São fungos de vida livre, simbioses 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. 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 inerente a este gênero inibem o 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 por meio da antibiose (ZEILINGER et al., 2016) 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, em que, nesse momento um número relativamente elevado 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, sendo eles proteínas com funções enzimáticas, oligossacarídeos e outros compostos de baixo peso molecular (HARMAN et al., 2004; HARMAN, 2011). Estabelecida a interação benéfica entre o fungo e a planta, a sinalização desencadeada induz as respostas de defesa com efeitos sistêmicos, 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 elicitor de *Trichoderma viride*. Esse estudo mostrou uma resposta do tipo hipersensível caracterizada 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 simbionte 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 impedir o ataque de microrganismos, 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 de tolerar o estresse oxidativo. Algumas cepas de *Trichoderma* spp. podem tolerar maiores níveis de ROS quando comparadas 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., 2014b). 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*, pertencente 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 permitem sobreviver no ambiente sob condições desfavoráveis por um longo período (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 seu potencial em promover o crescimento de plantas e antagonismo direto e indireto a fitopatógenos. Estas bactérias colonizam e estabelecem uma interação acentuada com as raízes, aumentando a captação de nutrientes, pela 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 ação, 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 o sistema de defesa vegetal (CAWOY et al., 2014b.; ALOO, MAKUMBA & MBEGA, 2018).

Segundo estudos, as espécies de *Bacillus* podem induzir a planta a um amplo espectro de resistência a diferentes fitopatógenos bacterianos e fúngicos mediante ativação da RSI, para isso uma variedade de elicitores são emitidos pelas bactérias e percebidos 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 é altamente desejável, pois é duradouro e confere proteção as 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 (metil carbinol acetil) (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., 2014a; GOND et al., 2014).

O papel dos voláteis microbianos na indução da RSI foi investigado por Ryu et al. (2004) em um experimento em que 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* foi significativamente menor em comparação ao 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 na indução de resistência das plantas. A redução de doenças induzidas pela surfactina foi associada a fatores relacionados às 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., 2014b.).

### **1.5 Análise de expressão gênica na interação *Musa* x microrganismos**

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, dentre as quais se destaca, 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). Vários genes associados a resposta de defesa da bananeira a fitopatógeno já foram identificados por meio da análise de perfil de transcritos diferencialmente expressos, Li et al., (2012) utilizando esse tipo de análise, descobriram que o reconhecimento de PAMPs podem contribuir para a resistência da bananeira ao Foc.

A análise dos níveis de transcrição de genes de bananeira relacionados a resposta de defesa a fitopatógenos também foram importantes para os estudos de Li et al (2015), possibilitando-os a sugerir que a antioxidação, modificação da parede celular e síntese de proteínas antifúngicas são os aspectos mais importantes a serem estudados para se entender o mecanismo de resistência de bananeiras comerciais ao Foc. Em outro trabalho desenvolvido por Papanu et al, (2007) a análise de expressão de oito genes de bananeira envolvidos na resposta de defesa ao Foc, por meio de ensaio em qPCR, foi importante para perceber que a colonização por endófitos das raízes de cultivar tolerante induziu a expressão transitória de peroxidase e suprimiu a expressão de PR-3, lectina, Pectina acetilsterase, Fenilalanina amônia-liase e PIR7, sendo este o primeiro relato da expressão gênica relacionada à defesa induzida por endófitos na banana.

Mediante a tantos outros resultados, 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 das plantas 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 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

- ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. O gênero *Trichoderma*. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M. SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**, Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- 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.
- 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**, Uberlandia, 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, 2014a.

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, 2014b.

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.

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.; STAVER, 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, S. Colombia confirms that dreaded fungus has hit its 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 defense 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.; CHEN, S.; ZUO, C.; SUN, Q.; YE, Q.; YI, G.; HUANG, B. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, p. 327-340, 2011.
- LI, C. Y.; DENG, G. M.; YANG, J.; VILJOEN, A.; JIN, Y.; KUANG, R. B.; ZUO, C. W.; LV, Z. C.; YANG, Q. S.; SHENG, O.; WEI, Y. R.; HU, C. H.; DONG, T.; YI, G. J. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 1-11, 2012
- LI, W.; GE, X.; WU, W.; WANG, W.; HU, Y.; MO, Y.; SUN, D.; SHI, S.; XIE, J. Identification of defense-related genes in banana roots infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. **Euphytica**, Heidelberg, v. 205, p. 837-849, 2015
- 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.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> 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.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.16, p. 115-125.

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

PAPARU, P.; DUBOIS, T.; COYNE, D.; VILJOEN, A. Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 71, p. 149-157, 2007.

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 Acorbat**, 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, 2006a.

PLOETZ, R. C. Fusarium-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, 2006b.

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, 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.



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.

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.

**INTERAÇÃO GENÓTIPO X MICRORGANISMOS BENÉFICOS E 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 para estimular a 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; LICHTEMBERG & LICHTEMBERG, 2011).

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 pra diversas famílias (SILVA & CORDEIRO, 2000; BROWN et al., 2017). 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, de acordo com os dados coletados pelo IBGE (2019) 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.

Algumas situações se estabelecem como ameaça, impossibilitando a produção e o desempenho da bananicultura, como a ocorrência de pragas e doenças provocadas por fungos, nematoides e outros agentes patogênico (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 a Maçã. Foc é um fungo de solo que usa o sistema radicular como porta de entrada para infectar a planta, migra até o xilema, obstrui o sistema condutor de água, induz a murcha e mata a planta. Uma vez presente no solo, o patógeno pode sobreviver por 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).

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

Ao interagir com a planta, os agentes de biocontrole, podem também induzir a ativação do seu sistema de defesa, gerando resposta instantânea que servirá como uma barreira no combate ao patógeno. Fungos do gênero *Trichoderma* e algumas

bactérias do gênero *Bacillus* são importantes alternativas para o manejo da fusariose em bananeira. Estes, podem induzir a resistência da planta estimulando o acúmulo de enzimas relacionadas a defesa, antes mesmo do ataque do patógeno, então o agente patogênico pode ser repellido 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 microrganismos benéficos podem ser importantes aliados 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 Foc, analisando a influência desses microrganismos na promoção de crescimento e nos níveis de expressão de genes relacionados às respostas de defesa em genótipos contrastantes de bananeira. Os resultados obtidos nesse estudo podem contribuir para o manejo integrado da murcha de fusarium e na triagem de microrganismos benéficos com potencial para atuar como indutores de resistência ao Foc nessa cultura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e microbiano

Para realização do presente trabalho, foram utilizadas 600 mudas de bananeira micropropagadas *in vitro*, de genótipos contrastantes para a resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (raça 1), sendo estas, 200 mudas da cultivar 'BRS Princesa' (tolerante), 200 mudas de 'Prata-Anã' (suscetível) e 200 mudas de 'Maçã' (altamente suscetível). As mudas foram aclimatadas e transferidas para recipientes de 2 litros contendo substrato de fibras de coco. Ao completarem aproximadamente 15 cm de altura as plantas foram tratadas com a suspensão microbiana por meio da infestação do substrato.

Foram utilizados dois microrganismos benéficos (*Trichoderma asperellum* e *Bacillus* sp.) e o patógeno (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, isolado 218A, raça 1). O isolado "218A" foi extraído de bananeira "Grande Naine" provenientes do estado de São Paulo, foi identificado por meio de caracteres morfológicos e caracterização molecular a partir do sequenciamento do gene do fator de alongação 1 $\alpha$ . Os três microrganismos fazem parte da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA.

### 2.2 Preparo dos inóculos.

Foram preparados três inóculos separadamente, dois com os microrganismos benéficos (*Trichoderma asperellum* e *Bacillus* sp.) e um com o patógeno (*Fusarium*

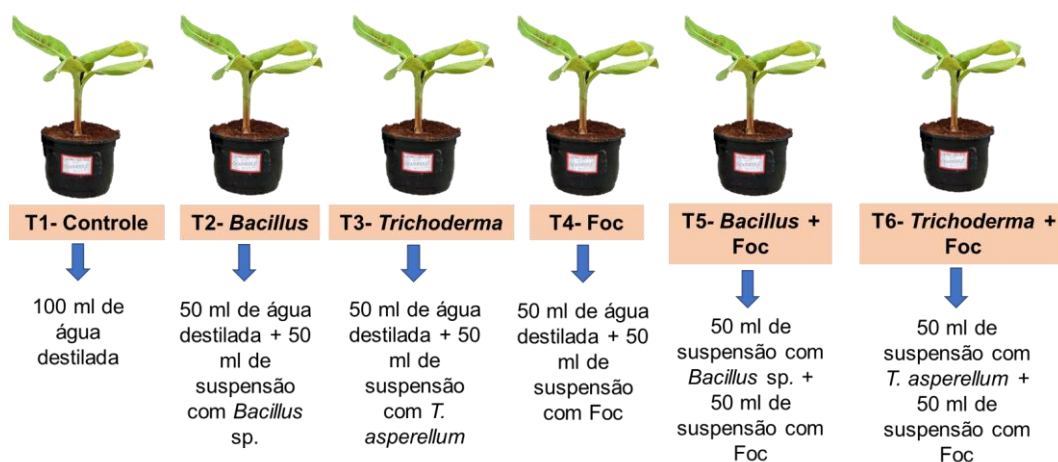
*oxysporum* f. sp. cubense, isolado 218A, raça 1). Os isolados fúngicos foram crescidos em meio de cultura BDA (200 g L<sup>-1</sup> batata; 20 g L<sup>-1</sup> dextrose e 20 g L<sup>-1</sup> ágar), onde foram repicados e incubados em BOD por sete dias a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. O isolado bacteriano foi cultivado em meio 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 crescimento, 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 durante 15 dias. Para o preparo da suspensão utilizada na infestação do substrato, o inóculo fúngico foi quantificado pela 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/g<sup>-1</sup> 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 absorbância de UFC das bactérias foi analisada por espectrofotometria e diluída até 10<sup>6</sup> UFC/mL<sup>-1</sup>.

