

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM BANANEIRA CULTIVADA COM SILÍCIO E
INOCULADA COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

Adailson Feitoza de Jesus Santos

CRUZ DAS ALMAS - BA
NOVEMBRO - 2010

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM BANANEIRA CULTIVADA COM SILÍCIO E
INOCULADA COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

ADAILSON FEITOZA DE JESUS SANTOS

Biólogo

Universidade do Estado da Bahia, 2007

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

Orientador (a): Dr^a. Adriana Maria de Aguiar Accioly

Co-orientadores: Dr^o. Jorge Teodoro de Souza

Dr^o. Miguel Angel Dita Rodriguez

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Adailson Feitoza de Jesus.

Análise da expressão gênica em bananeira cultivada com silício e inoculada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. / Adailson Feitoza de Jesus Santos. Cruz das Almas - Ba, 2010.

92f.; il.

Orientadora: Adriana Maria de Aguiar Accioly

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

1. Banana - Cultivo. 2. Banana - doença. 3. Banana – Mal do Panamá - controle. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD. 634.772

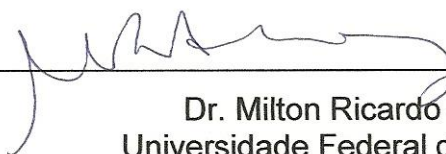
Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica da biblioteca central da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

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

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
ADAILSON FEITOZA DE JESUS SANTOS**



Dra. Adriana Maria de Aguiar Accioly
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)



Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque
Universidade Federal da Bahia – UFBA
(Convidado)



Dra. Cláudia Fortes Ferreira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Convidada)

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____

À minha mãe Angelina Alvez Feitoza,
Por toda força, dedicação e símbolo de luta
Que representa.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A cada passo que damos na nossa jornada encontramos pessoas que têm alguma importância, mesmo que não saibamos reconhecê-las de imediato. Não se caminha ou se chega a algum lugar sozinho.

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, por ter me concedido a coragem, dedicação e saúde para que pudesse desenvolver todas as minhas atividades.

A Deus novamente, por conceder-me uma família a qual posso amar e ser fortalecido na reciprocidade do mesmo amor. A minha mãe, Angelina Alves Feitoza, que com o carinho e coragem de mãe e de pai, vive para os filhos (cabeçuda, você é o meu maior exemplo de força); a minha irmã, Aline Alves Feitoza, pelo carinho e amor incondicional; a minha esposa Adriane Freire Araújo Feitoza, pelo amor, carinho, cumplicidade, companheirismo, incentivo e dedicação.

A Professora Dr^a. Adriana Maria de Aguiar Accioly, pela oportunidade, confiança depositada e pela orientação deste trabalho.

Ao Professor Dr. Jorge Teodoro de Souza pela orientação e pela disponibilidade em sempre me atender, mesmo com tanto trabalho para fazer.

Ao Professor Dr. Miguel Angel Dita Rodriguez pela disponibilidade em ajudar e pela confiança.

A Professora Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares pelo apoio, dicas e incentivo em nunca desistir daquilo que acredito e almejo.

Ao Professor Dr. Rodrigo Pires do Nascimento pela força, apoio e amizade.

A Professora Dr^a. Paula Alcoforado pela importante contribuição nas análises de silício e nas relações de silício com os nutrientes na planta e no solo.

Aos meus amigos de mestrado, Dayse Batista, Aline Bispo, Manuela Rocha, Rafael Trocoli, Emília Gabriela, Carol Yamamoto, Karol Greyce, Lorena Varjão, agradeço pela amizade, apoio e pelas longas horas de divertimento, churrasco e cerveja.

Aos agregados, que sempre participaram de todos os momentos, Augusto, Tâmara, Vini e Juan.

Em especial a Dayse Batista pela recepção fantástica no mestrado, pelas longas horas de conversa e risadas, tornando-se uma grande amiga; Aline Bispo (mentira) pela amizade, acolhimento e paciência (um dia quero ter toda essa tua

calma) e Manuela Rocha, uma estranha em Cruz das Almas, assim como eu, pelos momentos divertidos, pela companhia nas horas de estudo em bioquímica (rendeu muito) e pelo apoio.

A Tia Ivete (Mãe de Aline) pelo carinho e por tantas vezes permitir que nossas farras fossem feitas na sua casa. E a Vinícius (Vini) pelo fornecimento fiado (pela confiança) do “combustível”, sempre gelada, para as nossas farras.

A Lene, técnica do Núcleo de Estudos em Microbiologia Aplicada (NEMA), pela grande força que dá para que os nossos experimentos sejam conduzidos de forma adequada, e pelo cuidado e carinho que tem com os membros no laboratório, muito obrigado.

A Emília Gabriela, pelo grande e precioso apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, sua participação foi fundamental para que eu pudesse montar os experimentos.

A Danilo Tosta e Abelmon Gesteira, pelos esclarecimentos e dicas na utilização do Kit para a extração do RNA.

A Élide Correa e Juan Rocabado pelo apoio e grande auxílio

As meninas da secretaria da Pós-Graduação (Amália, Renata e Rejane), pela disponibilidade em sempre tentar atender às nossas necessidades e esclarecer as nossas dúvidas.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura , onde o experimento foi realizado.

A Empresa Recmix do Brasil S. A., sob a pessoa de Giuliano, pelo gentil fornecimento do AgroSilício®.

Aos Funcionários do Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da Embrapa: Roque, Das Neves, Náñez e Juliana, pelo apoio e pelas preciosas contribuições.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB pela oportunidade.

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!

*A natureza, porém, é ainda inexplicável;
Aqueles que mais a descrevem
Jamais adentraram sua eterna morada,
Nem sequer seu espírito abrandaram.
Para compaixão dos que não a distinguem
O consolo do lamento
Daqueles que a conhecem,
que jamais a desconhecem
Quanto mais dela se aproximem.*

Dorion Sagan e Lynn Margullis
Janeiro de 1991/1997

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1.0 INTRODUÇÃO.....	01
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Aspectos gerais da cultura da bananeira e o mal-do-Panamá.....	03
2.2 O patógeno.....	07
2.3 O silício e a sua importância para as plantas.....	09
2.4 Resistência de plantas à patógenos.....	17
2.4.1 Ativação dos mecanismos de defesa.....	20
2.4.2 Atividade do silício na indução de resistência a doenças.....	24
2.4.3 Genes selecionados para análise da quantificação relativa por PCR em Tempo Real	27
CAPÍTULO 1	30
Análise da expressão gênica em bananeira cultivada com Silício e inoculada com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i>	
1.0 INTRODUÇÃO.....	33
2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.0 RESULTADOS.....	45
4.0 DISCUSSÃO.....	56
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

Santos, A. F. J. Análise da expressão gênica em bananeira cultivada com Silício e inoculada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

A bananicultura representa uma cultura de grande importância econômica e social para o Brasil. A baixa produtividade nacional tem sido atribuída a fatores como alta incidência de pragas e doenças e ao baixo nível de tecnologia empregado nesta cultura na maioria das áreas produtoras. O mal-do-Panamá, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) é uma doença endêmica em todas as regiões produtoras de banana do mundo. Seu controle com fungicidas é inviável e o uso de cultivares resistentes está condicionado à aparição de novas raças do patógeno. Diante desse cenário, a busca por medidas que visem o controle da doença têm sido estudadas, e uma das propostas é a utilização do silício como um indutor de resistência, devido ao seu efetivo papel no controle de doenças de várias culturas. O objetivo deste trabalho foi: a) revisar o conhecimento científico sobre a cultura da banana, o mal-do-Panamá e o papel do Silício na ativação de mecanismos de defesa; b) analisar a expressão gênica em bananeira das cultivares Maçã e Grande Naine, suscetível e resistente, respectivamente a *Foc*, cultivada com Si e inoculadas com o *Foc*. Para isto foi empregada a técnica de PCR em Tempo Real, utilizando a metodologia SYBR Green. A utilização simultânea de Si e inoculação com *Foc* apresentou efeito apenas na expressão da *catalase* para a cultivar Maçã nas primeiras horas após a inoculação, para os genes *pal* e *pr3* esta interação inibiu a expressão; o tratamento contendo apenas Si só apresentou efeito significativo para o gene *pal* na cultivar Maçã; os tratamentos não suplementados com Si e inoculados com *Foc* apresentaram a mesma taxa de expressão que o controle negativo para os genes *catalase* e *pal* em ambas cultivares; o controle negativo teve uma ação efetiva na ativação do gene *pr3* para a cultivar Grande Naine. Os resultados poderão ser usados para melhorar o entendimento sobre as rotas de defesa da bananeira a *Foc* sob influência do Si.