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

O experimento foi montado em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos sendo estes nomeados de T1 – controle; T2 – *Bacillus*; T3 – *Trichoderma*; T4 – Foc; T5 – *Bacillus* + Foc; e T6 – *Trichoderma* + Foc, contendo 32 plantas por tratamentos. A inoculação aconteceu em dois dias consecutivos, no primeiro dia foi aplicado os microrganismos benéficos e após 24 horas foi inoculado o Foc, como representado na figura (Figura 1).



**Figura 1.** Inoculação de Foc e tratamento com *Trichoderma* e *Bacillus* sp.. T1 - controle; T2 – *Bacillus*, aplicado no primeiro dia; T3 - *Trichoderma*, aplicado no primeiro dia; T4 – Foc, inoculado no segundo dia; T5 – *Bacillus*, aplicado no primeiro dia + Foc inoculado no segundo dia; e T6 – *Trichoderma*, aplicado no primeiro dia + Foc inoculado no segundo dia.

## 2.4 Avaliação do crescimento das plantas

A quantificação 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 avaliação da altura foi realizada iniciando pela base do pseudocaule até a inserção da folha vela, e a espessura foi medida 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; álcool etílico absoluto: ácido acético glacial) por 24 horas. Em seguida foram conservados em álcool etílico 70%. A avaliação da colonização do Foc nos tecidos do hospedeiro se deu pelo 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: ácido láctico: glicerina; água) em temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, o corante foi descartado e as raízes imersas em solução de lactoglicerol (2:1:1; 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 em 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.

### 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.

**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: GTACTGCTTCTCGTGACCC	80
GSMUA_Achr10T07820_001	Sinalização por reconhecimento de peptídeo da parede celular de fungos	F: AGATCGTCGCCCAAGTG R: GCCGGCGGCATCAAG	140

GSMUA_Achr3T09360_001	Transdução de sinais	F: CAACCTCCCCCATCAATGG R: TTGCTGCGCGCTGTGT	128
GSMUA_Achr6T33720_001	Domínios kinase, LRR, interação protein - proteína	F: CGGTCGGTGCCATTGG 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 de 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) - transporte de auxina. \*Genes de referência.

#### 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 Mixer (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).

## 2.8. Análise dos dados

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

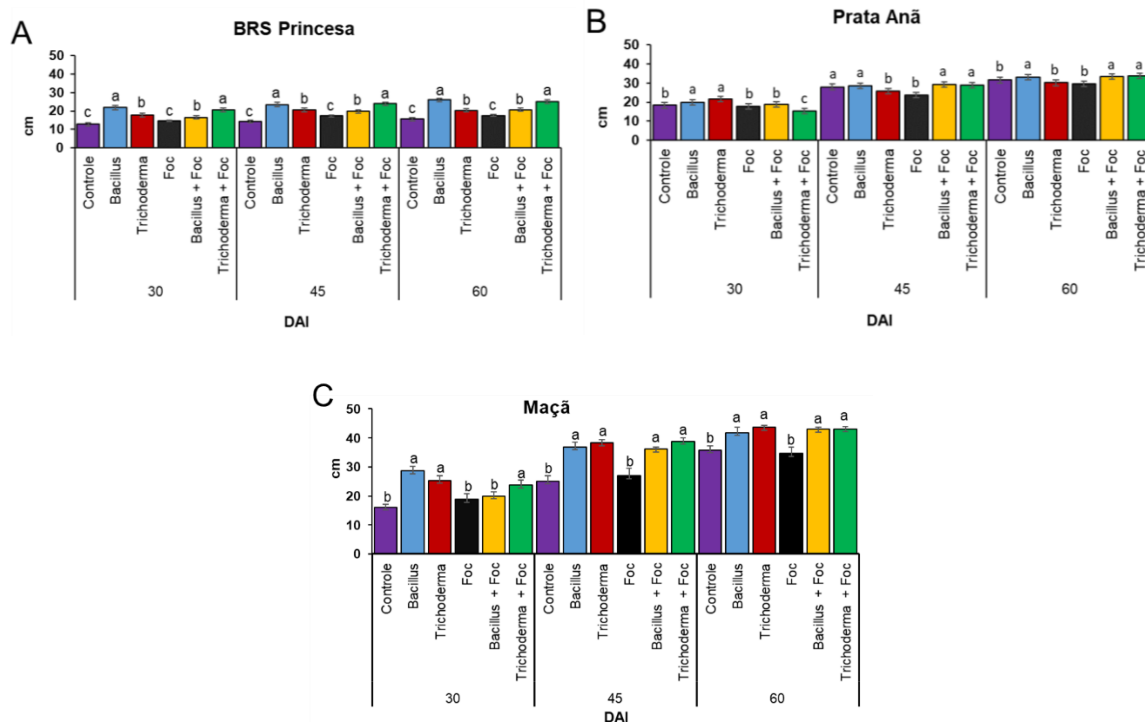
Para a análise da quantificação relativa de expressão gênica foi utilizado o Microsoft Excel empregando o método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  proposto por Livak e Schmittgen, (2001). Os Heatmaps com dendrogramas correspondentes foram baseados em um agrupamento de ligação completo pelo método de distância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

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Potencial de *Bacillus sp.* e *Trichoderma asperellum* na promoção de crescimento de bananeira sem e com a presença do Foc.

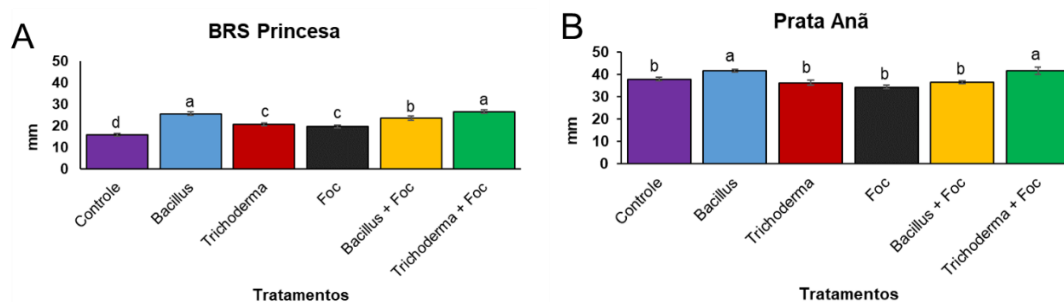
Os microrganismos benéficos mostraram-se eficientes na promoção do crescimento das plantas quando avaliados os parâmetros de altura e diâmetro do pseudocaule. Os valores médios para os tratamentos foram significantes pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), evidenciando o potencial efetivo desses agentes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

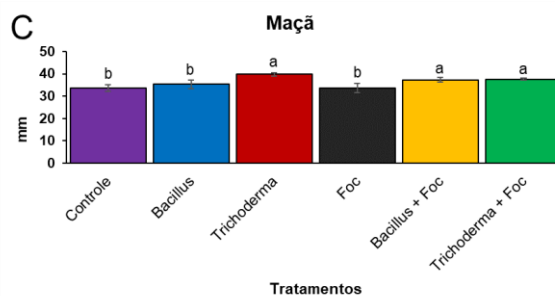
Para as plantas de ‘BRS Princesa’ (Figura 2A) foram observadas diferenças significantes na altura das mudas tratadas com *Bacillus sp.* e *Trichoderma asperellum* em todos os tempos de avaliação, sendo que os tratamentos *Bacillus* e *Trichoderma* + Foc se destacaram em relação aos demais. A cultivar ‘Maçã’ (Figura 2C) apresentou melhor crescimento em relação às outras cultivares, e a altura das plantas tratadas com os microrganismos benéficos foram 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 médias das alturas dos tratamentos com os microrganismos benéficos não se diferiram do tratamento controle como nos outros genótipos, no entanto, foram observadas diferenças em todos os tempos de avaliação nos níveis de significância, entre os tratamentos com *Bacillus sp.* e *T. asperellum* em relação ao tratamento Foc.