Palavras-chave: mal-do-Panamá, genes de defesa, PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

Santos, A. F. J. Analysis of gene expression in banana cultivated with silicon and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

The banana crop is economically and socially important to Brazil. The low national productivity levels are attributed to factors such as high incidence of pests and diseases and the low level of technology employed in most producing areas. Panama disease, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) is endemic to all banana producing areas of the world. The control with fungicides is not feasible and the use of resistant cultivars is dependent on the appearance of new races of the pathogen. Control methods to the diseased are being searched and the use of silicon (Si) as an inducer of resistance is among the options because of its activity in multiple crops. The aims of this research were: a) to revise the scientific knowledge on the banana crop, on the Panama disease and the role of silicon in the activation of defense mechanisms; b) to analyze the expression of the genes encoding catalase, Phenylalanin Ammonia Lyase (PAL) and Pr3 (endochitinase) in two banana cultivars, Maçã and Grande Naine cultivated with silicon and inoculated with *Foc*. Real Time PCR was used with the SYBR Green methodology. The negative control had high levels of expression in both Maçã and Grande Naine cultivars for all the studied genes. The simultaneous use of silicon and inoculation with *Foc* influenced the expression of *catalase* in the cultivar Maçã in the first hours after inoculation. In this treatment, the *pal* and *pr3* genes had their expression inhibited. The Si treatment showed a significant effect on the expression of *pal* in cultivar Maçã. Treatments without Si supplementation and inoculated with *Foc* presented levels of expression compared to the negative control for catalase and *pal* in both cultivars. These data will be important in shedding light into the complex metabolic pathways leading to defense responses in banana under the influence of Si.

Key-words: Panama disease, defense response genes, Real Time PCR.

1.0 INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) pertence à família botânica Musaceae, originária do Sudeste da Ásia. A planta é caracterizada por apresentar caule suculento e subterrâneo (rizoma), cujo “falso” tronco é formado pelas bases superpostas das folhas. Foi provavelmente a primeira fruteira a ser cultivada pelo homem. Presente em mais de 120 países, ocupando cerca de nove milhões de hectares, e se destacando como a fruta mais consumida no mundo.

O Brasil é responsável pela produção anual de seis milhões de toneladas, e entre as regiões produtoras, o destaque maior é para a Região Nordeste, que contribui com cerca de 38% da produção e 34% da área cultivada. A produtividade média brasileira está em torno de 14 t ha⁻¹, muito abaixo das 35 t ha⁻¹ observadas na Índia (FAO, 2010). A baixa produtividade está associada à incidência de pragas, mas, principalmente, ao baixo nível de tecnologia que é dispensado ao cultivo da bananeira na maior parte das áreas produtoras, levando à constatação de bananais mal manejados, mal nutridos e com alta incidência de pragas.

Entre as doenças mais importantes destacam-se a Sigatoka-negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a Sigatoka-amarela, causada por *Mycosphaerella musicola* Leach, e o Mal-do-Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), que chegam a provocar perdas superiores a 50% da produção (CORDEIRO et al., 2005; PLOETZ, 1994, 2006).

O Mal-do-Panamá é endêmico em todas as regiões bananiculoras do mundo. Seu controle com fungicidas é inviável e o uso de cultivares resistentes está condicionado à aparição de novas raças do patógeno. No entanto, estratégias de melhoramento genético desta cultura estão sendo realizadas, objetivando desenvolver bananas resistentes às Sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá, com porte e ciclos reduzidos e produtivos, mediante cruzamento de diplóides (AA) melhorados com triplóides comerciais, avaliando e selecionando estas novas variedades tetraplóides em diferentes regiões produtoras de banana do País (SILVA et al., 1998). Para o mal-do-Panamá o melhoramento é voltado para as raças 1 e 2, e não para a raça 4, a qual ainda não está presente no Brasil. Além do melhoramento genético, medidas alternativas de controle devem ser estudadas para minimizar as perdas na produção ocasionadas pela doença.

Uma das alternativas testadas para o controle de importantes doenças de plantas, principalmente as fúngicas, é o uso do silício (Si), que tem apresentado efeitos benéficos em várias espécies vegetais, proporcionando efetiva redução da severidade de doenças. Entre os principais benefícios do Si nas plantas destacam-se: o aumento da capacidade fotossintética, aumento da tolerância ao estresse hídrico, redução no acamamento e o aumento na resistência ao ataque de pragas e doenças (MA et al., 2001). Embora muitos estudos sugiram que Si ativa mecanismos de defesa da planta, a exata natureza da interação entre o elemento e as vias bioquímicas que levam a resistência permanecem desconhecidos. O Si possui propriedades bioquímicas únicas que podem explicar a sua bioatividade como um regulador do mecanismo de defesa de plantas.

Este trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira, pode ser encontrada uma revisão de literatura abordando aspectos gerais da cultura da bananeira e o mal-do-Panamá, características do patógeno, a importância do silício para as plantas, mecanismos de resistência de plantas a patógeno e atividade do silício na indução de resistência em plantas.

Na segunda parte, são apresentados os resultados da pesquisa sobre a ativação de genes, relacionados com a defesa, sendo expressos em banana a partir do cultivo com silício e inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Buscando mais informações a respeito do Si no patossistema envolvendo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e bananeira, bem como do modo de ação no controle dessa doença mediante aplicação do Si, realizou-se esse trabalho com o objetivo geral de analisar os níveis de expressão de genes relacionados à defesa em diferentes cultivares de bananeira cultivadas com silício e inoculadas com o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cultura da bananeira e o mal-do-Panamá

A bananeira (*Musa spp.*) é uma monocotiledônea herbácea, caracterizada por apresentar um caule subterrâneo (rizoma), de onde saem as raízes primárias, em grupos de três ou quatro, totalizando 200 a 500 raízes com espessura predominante menor que 0,5 mm, podendo atingir até 8 mm; um pseudocaule e uma coroa de folhas terminal (JONES, 2000, BORGES & SOUZA, 2004). Pertencente a família Musaceae e originária do Sudoeste da Ásia, está presente em mais de 120 países, ocupando cerca de nove milhões de hectares, destacando-se como a fruteira mais consumida no mundo. O seu cultivo é uma das atividades agrícolas mais antigas do Brasil.

Mundialmente a produção de banana atingiu cerca de 90.705.922 milhões de toneladas em cerca de 4.817.551 hectares de área plantada para o ano de 2008 (FAO, 2010). Na figura 1 podem ser visualizados os países com maiores destaques na produção.

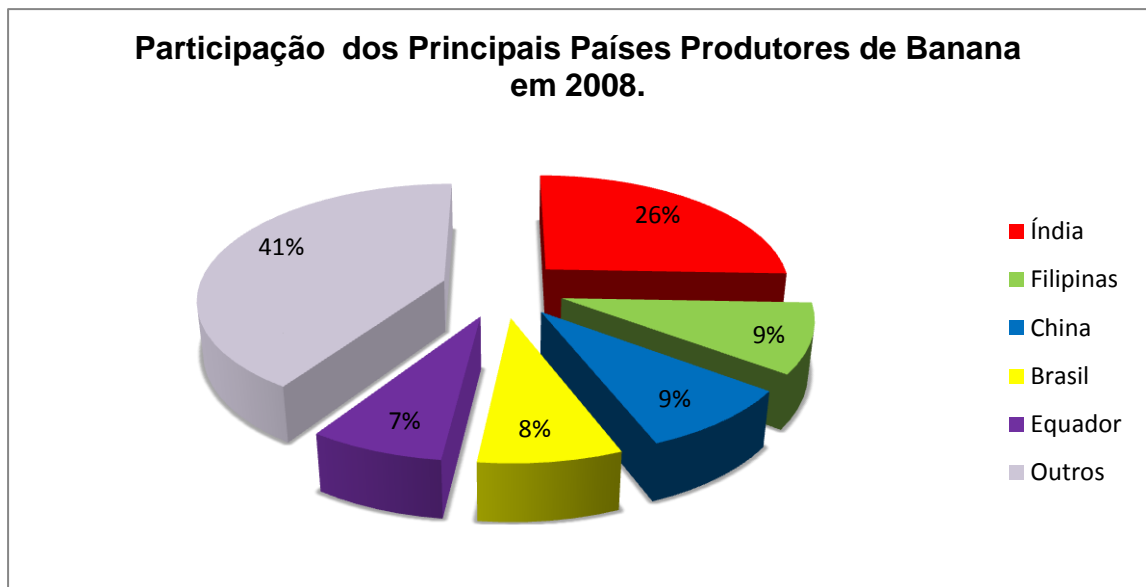


Figura 1: Produção de banana no ano de 2008 pelos principais Países produtores.
Fonte: FAO, 2010. Consultado em 20/07/2010.