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

Com 60 dias após o tratamento com *Bacillus* sp. e *T. asperellum* (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. asperellum* aumentou o diâmetro do pseudocaule nos tratamentos com e sem a presença do Foc enquanto nos tratamentos com *Bacillus* sp. só notou essa diferença em relação ao controle no tratamento *Bacillus* + Foc. Em 'Prata Anã' (Figura 3B) os tratamentos que apresentaram maior espessura do pseudocaule foram *Bacillus* e *Trichoderma* + Foc.



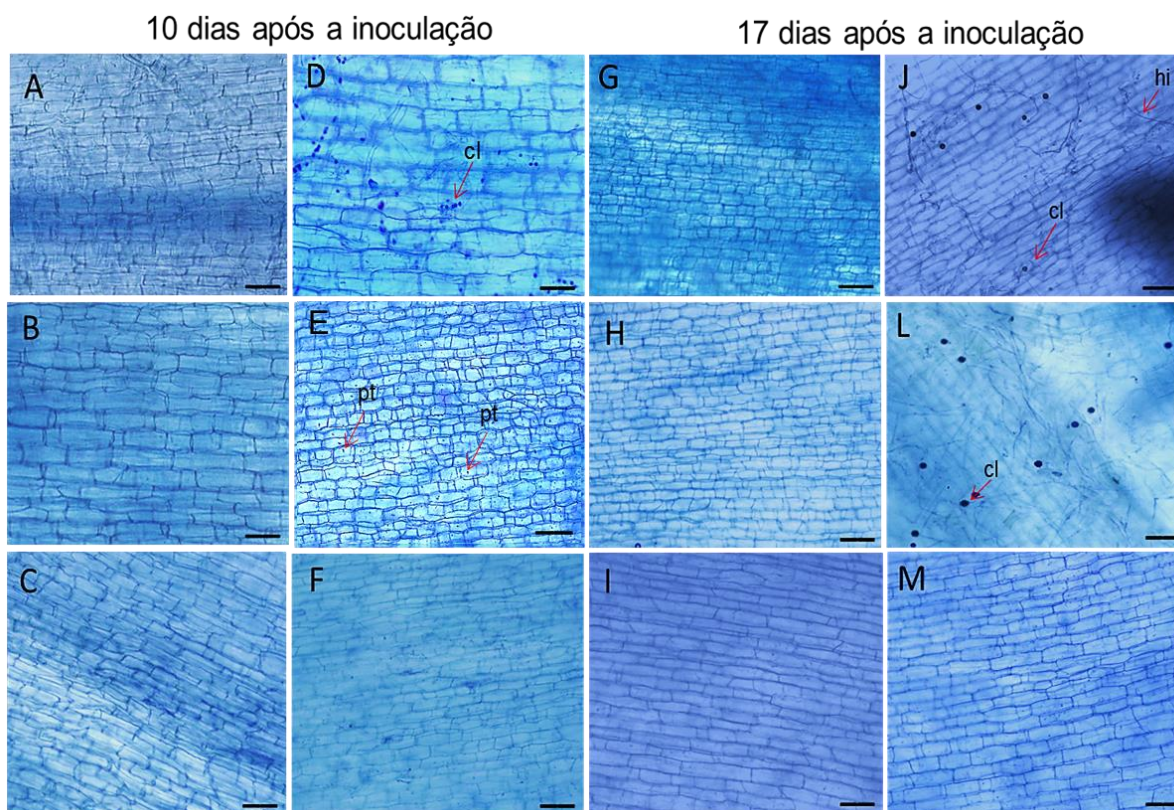


**Figura 3.** Influência de *Bacillus* sp. e *Trichoderma asperellum* na espessura do pseudocaule (mm) das cultivares (A) 'BRS Princesa', (B) 'Prata Anã' e (C) 'Maçã' desafiadas com Foc em 60 dias após a inoculação, em casa de vegetação. Letras minúsculas repetidas nas barras não se diferem estatisticamente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

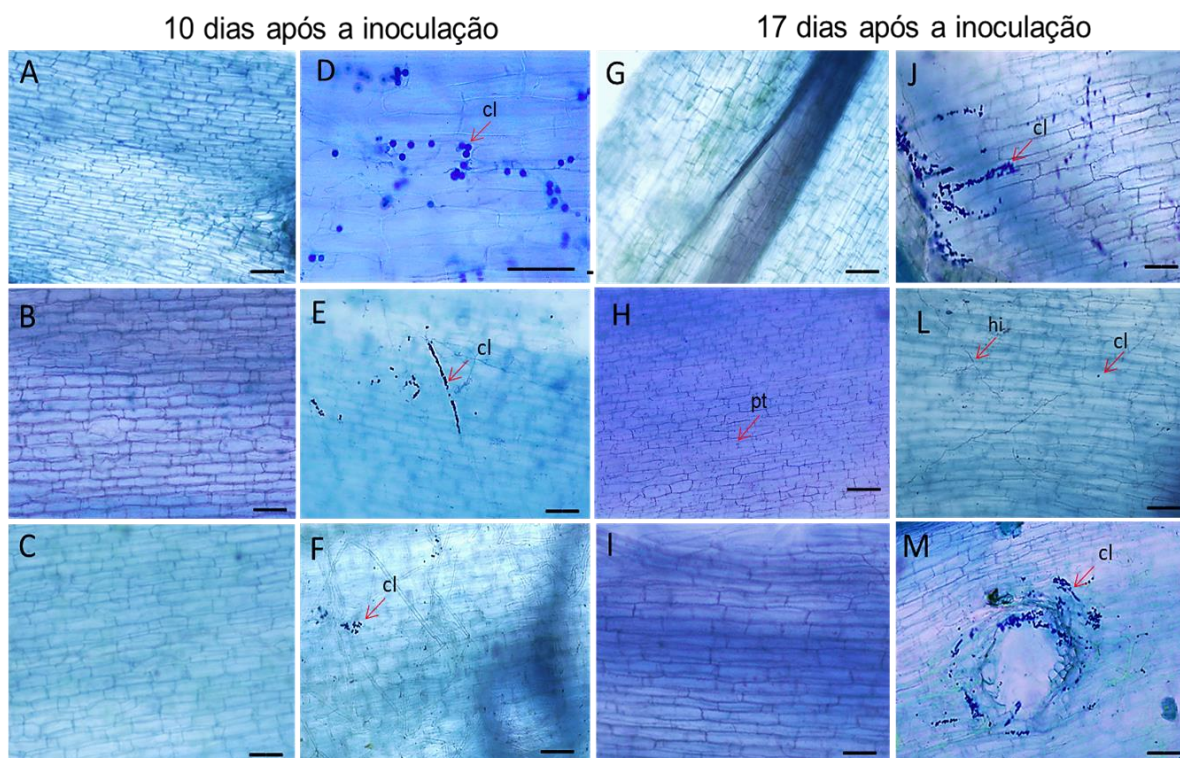
### 3.2 Histopatologia (clareamento de raiz)

Para o estudo histopatológico, foram aplicadas as técnicas de clareamento de raízes e coloração com azul de tripan nos genótipos 'BRS Princesa', 'Prata Anã' e 'Maçã'. 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 clamidósporos apenas no tratamento Foc e com 17 DAI essas estruturas fúngicas também foram observadas no tratamento *Bacillus* + Foc. No genótipo 'Prata Anã' e 'Maçã' (Figura 5 e 6) foi observado a presença de clamidósporos e algumas vezes hifas em todos os tratamentos inoculados com patógeno desde o décimo dia após a inoculação.

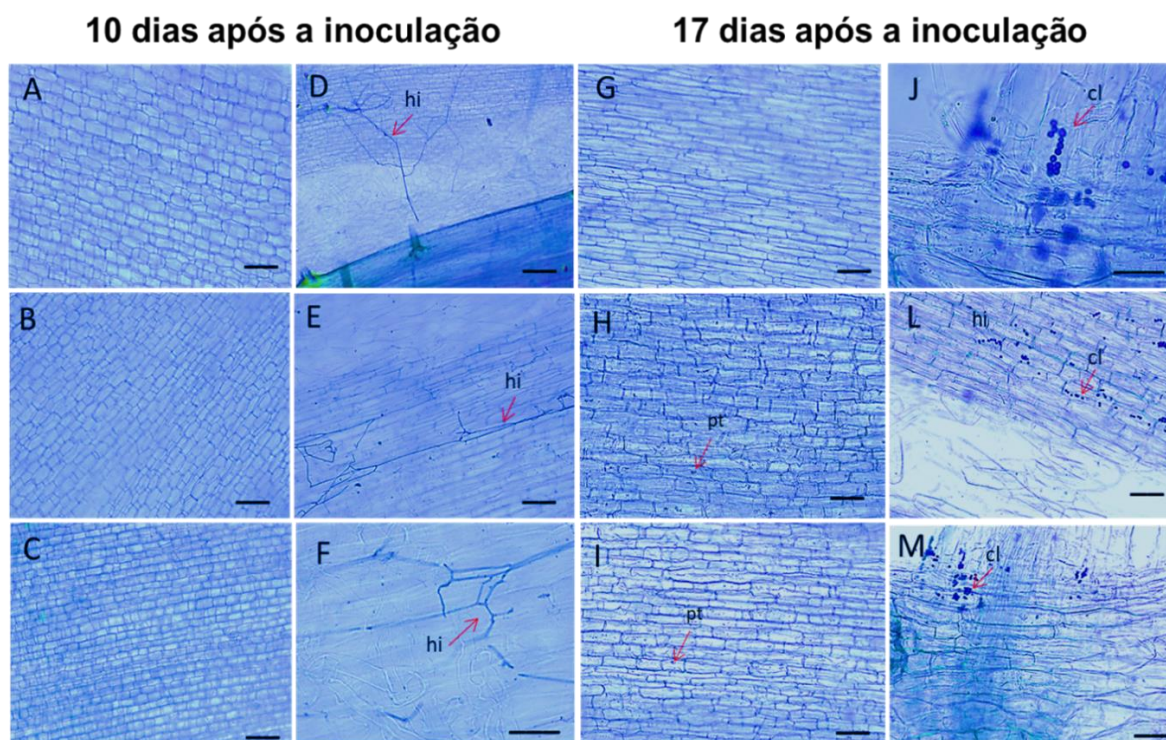
No genótipo 'BRS Princesa', com 10 dias após o tratamento com *Bacillus* sp., foi observada a presença de pequenas pontuações no interior das células no tratamento *Bacillus* + Foc. No genótipo 'Prata Anã' e 'Maçã', a mesma característica foi visualizada no tratamento *Bacillus* com 17 dias após a aplicação desse microrganismo. Em 'Maçã' pequenas pontuação também foi observado com 17 dias após a aplicação do *T. asperellum*.



**Figura 4.** Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raízes de bananeira ‘BRS Princesa’ com 10 e 17 DAI. Tratamentos A e G- controle não inoculado; B e H- tratado por *Bacillus*; C e I- tratado por *Trichoderma*; D e J- inoculado por Foc com visualização de clamidósporos com 10 DAI e clamidósporos e hifas com 17 DAI; E e L- tratado por *Bacillus* + Foc com visualização de clamidósporos com 17 DAI; F e M- tratado por *Trichoderma* + Foc não foi visualizado estruturas fúngicas. FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. DAI: Dias após a inoculação. As setas indicam estruturas fúngicas como, hi: hifa; cl: clamidósporo e elevações no interior das células, pt: pontuações desconhecidas. Barras: 200  $\mu$ m;



**Figura 5.** Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raiz de banana 'Prata Anã' com 10 e 17 DAI. Tratamentos A e G- controle não inoculado; B e H- tratado por *Bacillus*; C e I- tratado por *Trichoderma*; D e J- inoculado por Foc com visualização de clamidósporos com 10 e 17 DAI; E e L- tratado por *Bacillus* + Foc com visualização de clamidósporos com 10 DAI e clamidósporos e hifas com 17 DAI; F e M- tratado por *Trichoderma* + Foc com visualização de clamidósporos com 10 e 17 DAI. FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. DAI: Dias após a inoculação. As setas indicam estruturas fúngicas como, hi: hifa; cl: clamidósporo e elevações no interior das células, pt: pontuações desconhecidas. Barras: A-C, E-M = 200  $\mu$ m; D= 50  $\mu$ m



**Figura 6.** Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raiz de bananeira 'Maçã' com 10 e 17 DAI. Tratamentos A e G- controle não inoculado; B e H- tratado por *Bacillus*; C e I- tratado por *Trichoderma*; D e J- inoculado por Foc com visualização de com 10 DAI e clamidósporos e hifas com 17 DAI; E e L- tratado por *Bacillus* + Foc com visualização de hifas com 10 DAI e clamidósporos e hifas com 17 DAI; F e M- tratado por *Trichoderma* + Foc com visualização de hifas com 10 DAI e clamidósporos com 17 DAI. FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. DAI: Dias após a inoculação. As setas indicam estruturas fúngicas como, hi: hifa; cl: clamidósporo e elevações no interior das células, pt: pontuações desconhecidas. Barras: A-E, G-I, L-M = 200  $\mu$ m; F, J= 50  $\mu$ m

### 3.3 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 (KINLRR, Kinase, LRR domains, protein-protein interaction), reações antioxidantes no processo de estresse oxidativo (PER 64, Peroxidase 64), transdução de sinais (STRANS, Signal transduction), sinalização e reconhecimento da parede celular do fungo (SRCFUN, Signaling by recognition of peptides in the cell wall of fungi), transporte de auxina (AUXPL-1, Auxin transporter-like protein 1), ação antifúngica (PRMS-1, Pathogenesis-related protein 1C) e fortalecimento da parede celular (CESA 7, Cellulose synthase A catalytic subunit 7) foram analisados via qPCR. Os valores de expressão gênica foram normalizados pelos genes de referência 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.

O tratamento 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 após o tratamento com os microrganismos benéficos, após a inoculação do 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, os maiores níveis 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, o maior nível de expressão de PER 64 nesse genótipo foi notado com 1 HAI do Foc nos tratamentos *Bacillus* + Foc e *Trichoderma* + Foc.

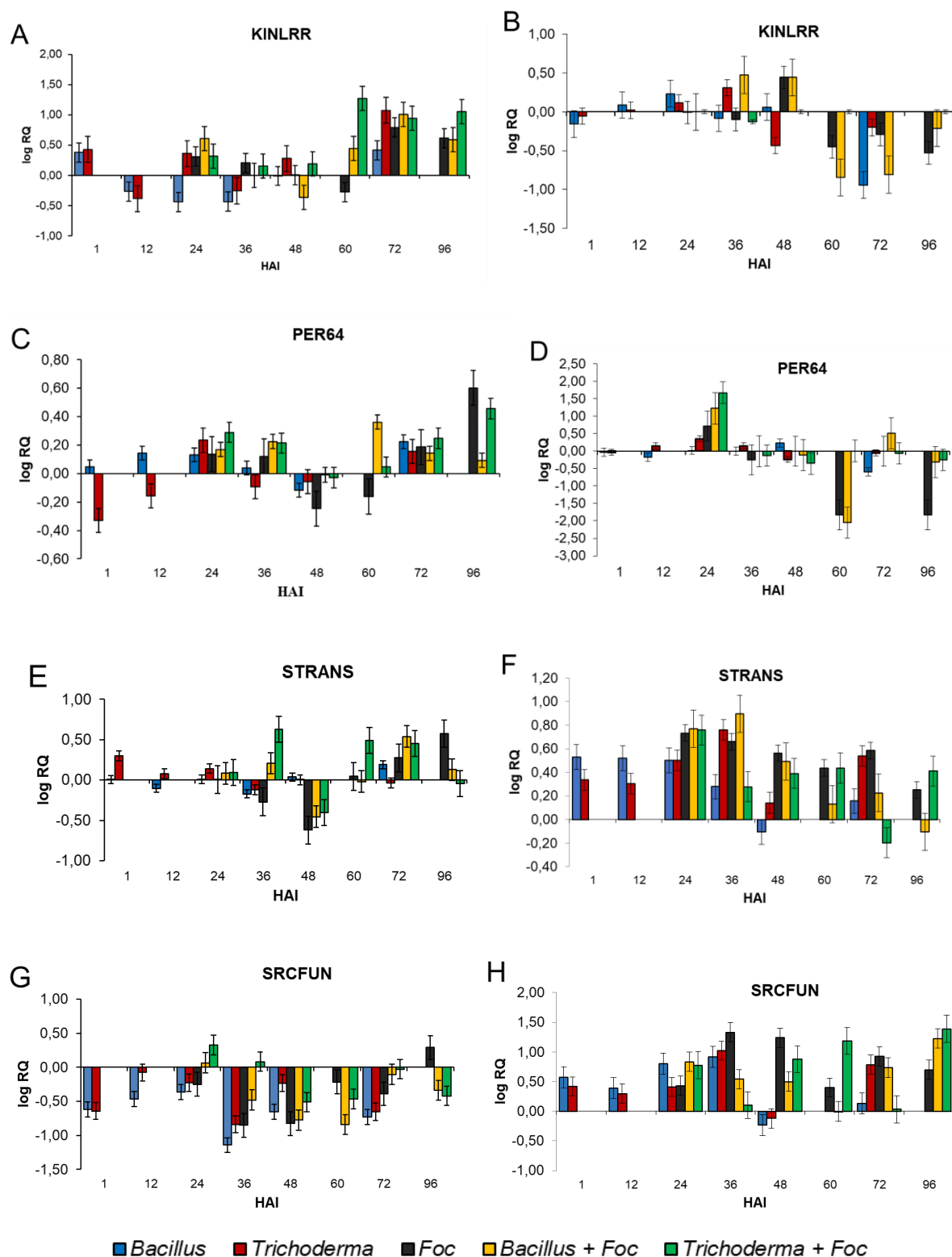
O gene STRANS (Figura 6E) apresentou uma regulação positiva na cultivar 'BRS Princesa' desde 1HAI no tratamento *Trichoderma*. Nos tratamentos inoculados com Foc e pré-inoculados com microrganismos benéficos foi notado os maiores níveis de expressão durante os tempos de avaliação. Em 'Prata Anã' (Figura 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.