Como 3º colocado no *ranking* mundial de produção, o Brasil apresenta uma vasta área plantada, distribuída entre as 27 unidades da Federação, incluindo

Distrito Federal. Esta cultura se destaca, depois da laranja, como a fruta mais importante em área colhida, quantidade produzida, valor da produção e consumo (ALMEIDA, 2004). A figura 2 apresenta a relação das regiões brasileiras produtoras de banana, destacando a porcentagem na participação de cada região.

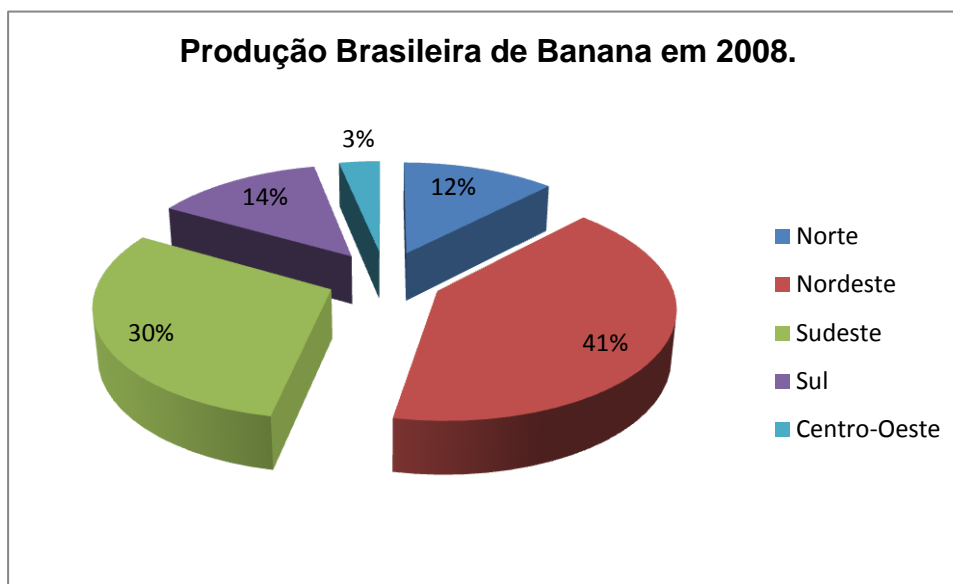


Figura 2: Produção Brasileira de Banana, subdividida em regiões, no ano de 2008.

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Municipal, 2008. Consultado em 20/07/2010.

Embora apresente uma grande área de produção, a produtividade desta cultura está em torno de 14 t ha^{-1} , muito abaixo das 35 t ha^{-1} observadas na Índia (FAO, 2010) (Figura 3), colocando o Brasil na 5ª posição no *ranking* de produtividade, representando cerca de 10% da produtividade mundial. Esta baixa produtividade está associada à incidência de pragas, mas principalmente, ao baixo nível de tecnologia que é dispensado ao cultivo da bananeira na maior parte das áreas produtoras, levando à constatação de bananais mal manejados, mal nutridos e com alta incidência de pragas.

Como ocorre em qualquer espécie cultivada em grandes áreas, a bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários, causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos (CORDEIRO et al., 2004). Os fungos constituem o principal grupo de fitopatógenos da bananeira, tanto pelo número de espécies que afetam a cultura, quanto pelas perdas que são causadas, tornando-se, em alguns casos, fator limitante para o cultivo de algumas variedades (CORDEIRO et al., 2004).

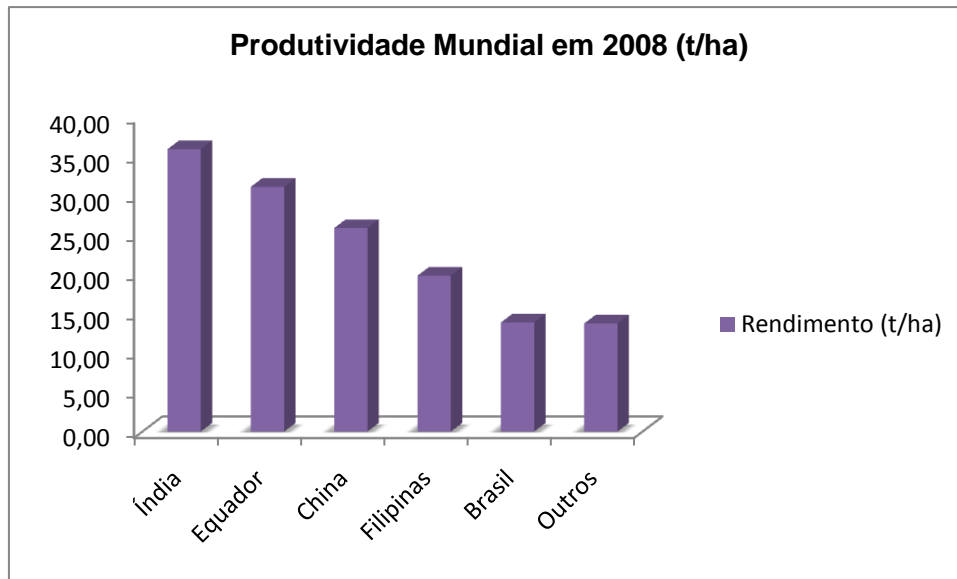


Figura 3: Produtividade Mundial de Banana, no ano de 2008.

Fonte: FAO, 2010. Consultado em 20/07/2010.

Entre as doenças mais importantes destacam-se a Sigatoka-negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a Sigatoka-amarela, causada por *Mycosphaerella musicola* Leach e o mal-do-Panamá, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), que chegam a provocar perdas superiores a 50% da produção (PLOETZ, 1994, 2006; CORDEIRO et al., 2005).

Dentre essas doenças, maior atenção tem sido dada às Sigatokas. O fato de atacar genótipos comercialmente importantes, de não existirem cultivares resistentes que suplantem essas cultivares de grande aceitação comercial e a necessidade de se realizar grande número de aplicações de fungicidas, justificam essa atenção. Assim, o mal-do-Panamá, apesar de ser reconhecida como uma das doenças mais destrutivas da bananeira no mundo (MATOS et al., 2001; VILJOEN, 2002; PLOETZ, 2006), tem sido menos estudada. O fato da maioria das cultivares exportadas pertencer ao subgrupo Cavendish as quais são resistentes à raça 1 de *Foc*, grupo predominante nas principais regiões produtoras para exportação, pode explicar a menor ênfase nas pesquisas sobre esse patossistema. Contudo, diferentemente da Sigatoka-negra, o mal-do-Panamá é endêmico em todas as regiões bananiculoras do mundo, sendo disseminado através de material vegetal infectado. Seu controle com fungicidas é inviável e o uso de cultivares resistentes está condicionado à aparição de novas raças do patógeno (GERLACH et al., 2000; GROENEWALD et al., 2006; SMITH et al., 2006). Adicionalmente, ao contrário dos países exportadores, a banana no Brasil é praticamente de consumo interno e as cultivares

mais apreciadas pela população como “Maçã” e “Prata”, são altamente suscetíveis ao mal-do-panamá.

O agente causal do mal-do-Panamá é o *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyd & Hansen (*Foc*), um fungo de solo (STOVER & WAITE, 1954), pertencente ao filo Ascomycota, ordem Moniliales, família Tuberculariaceae, cuja forma perfeita ainda não é conhecida. O fungo sobrevive na forma de clamidósporos em tecido em decomposição de banana e no solo até sua germinação ser estimulada pelas raízes do hospedeiro, exsudatos das raízes de espécies não-hospedeiras, ou contato com pedaços frescos de plantas não-colonizadas (STOVER, 1962).

O patógeno penetra na planta através do sistema radicular, principalmente pelas raízes secundárias, se locomove pelo xilema e coloniza o rizoma (BECKMAN, 1990). Este produz então microconídios que invadem os tecidos condutores de água (xilema) do pseudocaule, bloqueando os canais vasculares, reduzindo o movimento de água. A expansão dos conídios é interrompida por uma rede de células, conseqüentemente os esporos germinam e crescem através desta rede para continuar sua expansão até que o sistema do xilema inteiro é bloqueado (STOVER et al., 1961; JEGER et al., 1995). Após a morte da planta, o fungo cresce no tecido circunvizinho onde forma clamidósporos que serão liberados novamente no solo quando a planta for decomposta (JONES, 2000).

O sintoma externo clássico do mal-do-Panamá é um amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, começando pelos bordos do limbo foliar e evoluindo no sentido da nervura principal. Posteriormente, as folhas murçam, secam e quebram junto ao pseudocaule. Em conseqüência, ficam pendentes, o que dá à planta a aparência de um guarda-chuva fechado. Ainda externamente, é possível notar, próximo ao solo, rachaduras do feixe de bainhas, cuja extensão varia com a área afetada no rizoma (CORDEIRO et al., 2004).

Internamente, por meio de corte transversal ou longitudinal do pseudocaule, observa-se uma coloração pardo-avermelhada provocada pela presença do patógeno nos vasos. A vista de topo, em corte transversal, mostra a presença de pontos coloridos ou uma área periférica das bainhas manchada, com centro sem sintomas. A vista transversal mostra as linhas de vasos infectados pardo-avermelhados, que começam na base e estendem-se em direção ao ápice da bainha. Em estádios mais avançados, os sintomas de coloração vascular podem ser

observados também na nervura principal das folhas (CORDEIRO et al., 2004). Plantas susceptíveis infectadas com o *Foc* raramente se recuperam. Sintomas da doença não têm sido observados dentro ou fora dos frutos; no entanto, dependendo do nível de resistência da cultivar, plantas doentes não chegam a produzir cachos, ou aquelas que produzem, tem frutos com valor comercial comprometido.

Segundo Cordeiro et al., (2004), quando o mal-do-Panamá ocorre em variedades altamente suscetíveis como a banana “Maçã”, provoca perdas de 100% na produção. Já nas variedades tipo Prata, que apresentam um nível de resistência maior que a “Maçã”, a incidência do mal-do-Panamá, geralmente, fica em torno de 20%.

Numerosas estratégias para o controle do mal-do-Panamá tem sido investigadas. Destas, quarentena e outras práticas de exclusão tiveram êxito na prevenção da disseminação do patógeno restringindo o movimento de solo, rizomas e mudas infectadas (MOORE et al., 1995). Medidas de controle químico não existem. O controle biológico e o uso de produtos químicos ou biológicos para induzir resistência sistêmica em plantas ainda estão em estudos iniciais. Atualmente acredita-se que um dos métodos efetivos de combater a doença é o uso de genótipos resistentes (JONES, 2000). Todavia, o melhoramento genético em bananeira é considerado complexo e demorado. Para isto contribuem fatores inerentes à cultura, como o ciclo longo, níveis de ploidia, frutos sem ou com pouca produção de sementes, entre outros (DAMPE & ORTIZ, 1996; SILVA et al., 1998; OSEBELE et al., 2006). Desta forma, medidas alternativas de controle devem ser estudadas para minimizar as perdas na produção ocasionadas pela doença.

2.20 Patógeno

O gênero *Fusarium* possui espécies que apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente todos os ambientes, tendo algumas espécies cosmopolitas e outras restritas a determinados locais, predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas, encontrando também espécies que apresentam íntima associação com seus hospedeiros (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Fusarium oxysporum produz os seguintes tipos de esporos assexuais: microconídio, macroconídio e clamidosporos (AGRIOS, 2004). Os macroconídios

hialinos, geralmente septados, os quais possuem as células basais e apicais diferenciadas, constituindo-se como importante característica para distinção das espécies. Os macroconídios podem apresentar as seguintes formas: delgado, com aspecto de agulha; com curvatura dorsal e ventral; com a curvatura do lado dorsal mais pronunciada que no lado ventral; com as células apical e basal (típico de *Fusarium*); podem ser grossos, papilados, em forma de gancho, afilados, em forma de pé, em forma de pé alongado, distintamente entalhados e escassamente entalhados. Os microconídios podem apresentar distintas formas, podendo ser: ovais, reniformes ou alantóides, obovóides com a base truncada, piriformes, napiformes ou globosos. Quanto aos clamidósporos, podem estar presentes ou ausentes (HAWKSWORTH et al., 1995). O microconídio possui um ou dois septos e é o tipo de esporo mais abundante e frequentemente produzido pelo fungo em todas as condições. Já o macroconídio tem de 3 a 5 septos, é gradualmente pontudo e curvado nas extremidades. Os clamidósporos são estruturas de resistência com a parede espessa, produzidos por meio do engrossamento das células das hifas ou de macroconídios (AGRIOS, 2004). Essas estruturas conferem uma grande capacidade de sobrevivência do patógeno na ausência do hospedeiro (FERNANDES, et al., 2006).

O gênero *Fusarium* apresenta uma taxonomia muito complexa, dividida em seções, *formae specialis* e raças. Isolados patogênicos de *F. oxysporum* são morfológicamente semelhantes, no entanto, diferem na sua especificidade em atacar hospedeiros distintos, resultando no que se denomina de *formae speciales* (f. sp) (SNYDER & HANSEN, 1940; OLIVEIRA & COSTA, 2003). São conhecidas mais de 150 *formae speciales* para este fungo (BAAYEN, et al., 2000). Dentro de *formae speciales* houve subdivisões designadas de raças. Este conceito é baseado na descoberta de maiores detalhes quanto a suscetibilidade do hospedeiro a todos os tipos clonais diferentes do isolado patogênico (SMITH, 2007). Até o presente existem quatro raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* reconhecidas como patogênicas, baseada na suscetibilidade do hospedeiro. As raças 1, 2 e 4 são responsáveis por atacar cultivares de banana como Gros Michel, Bloggoe e o subgrupo Cavendish, respectivamente. Devido a esta especificidade patógeno-hospedeiro, essas cultivares são utilizadas como indicadores para agrupar os diferentes isolados destas raças. A raça 3 é patogênica a *Heliconia* sp. (FERNANDES et al., 2006; DALY, 2006).

Embora as características morfológicas e especificidade quanto ao hospedeiro sejam utilizadas para identificar estes organismos, a identificação a nível de espécie, *formae specialis* e raças é bastante difícil, uma vez que vários fatores devem ser consideradas, entre elas os fatores ambientais (WINDELS, 1991). Diante disto, as técnicas moleculares têm se mostrado como abordagens mais rápidas e eficientes e para identificação correta deste grupo de microrganismo (KURAMAE & SOUZA, 2002; LEONG et al., 2009; DITA et al., 2010). Esta identificação precoce pode representar uma vantagem para se empregar alguma medida que vise a eliminação do patógeno ou controle da doença.

2.3 O Silício e a sua importância para as plantas

O Silício é um elemento que tem recebido grande atenção nos últimos anos quanto a sua possível capacidade na indução de resistência e consequente ativação dos mecanismos de defesa de plantas contra patógenos. O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre (27,70%), de ocorrência principal no mineral inerte das areias – o quartzo, bem como na caulinita e outros minerais de argila (EXLEY, 1998; SANTOS, 2008).

O Si encontra-se presente no solo na forma de ácido mono ou polissilícico, adsorvido ou formando precipitados com óxidos de alumínio, ferro e manganês, ou constituindo os minerais silicatados primários ou secundários (McKEAGUE & CLINE, 1963). A única forma absorvida pelas plantas, principalmente pelas silicófilas, é a de monômeros de ácido silícico (H_4SiO_4), solúvel em água e captado pelas raízes das plantas, o qual segue o fluxo de água da superfície da raiz ao xilema por uma via passiva e não seletiva (RAVEN, 1983) quando o pH da solução se encontra abaixo de 9 (MA e TAKAHASHI, 2002).