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 SRCFUN 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 levemente induzido 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. Em 'Prata Anã' (Figura 7B) o maior nível de expressão de AUXPL-1 aconteceu a partir de 1HAI do Foc nos tratamentos *Bacillus* + Foc e *Trichoderma* + Foc.

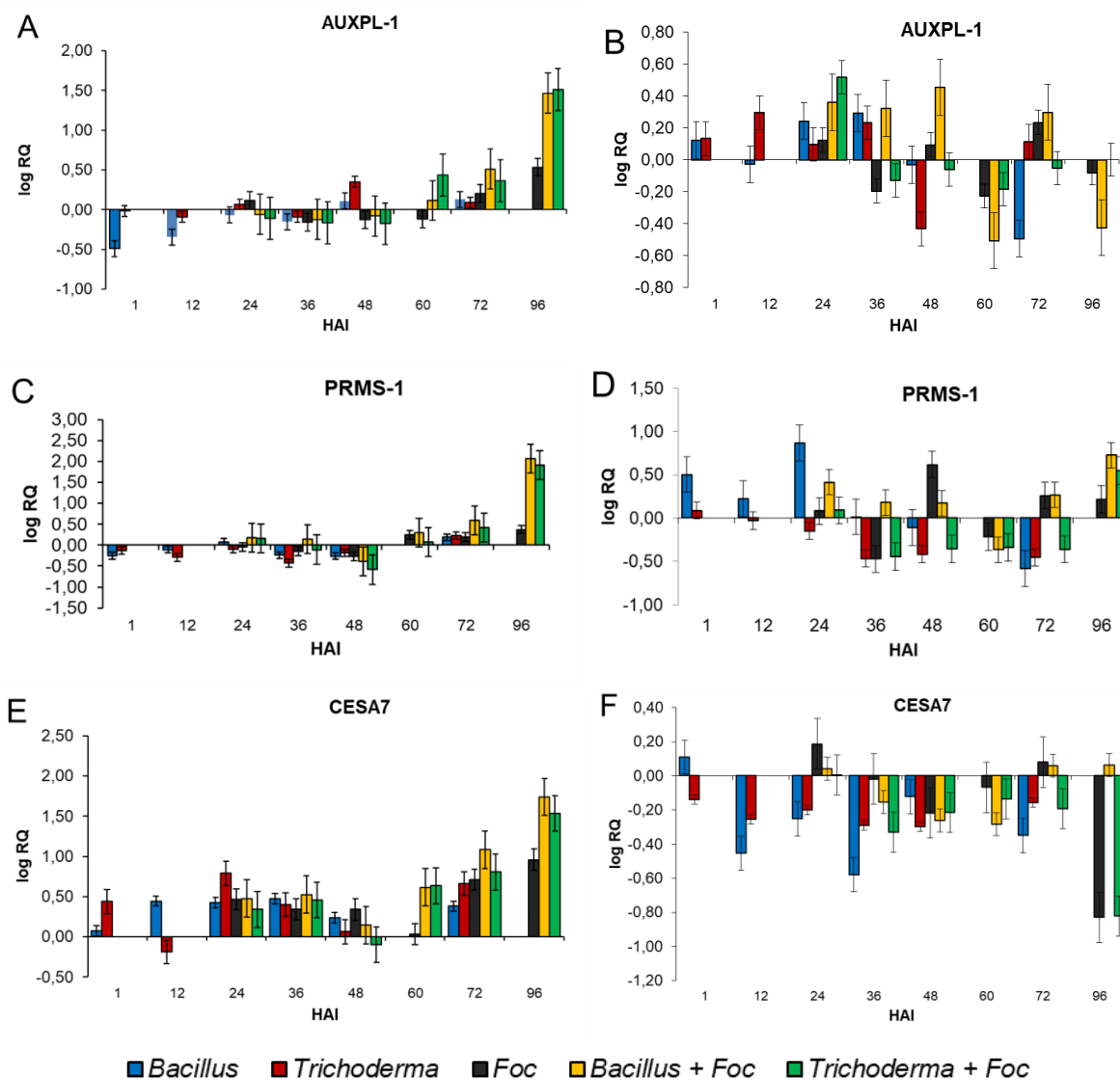
Em 'BRS Princesa' o gene PRMS-1 (Figura 7C) foi induzido com mais frequência nos tratamentos inoculados com Foc e pré-inoculado com *Bacillus* sp. e *T. asperellum*. No genótipo 'Prata Anã' (Figura 7D) esse gene apresentou melhores níveis de expressão nas plantas tratadas com *Bacillus* sp., principalmente no tratamento *Bacillus* + Foc.

Em 'BRS princesa' o gene CESA 7 (Figura 7E) foi induzido desde 1 hora após a aplicação dos microrganismos biocontroladores e permaneceu expresso em todos os tratamentos e por todos os tempos avaliados. Em 'Prata Anã' (Figura 7F) esse gene foi reprimido em praticamente todos os tempos de inoculação, dentre os microrganismos benéficos, apenas o *Bacillus* sp. foi capaz de induzir a expressão desse gene.



**Figura 7.** Perfil de expressão relativa dos genes em amostras de 'BRS Princesa' (A, C, E, G) e 'Prata Anã' (B, D, F, H) tratadas com *T. asperellum*, *Bacillus* sp. e inoculadas com *Foc* em relação ao controle não inoculado no tempo 0 h. (A e B) KINLRR (Kinase, LRR domínios, interação proteína-proteína), (C e D) PER 64 (*Peroxidase 64*), (E e F) STRANS (Sinal de transdução), (G e H) SRCFUN (Sinalização por reconhecimento de peptídeos na parede celular de fungos). As quantificações foram normalizadas utilizando o gene de referência 25S e Tubulina. *Foc*: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.



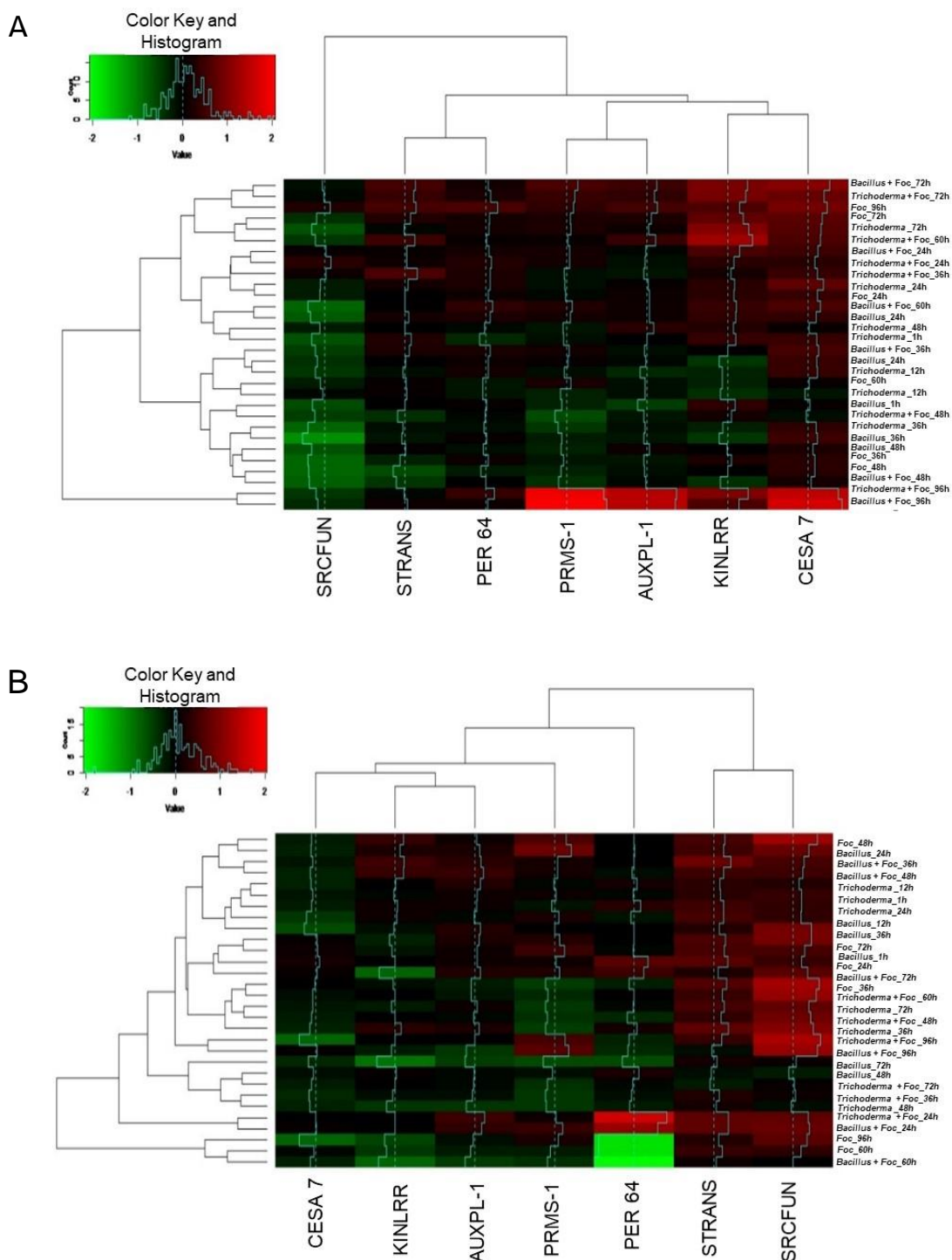


**Figura 8.** Perfil de expressão relativa dos genes em amostras de (A, C, E,) 'BRS Princesa' e (B, D, F) 'Prata Anã' tratadas com *T. asperellum*, *Bacillus* sp. e inoculadas com *Foc* em relação ao controle não inoculado no tempo 0 h. (A e B) AUXPL-1 (*Auxin transporter-like protein 1*), (C e D) PRMS-1 (Proteína relacionada à patogênese 1C) e (E e F) CESA 7 (Cellulose synthase A catalytic subunit 7). As quantificações foram normalizadas utilizando o gene de referência 25S e Tubulina. *Foc*: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.