Baseado nos conceitos de essencialidade dos nutrientes minerais estabelecidos por Arnon & Stout (1939), o Si não seria considerado um elemento essencial, uma vez que um elemento essencial é aquele que: “1- é requerido para completar o ciclo de vida da planta; 2- deve estar diretamente envolvido no metabolismo da planta (como constituinte de molécula, participar de uma reação, etc.); 3- a função do elemento é específica, ou seja, nenhum outro elemento poderá substituí-lo naquela função”. No entanto, muitas gramíneas e algumas outras

espécies, como feijão, apresentam aumento da produtividade com o aumento da disponibilidade de Si no solo (EPSTEIN, 1994). De qualquer forma, alguns pesquisadores consideram o silício como sendo um elemento essencial às plantas (MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA, 2006), pois: conferem à planta aumento da resistência ao ataque de pragas e doenças, aumento na capacidade fotossintética, do número de folhas, do diâmetro de caules e do tamanho das plantas. Favorece ainda, a translocação de carbono para panículas e sementes, aumenta eficiência de uso de água, com diminuição da transpiração e passagem mais rápida da fase vegetativa para a reprodutiva de crescimento (EPSTEIN, 1999; SAVANT et al., 1997; CLARK, 2001; ZUCCARINI, 2008). Os benefícios do silício incluem também melhor absorção de fósforo e aumento da tolerância à toxidez por Al, Mn, Fe entre outros (GALVEZ et al., 1989; TISDALE et al., 1993, ACCIOLY et al, 2009). Para ilustrar o papel do silício, a figura 3, apresenta a contribuição desse elemento para a planta do arroz.

Plantas que são cultivadas em ambientes ricos com Si acabam diferindo daquelas que são cultivadas em ambientes com deficiência deste elemento. As diferenças são encontradas principalmente quanto a: composição química, resistência mecânica das células, características da superfície foliar e tolerância ao estresse abiótico e ao ataque de fungos e pragas (EPSTEIN, 2001).

Devido à grande quantidade deste elemento na massa do solo (50-70%), as raízes de todas as plantas contem alguma quantidade de Si nos seus tecidos. Existe, no entanto, uma grande diferença na acumulação de silício por diferentes espécies de plantas, variando de 0,1% a 10% (peso seco) (EPSTEIN, 1999; MA e TAKAHASHI, 2002; RICHMOND e SUSSMAN, 2003), estes são valores usuais, embora possam ocorrer percentuais menores e maiores. Esta variação na quantidade de absorção do Si é atribuída à diferença de capacidade das raízes em captar este elemento (TAKAHASHI et al., 1990).

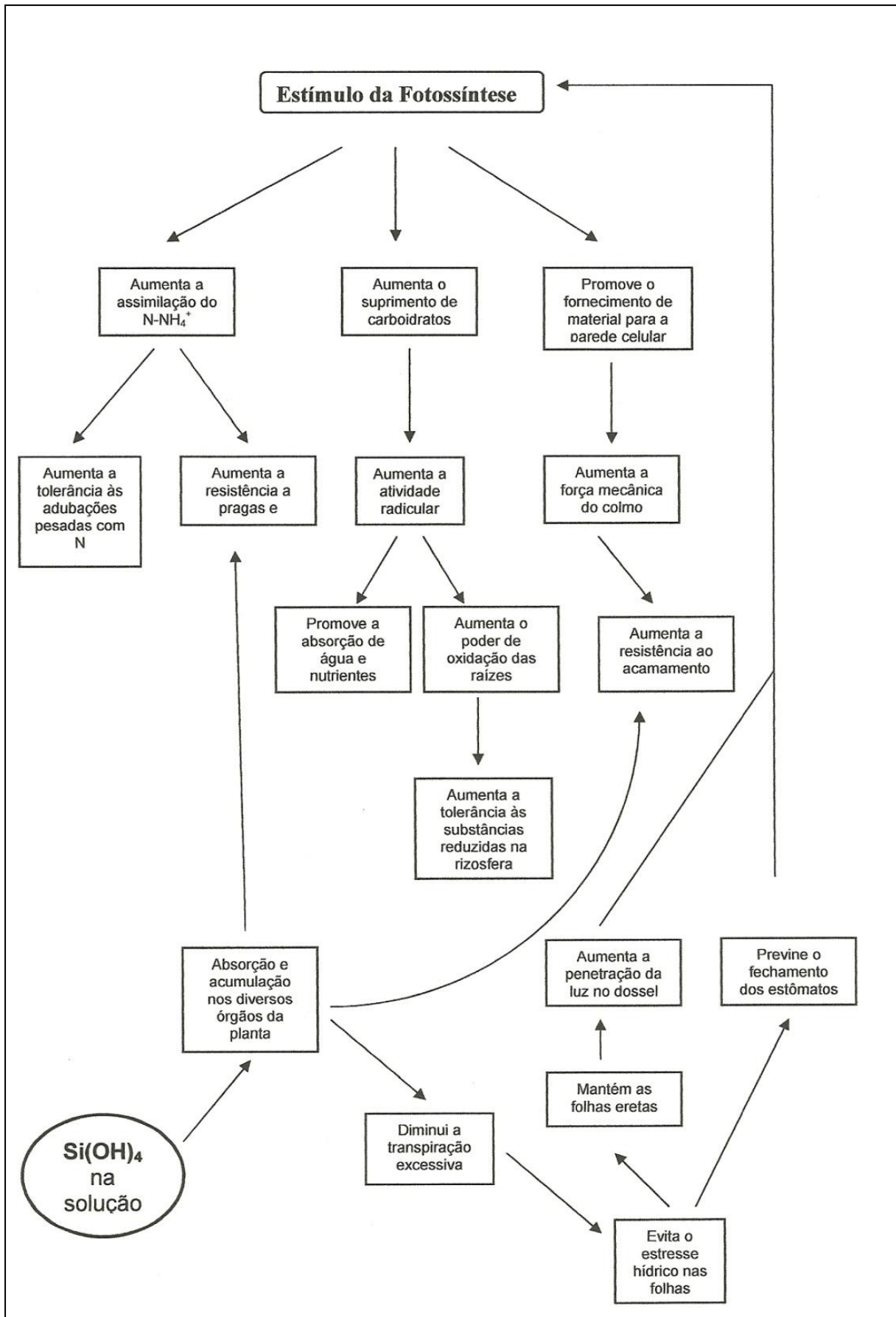


Figura 3. Papel fisiológico do silício na cultura do arroz
Fonte: TAKAHASHI, 1995.

Um estudo utilizando arroz, pepino e tomate, espécies que acumulam grandes, médios e baixos níveis de Si, respectivamente, transportaram o Si da solução externa para as células corticais mediada por um transporte similar com um valor de K_m de 0,15mM nas três espécies, no entanto, os valores máximos V_{max} diferiram entre as espécies estudadas, arroz > pepino > tomate, sugerindo que a densidade do transporte é variável de acordo com as espécies (MITANI e MA, 2005).

De acordo com a sua capacidade em absorver e acumular o silício, as plantas são classificadas em três grupos: I- **acumuladoras**: em geral as monocotiledôneas, que tem processo ativo de absorção de silício possuindo teor foliar acima de 10,0 g Kg⁻¹ de silício na matéria seca; II- **não acumuladoras**: em geral leguminosas, que absorvem silício a favor de um fluxo de transpiração de forma mais lenta que a absorção de água e discriminam o silício na absorção por simplasto, estas são exclusoras na absorção de silício com um teor foliar menor que 5,0 g kg⁻¹ de silício na matéria seca; III- **intermediárias**: têm absorção de silício por simplasto na mesma velocidade que a absorção de água e teor menor que 10,0g kg⁻¹ (TAKAHASHI et al., 1990).

A não absorção do silício pelo mecanismo exclusivo, o qual impede a entrada do Si na planta, acaba resultando em um acúmulo deste elemento na rizosfera (VAN der VORM, 1980; TAKAHASHI et al., 1990). Ma e Takahashi (2006), identificaram um gene (*Lsi1*) que codifica proteínas capazes de controlar a absorção e acúmulo de Si em arroz. Essa proteína pertence à família das aquaporinas, uma proteína similar às proteínas canais de água, localizada na membrana plasmática de células radiculares. Este gene foi principalmente expresso nas raízes, e esta expressão se mostrou constitutiva, no entanto, regulada pelos níveis de Si, diminuindo em cerca de ¼ pela contínua aplicação de Si por 3 dias.

Foram descobertos, recentemente, três transportadores de Si (*Lsi1*, *Lsi2* e *Lsi6*), os quais estão envolvidos na captação e distribuição deste elemento na cultura do arroz (MA et al., 2006; MA et al., 2007; YAMAJI et al., 2008). O *Lsi1* e o *Lsi6* pertencem ao subgrupo das aquaporinas e são responsáveis pelo influxo de ácido silícico (MA et al., 2006; MITANI et al., 2008; YAMAJI et al., 2008), enquanto que o *Lsi2* está envolvido em um transporte de ativo de efluxo de ácido silícico (MA et al., 2007). O *Lsi1* e *Lsi2* são expressos principalmente nas raízes, mas o *Lsi6* é também expressado nas margens e na lâmina das folhas. A perda tanto de *Lsi1* e

Lsi2 causa uma diminuição significativa na captação de Si pelas raízes (MA et al., 2002, 2007), já a perda de Lsi6 não afeta a captação, mas resulta em uma distribuição alterada de Si nos brotos (YAMAJI et al., 2008). Estes resultados indicam que Lsi1 e Lsi2 são os responsáveis pela captação, enquanto que o Lsi6 é responsável pelo transporte do Si fora do xilema.