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

De acordo com os perfis de expressão gênica, no genótipo 'BRS Princesa' (Figura 8A) os genes CESA 7, KINLRR, AUXPL-1 e PRMS-1 apresentaram maior

nível de expressão positiva. Enquanto no genótipo 'Prata Anã' (Figura 8B) os genes melhores induzidos foram SRCFJUN, STRANS e PER 64.



**Figura 9.** Heatmap dos perfis de expressão relativa dos genes SRCFJUN (*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 o tratamento com *T. asperellum*, *Bacillus* sp. e inoculação com Foc em relação ao controle não inoculado no tempo 0 h. As quantificações foram normalizadas utilizando o gene de referência 25S e Tubulina.

#### 4. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, os microrganismos benéficos como algumas 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 estudada em várias culturas como a do milho (IDRIS 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 da planta e espessura do pseudocaule dos genótipos tratados com *Bacillus* sp. e *T. asperellum*, quando comparados com o tratamento controle e o tratamento inoculado apenas com Foc. Esse resultado, permite 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-GARCÍA, 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)

Comparando a influência de ambos os microrganismos benéficos no crescimento das mudas de bananeira, observou-se que a eficiência de *Bacillus* sp. nos tratamentos sem a interferência do Foc superou o *T. asperellum* em tratamento semelhante, isso mostra, que o isolado bacteriano, comparado ao isolado fúngico, pode ter apresentado mecanismos mais eficientes na promoção de crescimento das mudas de bananeira, quando aplicado isoladamente. Após o tratamento com rizobactérias, a promoção do crescimento das plantas pode ocorrer por meio da combinação de mecanismos como o aumento na fixação de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento vegetal, solubilização de fosfatos, oxidação de enxofre, aumento da disponibilidade de nitrato, produção extracelular de antibióticos, enzimas líticas, aumento da permeabilidade radicular, competição estrita pelos nutrientes e sítios radiculares disponíveis, bem como a indução de resistência sistêmica da planta (CHANWAY et al. 1991, KLOPPER 1993, ENEBAK et al., 1998). Visto isso, é importante que novos estudos sejam realizados, a fim de compreender melhor quais desses mecanismos, o isolado de *Bacillus* sp. utilizado nesse estudo, pode ter desenvolvido na promoção de crescimento de bananeira.

Em estudo realizado por Hadiwiyono e Widono (2012), a utilização de 10 isolados de *Bacillus* spp. também se mostrou eficiente na promoção de crescimento de bananeira, constatando diferenças significativas no crescimento das mudas em relação ao controle. Nesse estudo, os autores relataram que a liberação de compostos extracelulares por *Bacillus* spp., dentre estes, reguladores de crescimento vegetal, foram essenciais na promoção de crescimento das plantas. Em estudo posterior, realizado por Kavino e Manoranjitham (2017), o tratamento de bananeira com cepas de *Bacillus subtilis* e rizobactérias *Pseudomonas fluorescens*, também foi capaz de

induzir um rápido crescimento das plantas, conferindo-as, maiores números de folhas e raízes quando comparado ao controle.

A produção de sideróforos é uma das características dos agentes biocontroladores que pode influenciar o crescimento das plantas ao se ligar à forma de ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) disponível na rizosfera. Através deste processo, o ferro se torna indisponível para os fitopatógenos, e ao mesmo tempo o sideróforo protege a saúde das plantas (SIDDIQUI, 2005). Assim como sideróforo a competição por espaço e nutriente, indução de resistência e a produção de enzimas líticas, podem estar entre os principais mecanismos que proporcionaram que o *Bacillus sp.* promovesse o crescimento das mudas de bananeira, mesmo após a inoculação do fitopatógeno. Esse isolado pode ter minimizado a ação patogênica do Foc, e concomitantemente promovido o crescimento das mudas.

Nas plantas tratadas com *T. asperellum* + Foc, observou-se que além da diferença no crescimento em relação ao controle, as mudas apresentaram melhor resultado até mesmo comparado com as plantas tratadas apenas com *T. asperellum*. Além da eficiência no antagonismo direto causado pelo *T. asperellum*, a indução de resistência sistêmica mediada por este fungo, pode ter contribuído para esse resultado. Quando em contato com um agente indutor, o sistema de defesa da planta é ativado, esse mecanismo funciona como um estágio preparatório, ocasionando um custo-benefício no gasto de energia pelo vegetal com estresses futuros (GOELLNER & CONRATH, 2008). Como o vegetal não gasta energia com a defesa e crescimento ao mesmo tempo, sugere-se então, que a energia a qual as mudas de bananeira pré-tratadas com *T. asperellum* utilizariam na defesa após o desafio com Foc, passou a ser alocada no crescimento. Analisando o custo-benefício de energia no processo de indução de resistência em *Arabidopsis*, Van Hulten et al. (2006), também observaram efeitos significativos no crescimento da planta e na produção de sementes, e sugeriram que esse resultado pode depender da pressão da doença. Sendo o crescimento e a produção de sementes fatores ecologicamente importantes para as plantas, é plausível que esse efeito gerado na indução de resistência do vegetal desempenhe um papel importante na natureza.

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). Nesse estudo, o método de clareamento de raiz e coloração com azul de tripan, evidenciou a interação benéfica do isolado de *Bacillus sp.* e *T. asperellum* com o sistema radicular das plantas, 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 onde foi aplicado *T. asperellum*, enquanto nos tratamentos com *Bacillus sp.* o Foc foi observado apenas com 17 DAI.

Uma das primeiras respostas das células vegetais à penetração microbiana é a rápida polarização celular, ou seja, um movimento do núcleo e mitocôndrias, e um rearranjo da membrana, retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Neste processo, o citoesqueleto desempenha um importante papel, pois fornece a rede para a organela se movimentar e pode transmitir sinais dentro da célula. (SHAN & GOODWIN, 2005). No presente trabalho, observou-se nas amostras dos tecidos radiculares, principalmente nas plantas tratadas com *Bacillus sp.*, a presença de estruturas como pontuações no interior das células que, hipoteticamente, pode ter sido uma elevação do núcleo, ocasionado na interação das plantas com o *Bacillus sp.* Esse

resultado sugere que esse microrganismo pode ter provocado alterações na dinâmica das atividades celulares, isso pode estar intimamente ligado com os mecanismos desencadeados no processo de indução de resistência da planta a microrganismos invasores. Poucas informações estão disponíveis sobre as alterações citogenéticas na interação plantas-microrganismos benéficos, e muito ainda precisa ser elucidado, para melhor ser entendido nesses processos.

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. Mohandas et al. (2010), notaram 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 conseqüentemente 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, promovido alterações estruturais na morfologia dos tecidos radiculares e estabelecido uma barreira mecânica, dificultando a entrada do Foc. As aposições da parede celular, ou papilas, são barreiras importantes formadas pelas plantas em defesa contra a tentativa de penetração de patógenos fúngicos e oomicetos. Essas estruturas se desenvolvem abaixo dos apressórios, adjacentes às hifas intercelulares e ao redor dos sítios de penetração e haustórios (TAKEMOTO & HARDHAM, 2004).

Embora o método de clareamento de raiz seja uma análise qualitativa, o resultado desse estudo evidenciou que o *T. asperellum* apresenta melhor potencial no biocontrole do Foc em relação ao *Bacillus* sp., sendo capaz de inibir a penetração do patógeno nas raízes de 'BRS Princesa'. Esta diferença pode estar relacionada a possível capacidade do micoparasitismo desenvolvida pelo *T. asperellum*. O micoparasitismo descreve o tipo de interação biotrófica na qual os organismos se beneficiam à custa dos fungos. A capacidade de antagonizar, parasitar ou mesmo matar outro fungo é particularmente comum no gênero *Trichoderma* (ANTASOVA et al., 2013).

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 analisada com o propósito de investigar os efeitos nos níveis de expressão gênica via qPCR em plantas desafiadas ou não com Foc.

Ambos os isolados microbianos, principalmente o *Bacillus* sp., induziram a expressão dos genes relacionados as respostas de defesa nas plantas de bananeira, causando uma expressão diferencial em relação ao controle e ao tratamento inoculado apenas com Foc. Mostrou, também, que na maioria dos tratamentos pré-inoculados com microrganismos benéficos, quando desafiados com o patógeno, os níveis de expressão dos genes foram mais elevados que os demais tratamentos. Esse resultado pode estar relacionado ao efeito 'priming' proporcionados pelos *Bacillus* sp. e *T. asperellum* nas mudas de bananeira. Essa sensibilização dos tecidos vegetais induzidas por microrganismos benéficos para melhorar a respostas de defesa das plantas denominado como 'priming' foi caracterizada como uma ativação mais rápida

e/ ou mais forte das defesas celulares após o ataque de patógeno, resultando em maior resistência das plantas (CONRATH, 2008; ENT, WESS & PIETERSE, 2009). Os mecanismos moleculares subjacentes ao 'priming' são poucos compreendidos. Conrath et al. (2006) sugerem que, hipoteticamente, o estado inicial desse mecanismo pode ser baseado no acúmulo ou modificação pós-tradução de uma ou mais proteínas sinalizadoras, que, após serem expressas ou modificadas, ainda permanecem inativas. Após a percepção subsequente de estresse, um segundo evento de sinalização poderia "hiper-ativar" a proteína de sinalização, desencadeando uma transdução de sinal potencializada.

As respostas imunes desencadeadas por microrganismos, 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 Princesa' os genes KINLRR, PER 64, STRANS e CESA 7 foram induzidos logo nos tempos iniciais após o tratamento, e 'Prata Anã' os genes STRANS, SRCFUN, AUXPL-1 e PRMS-1 manteve o mesmo padrão, principalmente nos tratamentos onde foi aplicado o *Bacillus* sp.. A produção de compostos voláteis e lipopeptídeos sintetizados por *Bacillus* spp. são os principais metabólitos elicitores desse gênero, isso pode ter colaborado para o melhor desempenho desse isolado na indução dos genes utilizados. Cawoy et al. (2014) mostraram que os lipopeptídeos, especificamente da família surfactina, produzidos por isolados de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciense* foram eficientes na indução de resistência 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 desencadeada por 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). No presente trabalho, os isolados de *Bacillus* sp. e *T. asperellum* induziram o gene PER 64 em ambos os genótipos, observando-se a expressão positiva desse gene desde as primeiras horas após a aplicação, principalmente nos tratamentos em conjunto com Foc. De acordo com Li et al. (2011), 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 do hospedeiro. Yedidia et al. (2000), observaram em mudas de pepino um aumento na produção de peroxidase a partir de 48 horas após inoculação com *Trichoderma harzianum*. Os autores relataram que o aumento da atividade total da peroxidase juntamente com a deposição de compostos fenólicos, contribuíram para a produção de um ambiente fungitóxico, e a geração de tais compostos pareceu desempenhar um papel importante na tolerância da planta à colonização radicular pelo *T. harzianum*. Sendo assim, as tentativas fúngicas de penetrar as células radiculares são impedidas

e as hifas ficam restritas ao espaço intercelular, permitindo o estabelecimento de uma associação benéfica entre fungo e a planta. No caso do presente estudo, isso também pode ter contribuído no retardamento da penetração pelo patógeno nos tecidos das mudas de bananeira.

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 o tratamento 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, 2004). Com relação ao gene KINLRR, 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', também mostrou uma resposta de defesa com a expressão positiva, ao interagir com os microrganismos benéficos, principalmente com *Bacillus* sp., 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, o gene PRMS-1 em 'BRS Princesa' foi induzido com 24 horas após o tratamento com os microrganismos benéficos, enquanto em 'Prata anã' a indução aconteceu desde 1 HAI com maior nível de expressão principalmente nos tratamentos onde foi aplicado *Bacillus* sp., sendo assim, é pertinente afirmar que o isolado bacteriano induziu melhor esse gene nas plantas, e o genótipo suscetível respondeu com mais intensidade a essa interação. Esse resultado pode ter ocorrido devido a elicitores específicos de bactérias como fragelina, lipopeptídeos e algumas proteínas com função enzimática. Em consonância com esse estudo, Gond et al. (2014) testando a indução da expressão de genes de defesa em planta de milho após o tratamento com *B. subtilis* observaram que ele também proporcionou a regulação positiva do gene PR1 de forma significativamente maior que o tratamento controle. Os autores sugeriram que os endófitos bacterianos podem induzir as plantas a produzir essas proteínas, e contribuir na proteção vegetal contra infecção por fungos.

A parede celular compõe 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 compensatórios, 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.

Analisando os perfis de expressão gênica de forma global, os resultados observados na (figura 8) deixam claro o contraste entre os genótipos em relação aos perfis de expressão dos genes relacionados a defesa contra o Foc. 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.

## 5. CONCLUSÕES

O isolado de *Bacillus* sp. e *T. asperellum* empregados nesse trabalho podem ser utilizados como promotores de crescimento em bananeira. Ambos os isolados promoveram o crescimento das plantas, até mesmo quando desafiadas com Foc.

*T. asperellum* apresenta melhor eficácia para o uso no manejo integrado da murcha de fusarium. A soma dos mecanismos de ação, como o antagonismo direto e indução de resistência, proporcionados por esse agente biocontrolador, minimizou a ação fitopatogênica do Foc, e aumentou a resistência quantitativa do genótipo tolerante 'BRS Princesa', impedindo a colonização do patógeno nos tecidos radiculares dessa cultivar.

O isolado de *Bacillus* sp. e *T. asperellum* empregados nesse trabalho, podem ser considerados como indutores de resistência em bananeira. O uso desses microrganismos potencializou os níveis de expressão dos genes relacionados as respostas de defesas ao Foc, principalmente nos tratamentos que foram posteriormente desafiados com o patógeno.

*Bacillus* sp. demonstrou maior potencial na indução de resistência de bananeira ao Foc, induzindo melhor que o *T. asperellum* a expressão dos genes relacionados as respostas de defesa das plantas, principalmente no genótipo suscetível 'Prata Anã'.

As respostas moleculares da bananeira ao interagir com microrganismos, variam de acordo ao padrão de resistência genética da planta. Sendo visto que os perfis de expressão gênica dos genótipos 'BRS Princesa' (tolerante) e 'Prata Anã' (suscetível) responderam de forma contrastante quando tratados com *Bacillus* sp., *T. asperellum* e desafiados com Foc.

## REFERÊNCIAS

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; RKMANN, 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.; MACKEY, 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.

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.

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.

CHANWAY, C. P.; RADLEY, R. A.; HOLL, F. B.; AXLEROOD, P. E. Effect of Bacillus strains on growth of pine (*Pinus contorta* DOUGL.), spruce (*Picea glauca* VOSS.) and Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO). In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. **The Rhizosphere and Plant Growth**. p. 366. Kluwer Netherlands, 1991.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; FLORS, V.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M. A.; PIETERSE, C. M. J.; POINSSOT, B.; POZO, M. J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAUCH-MANI, B. Priming: Getting Ready for Battle. **American Phytopathological Society**. v. 19, p. 1062-1071, 2006.

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.

ENEBAK, S. A.; WEI, G.; KLOEPPER, J. W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**. v. 44, p. 139-144. 1998.

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.

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 defense 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. T. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. **International Review of Cytology**, Amsterdam, v. 234, p. 1-46, 2004.

KLOEPPER, J. W., Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. In: METTING, F. **Soil Microbial Ecology - Applications in Agricultural and Environmental Management**. p. 255-274. Marcel Dekker, New York, 1993.

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.

LICHTEMBERG, L. A.; LICHTEMBERG, P. S. F. Avanços na bananicultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. E, p. 029-036, 2011.

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 <sup>2</sup>- $\Delta\Delta$ 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.
- 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.
- SHAN, X. C.; GOODWIN, P. H. Reorganization of filamentous actin in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermal cells inoculated with *Colletotrichum destructivum* and *Colletotrichum graminicola*. **International Journal of Plant Sciences**. v. 166, p. 31-39, 2005.
- SIDDIQUI, Z. A. PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**, Springer, Netherlands. p. 111-142, 2005.
- 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.
- 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.
- TAKEMOTO, D.; HARDHAM, A. R. The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. **Plant Physiology**. v. 136, p.3864-3876, 2004

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.

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

VAN HULTEN, M.; PELSERS, M.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J.; TON, J. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, p. 5602-5607, 2006.