Estudos também foram conduzidos na cultura do milho (MITANI et al. 2009), visto que é uma cultura que é caracterizada como acumuladora de Si, no entanto, o mecanismo envolvido na captação deste elemento permanecia desconhecido. Foram então, isolados dois genes (*ZmLsi1* e *ZmLsi6*) homólogos aos *OsLsi1* e *OsLsi6*, respectivamente, encontrados na cultura do arroz. O *ZmLsi1* foi expresso principalmente nas raízes, enquanto que o *ZmLsi6* foi mais expressado nas margens e na lâmina das folhas. Diferentemente do *OsLsi1* o nível de expressão dos genes *ZmLsi1* e *ZmLsi6* não foi afetado pela variação na suplementação com o Si. Os autores concluíram que a proteína *ZmLsi1* é um transportador de influxo de Si a partir da solução externa das raízes e que a *ZmLsi6* funciona principalmente como um transportador para descarga no xilema.

Seguindo a captação pelas raízes, concentrações maiores que 90% de Si são translocadas para as partes aéreas via xilema. Quando a concentração de ácido silícico excede 2 mM, quimicamente, o ácido silícico se polimeriza formando sílica gel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). Essa polimerização acontece devido a concentração de ácido silícico pela perda de água (transpiração). O processo de polimerização converte então, ácido silícico a ácido silícico coloidal e finalmente a sílica gel com conseqüente diminuição da concentração de monômeros de ácido silícico. O Si polimerizado é finalmente depositado no material da parede celular como sílica amorfa hidratada, formando uma dupla camada de cutícula de sílica, e também depositado em células específicas dos brotos como corpos de sílica (Figura 4) (MA & TAKAHASHI, 2002; CASEY et al., 2003; PRYCHID et al., 2004; MITANI et al.; 2005).

De acordo com Fauteux et al., (2005), o silício é um elemento bioativo associado com efeitos benéficos nas propriedades mecânicas e fisiológicas das plantas, sendo capaz de aliviar estresses abióticos e bióticos, e ainda aumentar a resistência de plantas contra fungos patogênicos.

O silício, embora não faça parte da lista dos elementos essenciais, é considerado pelos cientistas de solos e nutrição de plantas, fisiologistas e fitopatologistas do mundo todo um elemento útil e benéfico à planta de arroz ou,

ainda, agronomicamente essencial pela função protetora das plantas contra doenças e pragas e outros efeitos positivos que provoca no solo, no crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como no rendimento de grãos (BARBOSA FILHO e PRADHU, 2002).

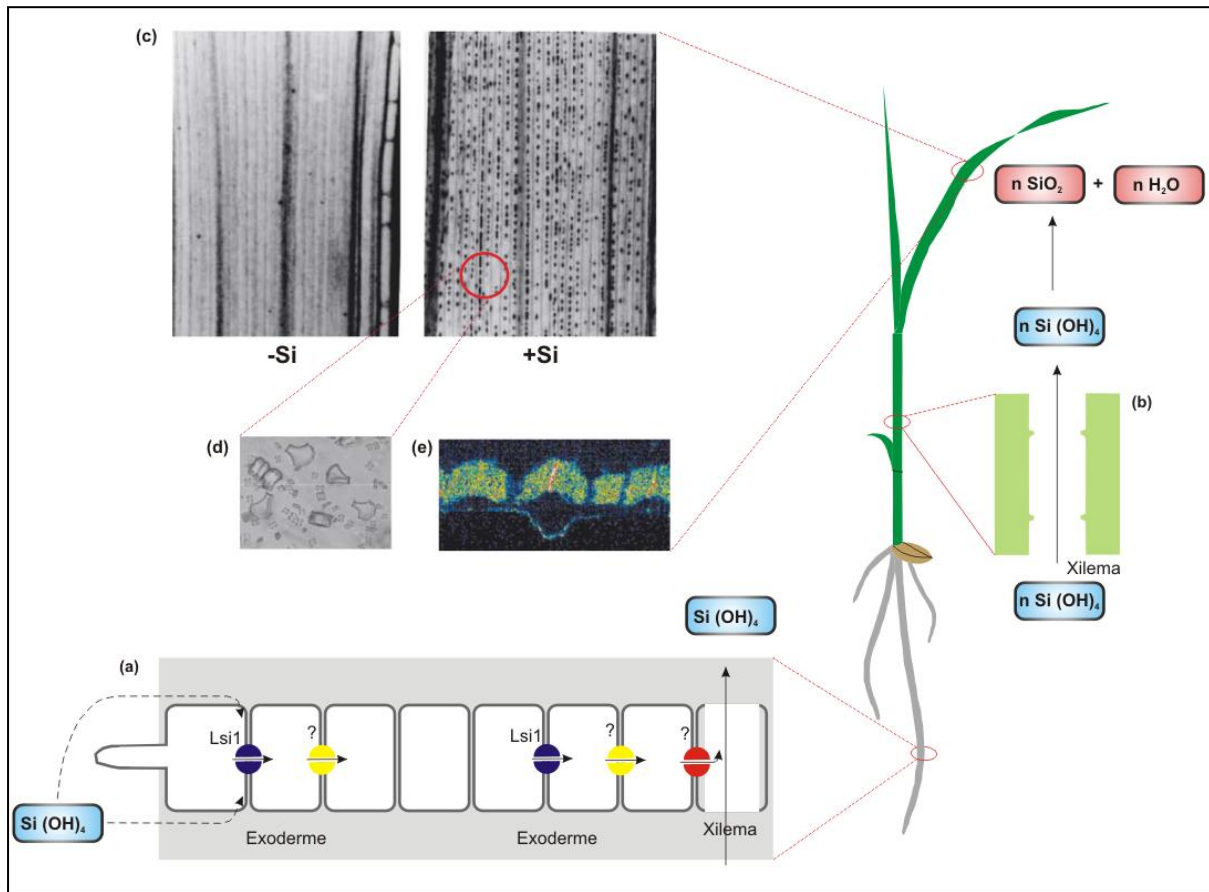


Figura 4. Captação, distribuição e acúmulo de Si em arroz. O Si é levado por transportadores na forma de ácido silícico (a) e então translocado para o broto da mesma forma (b). No broto, o Si é polimerizado em sílica e depositado nas células do xilema (c e d) e abaixo da cutícula (e).

Fonte: Adaptado de Ma e Yamaji, (2006).

Muitos trabalhos têm apresentado resultados promissores quanto à ação desse elemento em vários patossistemas. Na tabela 1 podem ser encontrados exemplos significativos de redução na incidência de doenças de mono e dicotiledôneas.

Tabela 1. Doenças controladas pelo Si em mono e dicotiledôneas.

Cultura	Patógeno	Referência
Abóbora	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Adatia, Besford, 1986; Menzies et al., 1991.
Arroz	<i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Bipolaris oryzae</i> , <i>Corticium sasakii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium oryzae</i> , <i>Gerlachia oryzae</i> , <i>Magnaphorte grisea</i>	Datnoff et al., 1990. 1991; Osuna-Canizales; Dedatta; Bonman, 1991; Mathai; Paily; Menon, 1978; Wang et al., 1994; Winslow, 1992; Rodrigues et al.; 2003; Zanão Junior et al., 2009.
Café	<i>Cercospora coffeicola</i> , <i>Hemileia vastatrix</i> , <i>Meloidogyne exigua</i>	Botelho et al., 2005; Santos, 2002; Pozza, 2004; Amaral, 2005; Nojosa, 2003; Marinati et al., 2008; Silva et al., 2010 (a); Pereira et al., 2009 (a).
Cana-de-açúcar	<i>Puccinia melanocephala</i> e <i>Leptosphaeria sacchari</i>	Fox; Silva, 1978; Raid, Anderson; Ulloa, 1992.
Cevada	<i>Erysiphe graminis</i>	Jiang; Zeyen; Russo, 1989.
Feijão	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Moraes et al., 2006.
Limão	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Faggiani, 2002.
Maçã	<i>Monilinia fructicola</i> L.	Yang et al., 2010.
Melão	<i>Trichothecium roseo</i>	Guo et al., 2007.
Pepino	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Didymella bryoniae</i>	Adatia, Bestford, 1986; Menzies et al., 1991, 1992; Chérif et al., 1992; O'Neill, 1991; Voogt, 1990.
Pimentão	<i>Phytophthora capsici</i>	French-Monar et al., 2010.
Rosa	<i>Sphaerotheca pannosa</i> , <i>Peronospora sparsa</i>	Voogt, 1992.
Soja	<i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>Meridionalis</i> , <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Grothge-lima, 1998. Pereira et a., 2009 (b).
Sorgo	<i>Colletotricum graminocolum</i> ; <i>Striga asiatica</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>	Narwal, 1973; Maiti et al., 1984 e Wu; Hsieh, 1990.
Tabaco	<i>Xylella fastidiosa</i>	Martinati et al., 2007
Trigo	<i>Erysiphe graminis</i> ; <i>Bipolaris sorokiniana</i> ; <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Leusch; Buchenauer, 1989; Domiciano et al., 2010; Zanão Junior et al., 2010.; Silva et al., 2010 (b).
Uva	<i>Uncinula necator</i>	Bowen et al., 1992.

Fonte: Adaptado de MARTINATI, 2008.

Pouco se conhece sobre a importância do Si para a cultura da banana. Jauhari et al. (1974) descrevem que a concentração de Si em plantas jovens pode variar de 0,7 a 3,8%. Existem também algumas evidências de que a resistência contra fungos em plantações de banana está associada com o cultivo desta cultura em vertissolos, os quais apresentam altas concentrações de Si na solução do solo. Além disso, as raízes de banana são capazes de induzir a dissolução de silicatos, aumentando, assim, a disponibilidade de Si na rizosfera (HINSINGER et al., 2001; RUFUIRIKI et al., 2004), já que a concentração desse elemento na solução do solo é governada pela dissolução e formação de silicatos (HENRIET et al., 2008). Estes dados sugerem que a cultura da banana, assim como muitas outras monocotiledôneas, pode possuir mecanismos benéficos de acúmulo de Si.

Kablan et al., (2008), analisando o impacto do Si na cultura da banana contra o fungo *Mycosphaerella fijiensis* causador da Sigatoka negra, sob condições hidropônicas, verificou que as plantas que foram suplementadas com Si apresentaram progressão dos sintomas mais lentamente, a severidade da doença e a infecção foram menores quando comparadas com plantas que não receberam Si na solução. Estes resultados indicam que a suplementação com Si pode reduzir a suscetibilidade da cultura da banana à Sigatoka negra.

Estudos avaliando a capacidade do Si em diminuir efeitos de estresse abiótico (baixas temperaturas) e biótico (mal-do-Panamá) na cultura da banana, também foram realizados, e demonstraram que este elemento foi capaz de diminuir significativamente o efeito de ambos os estresses, quando avaliados individualmente ou quando combinados (KIDANE e LAING, 2008).

Henriet et al., (2006), avaliando o efeito, captação e distribuição do Si em *Musa* spp. sob condições controladas, constataram que o elemento não teve efeito positivo sobre o crescimento desta cultura. Os autores discutem que este fato, contrário ao que se divulga em relação aos efeitos benéficos do Si para o crescimento de diversas culturas, pode ser explicado devido as condições de cultivo neste experimento e que os efeitos benéficos são usualmente mais expressivos quando as plantas são expostas a condições de estresse, geralmente quando cultivadas em campo. Para a captação verificaram que, a quantidade de Si na planta é primariamente determinada pela absorção de água e concentração do Si na solução no solo, existindo uma proporção linear entre essas duas variáveis, e a concentração do Si aumentou na seguinte sequência: raízes < pseudocaule <

pecíolo de folhas jovens < lâmina de folhas jovens < folhas velhas. Ma e Yamaji (2006) discutem que este fato pode ser explicado pelo mecanismo de transpiração da planta, pois a distribuição do Si é controlada pela transpiração dos órgãos da planta. Mais Si acaba se acumulando em tecidos velhos, pois este elemento não é móvel dentro da planta.

Embora estes estudos revelem que o Si exerce importante papel na redução de vários estresses ambientais e aumento da resistência contra patógenos, o exato mecanismo pelo qual o Si confere estas características às plantas, permanece desconhecido.

As primeiras hipóteses relacionando o Si como um elemento capaz de conferir resistência contra patógenos, baseavam-se na sua capacidade em formar complexos com compostos orgânicos na parede celular das células epidérmicas, desta forma aumentando a sua resistência a degradação por enzimas liberadas pelos patógenos (VOLK et al., 1958).

2.4 Resistência de Plantas a Patógenos

As plantas estão constantemente expostas ao ataque de um grande número de organismos patogênicos, como vírus, procariotos (bactérias), eucariotos (fungos e oomicetos) e parasitas multicelulares altamente complexos. Desta forma, durante o percurso da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos diferenciados de defesa que quando acionados percebem a agressão, traduzindo esta percepção em uma resposta apropriada e de forma adaptativa (SILVA et al., 2008).

Segundo van den Berg (2006), embora esta exposição seja constante, nem todos os organismos conseguem causar doenças nas plantas. Esta habilidade do patógeno é dependente de como a planta responde a esta percepção. Se a infecção acontece com subsequente desenvolvimento da doença, a planta é considerada **suscetível** ao patógeno. A suscetibilidade pode ser causada por uma inabilidade da planta em reconhecer o patógeno e/ou produzir uma efetiva e rápida resposta de defesa. Esta interação entre a planta e o patógeno é denominada de interação compatível. Se, no entanto, as plantas são capazes de restringir a multiplicação ou o movimento a partir do sítio inicial de infecção elas são **resistentes** (DEMPSEY e KLESSIG, 1995) e a interação é incompatível. A velocidade e a extensão da resposta de defesa pode estabelecer quando a planta é resistente ou suscetível

(LAMB et al., 1989). A **resistência parcial** é a habilidade da planta sustentar o efeito da doença sem perdas de rendimento ou morte devido a infecção.

As plantas são capazes de produzir ou acumular metabólitos em resposta a estresses tais como invasão de patógenos, seca ou choque térmico. Genes secundários de resistência estão presentes em todas as plantas e exercem um importante papel na defesa não específica da planta através da produção de fitoalexinas, glucanases, quitinases, lignina, caloses e enzimas para proteção ao estresse oxidativo (VAN den BERG, 2006). Estes fatores físicos e químicos pré-formados conferem às plantas o que se denomina de defesa constitutiva. Entre as substâncias produzidas pelas plantas muitas são antimicrobianas, terpenóides ou compostos fenólicos, ambos metabólitos secundários.

Se esses compostos pré-formados não forem suficientes para parar a invasão do patógeno a planta é capaz de ativar defesas induzidas. Esta resistência induzida (também denominada de resistência basal ou resistência basal induzida) envolve a formação de barreiras histológicas para o ingresso e progressão do patógeno, principalmente reforçando as paredes celulares (MÉTRAUX, 2007). Além disso, barreiras químicas na forma de moléculas antimicrobianas são sintetizadas, incluindo proteínas relacionadas à patogênese (PR - proteínas) (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999) e fitoalexinas. Diferente da defesa constitutiva, a resistência induzida se inicia com o reconhecimento de um patógeno ou pela exposição a um indutor químico ou estresse levando subsequente a uma cascata de eventos de transdução de sinais que irá ativar genes da célula vegetal hospedeira, resultando em uma rápida resposta de defesa (MAUCH-MANI & MÉTRAUX, 1998). Esta resistência adicional pode ser expressa localmente ou sistemicamente em tecidos não infectados da planta (MÉTRAUX, 2007). Este tipo de resistência tem sido denominado como Resistência Sistêmica Adquirida (RSA - SAR) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI - SIR), as quais ao longo dos anos foram consideradas sinônimos e de funções análogas. Atualmente, no entanto, estudiosos acordam sobre a diferença das formas através das quais esses mecanismos de resistência são induzidos, desta forma, RSA e RSI são fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes (SILVA et al., 2008), onde plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução, como também em outros locais dele distantes de forma mais ou menos generalizada (BARROS et al., 2010).

A RSA é caracterizada pela manifestação ou produção de um sinal liberado a partir do sítio de infecção que provoca a necrose e a translocação deste sinal para outras partes da planta, induzindo reações de defesa que protegerão a planta contra agressões subsequentes. Já na RSI, o indutor não provoca sintomas, como necrose no local da infecção, mas que induz a planta a se proteger sistemicamente (SILVA et al., 2008).