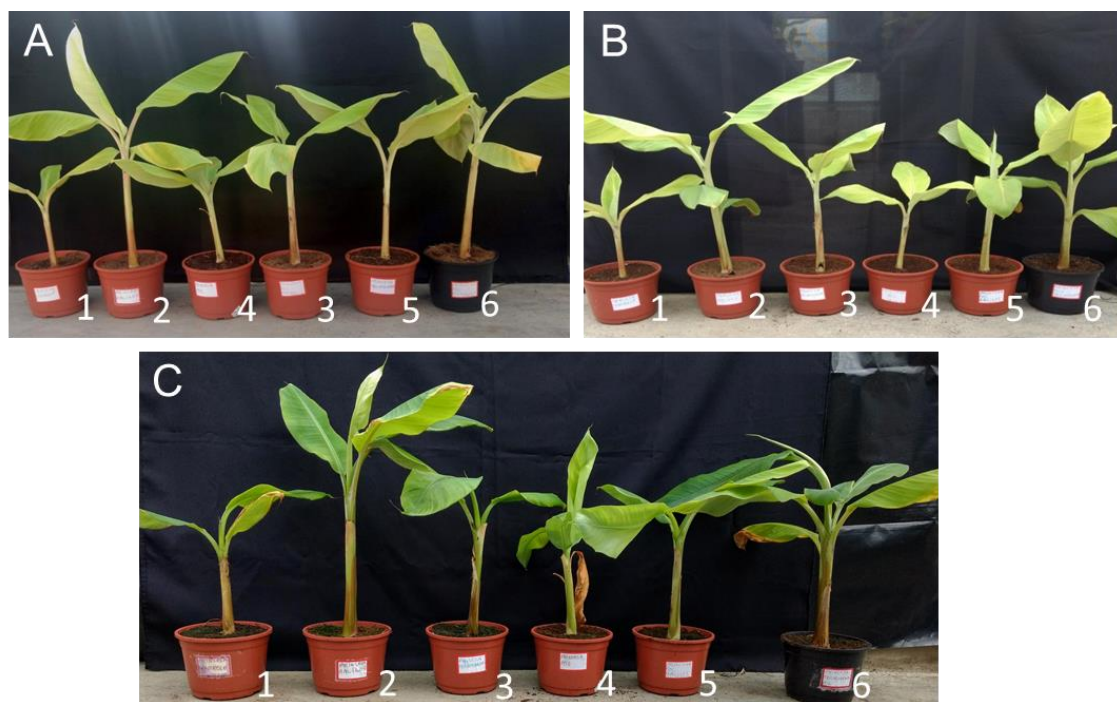
WANG, B.; SHEN, Z.; ZHANG, F.; RAZA, W.; YUAN, J.; HUANG, R.; RUAN, Y.; LI, R.; SHEN, Q. *Bacillus amyloliquefaciens* Strain W19 can Promote Growth and Yield and Suppress Fusarium Wilt in Banana Under Greenhouse and Field Conditions. **Pedosphere**, Beijing, v. 26, p. 733-744, 2016.

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.

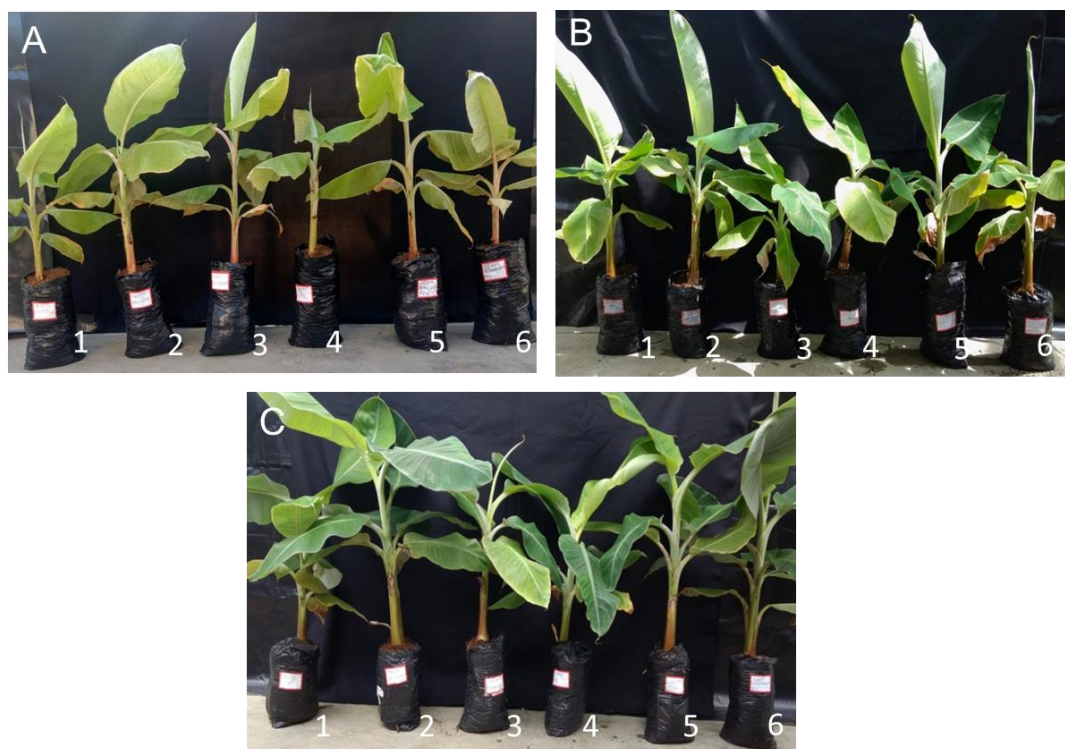
YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? **Fungal Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 53-59, 2015.

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.

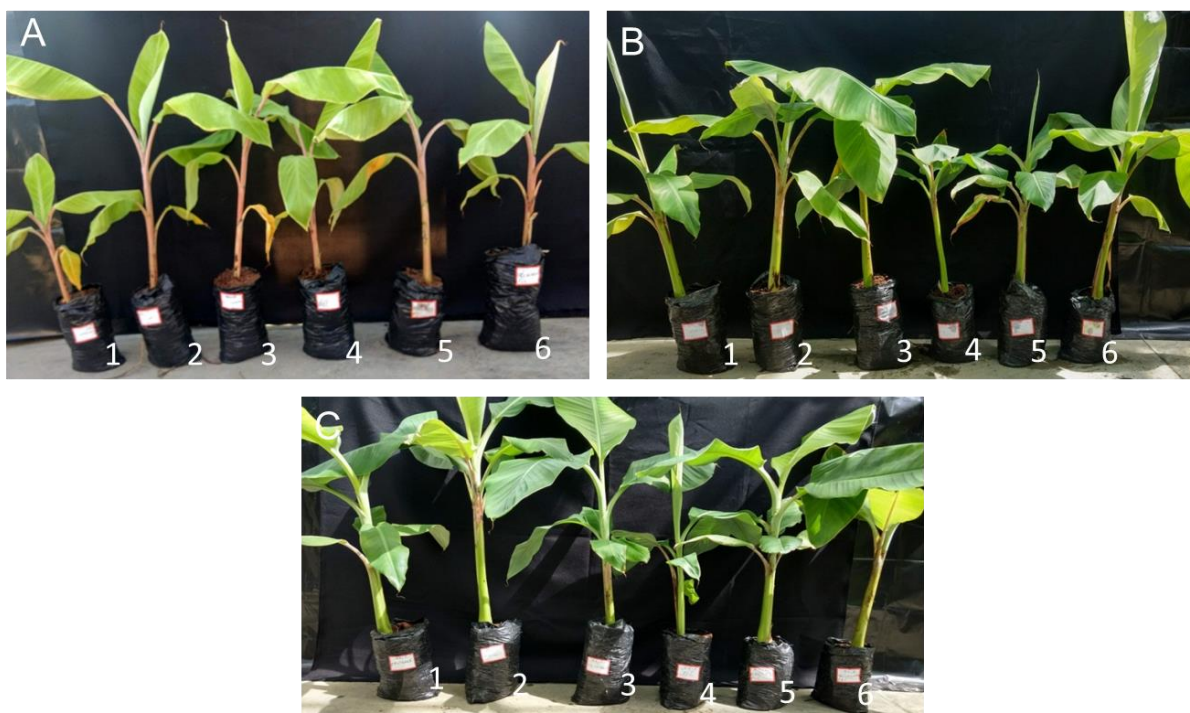
## ANEXOS



**Figura 10.** Influência de *Bacillus* sp. e *T. asperellum* na altura da cultivar 'BRS Princesa' desafiada com Foc em três períodos de avaliação em casa de vegetação. (A) 30 dias após o tratameto; (B) 45 dias após o tratamento; (C) 60 dias após o tratamento. Tratamento (1) controle; (2) *Bacillus*; (3) *Trichoderma*; (4) Foc; (5) *Bacillus* + Foc; (6) *Trichoderma* + Foc.



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



**Figura 12.** Influência de *Bacillus* sp. e *T. asperellum* na altura da cultivar Maçã desafiada com Foc em três períodos de avaliação em casa de vegetação. A) 30 dias após o tratamento; (B) 45 dias após o tratamento; (C) 60 dias após o tratamento. 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: CCTTTTGTCCACACGAGATT	102	1,01
25SMU	25S rRNA	F: TGTTGCATCCTGGTA CTGCT R: GGCTTTCTTGCACTGGTACAC	122	0,92