Métraux (2001), afirma que pesquisadores têm assumido que RSA envolve o acúmulo de Proteínas Relacionadas com Patogênese (PRPs) como mecanismos induzidos de defesa da planta, sua indução é salicilato-dependente e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. Contrariamente, em RSI, não há acúmulo de PRPs, o agente indutor é usualmente um microrganismo não-patogênico e sua indução não é salicilato-dependente, parecendo haver outra rota de sinalização mais associada à jasmonatos e etileno.

Na figura 5 é apresentado um esquema resumido da Resistência Sistêmica Adquirida e Induzida.

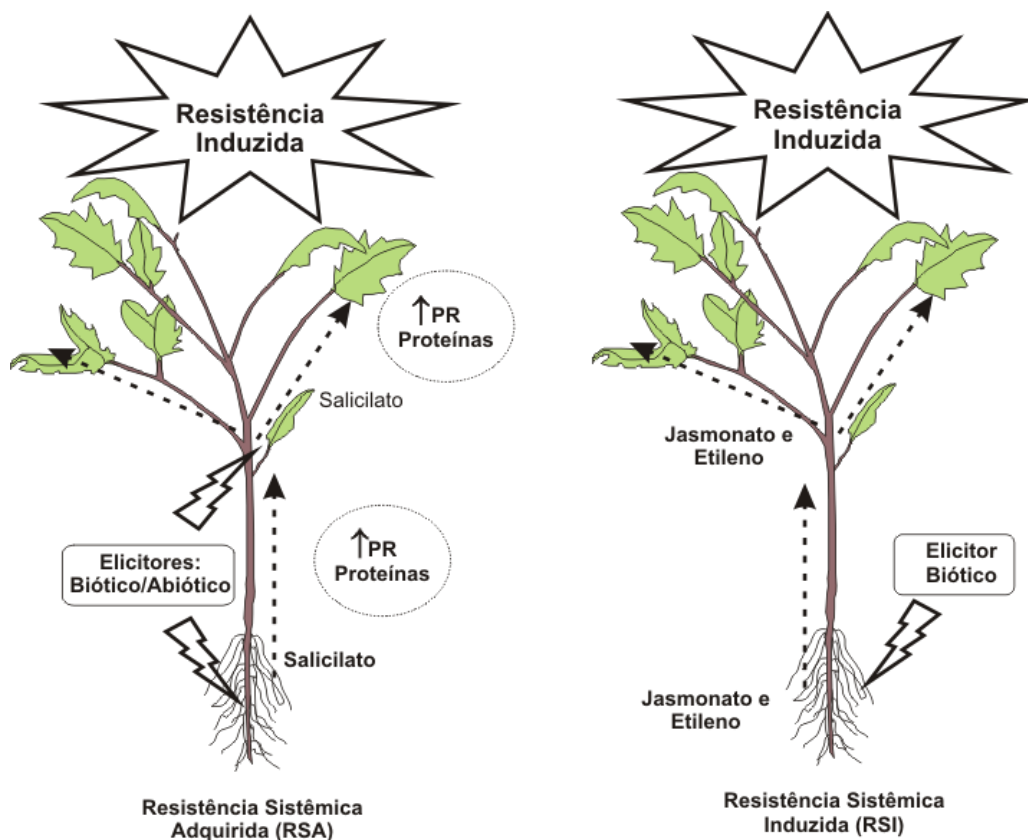


Figura 5. Comparação das duas formas mais caracterizadas de resistência sistêmica em plantas, ambas levando a respostas fenotípicas semelhantes. Resistência Sistêmica Adquirida, induzida pela exposição da raiz e tecido foliar a elicitores bióticos ou abióticos, é dependente do fitohormônio salicilato (ácido salicílico) e associada com acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas). Resistência Sistêmica Induzida,

induzida pela exposição das raízes a cepas específicas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, é dependente dos fitohormônios jasmonato (ácido jasmônico) e etileno, independente de salicilato, e não está associada com a acumulação de PR proteínas. Entretanto, ambas respostas são entrelaçadas molecularmente.

Fonte: Adaptado de Vallad & Goodman (2004).

De acordo com Silva et al. (2008), a ativação de defesas em plantas pode ocorrer a partir da elicitação por compostos presentes em extratos de plantas, preparações de leveduras, exopolissacarídeos bacterianos, rizobactérias promotoras de crescimento, fungos promotores de crescimento, e ainda raças não virulentas do patógeno, além do próprio patógeno inativado pelo calor. Pode-se ainda utilizar elicitores químicos ou físicos, como silício (Si), ácido salicílico (AS), ácido D-L-aminobutírico (BABA), quitosana, cloreto férrico, fosfato de potássio dibásico, acibenzolar-S-metil (ASM), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), fosfato de potássio monobásico, ácido jasmônico (AJ), metil jasmonato (MeJa), ácidos graxos ou luz em comprimento de ondas específicos (SILVA et al., 2008).

2.4.1 Ativação dos mecanismos de defesa

A ativação dos mecanismos de defesa da planta ocorrem por meio de sucessivos eventos e sinais que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor levando a ativação de barreiras físicas e químicas envolvidas no processo (FERNANDES et al., 2009). Segundo Cavalcanti et al. (2005), durante uma indução de resistência muitos mecanismos podem ser ativados, pois a planta tenta evitar o estabelecimento de relações parasitárias e o patógeno tenta anular o efeito inibitório gerado (GÓMEZ-GOMEZ, 2004). Respostas de defesa, tais como a produção de PR proteínas (1,3 β -glucanases e quitinases) podem ser induzidas muitas horas ou dias após a infecção (LAMB et al., 1989; BOWLES, 1990). O fator crucial que determina o sucesso destes mecanismos é a velocidade de sua ativação (GLAZEBOOK, 1999).

O reconhecimento é considerado como sendo o estágio inicial para que ocorra uma resposta de defesa da planta contra um patógeno. Este reconhecimento pode ocorrer através de interações físicas tais como adesinas, fibrilas, flagelo, sistema de secreção tipo III e IV ou pela sinalização de pequenas moléculas (REIS, 2005). O sistema tipo III realiza o transporte de proteínas do organismo invasor para o citoplasma das células do hospedeiro, que são responsáveis pela patogenicidade

e virulência, como também a eliciação de mecanismos de defesa da planta e o sistema tipo IV está relacionado com o transporte de DNA e também proteínas para as células do hospedeiro, o qual contribui para a inserção de fatores de virulência e patogenicidade (BURNS, 1999; BÜTTER e BONAS, 2003). Uma vez que a planta tenha reconhecido o ataque do patógeno, a reação se inicia. A planta tenta impedir a infecção e minimizar os potenciais danos, enquanto que o patógeno, tenta obter nutrientes para o crescimento e reprodução (SCHMELZER, 2002).

A resistência em plantas é inata devido a presença de genes que codificam para proteínas relacionadas com receptores ou proteínas que funcionam como receptores, as quais podem se ligar diretamente a moléculas derivadas do patógeno ou representar constituintes de grandes complexos protéicos para a percepção de sinais (SCHMELZER, 2002). Isto resulta em uma cascata de eventos bioquímicos na planta levando a indução de respostas de defesa (KEEN, 1992; DIXON et al., 1994; BARON & ZAMBRYSKI, 1995).

Um dos principais eventos de resposta de defesa contra patógenos, chamado de resposta hipersensível (*Hypersensitive Response* – HR), se caracteriza pelo rápido e localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, sendo um processo ativo do hospedeiro podendo ser considerado como uma morte programada de células (GREENBERG & YAO, 2004), ocasionada pela liberação de compostos tóxicos, os quais podem, ocasionalmente, atuar diretamente sobre o patógeno, levando a sua morte (AGRIOS, 2004).

A lignificação é um dos muitos eventos bioquímicos que resultam em uma parede celular reforçada modificada ultra estruturalmente (WALTER, 1992). A lignina promove uma rigidez e reforço mecânico ao tecido da planta, impermeabiliza elementos do xilema, funcionando como estratégia de defesa contra ataques de patógenos. A formação se dá comumente em resposta a penetração microbiana e danos mecânicos (WARDOP, 1971), sendo resistente à degradação pela maioria dos micro-organismos (KIRK, 1971; KIRK et al., 1979). A lignina é uma matriz polimérica que inclui material de fibras celulósicas que restringe a difusão de enzimas e toxinas dos fungos para as plantas e de nutrientes e de água das plantas para os fungos (RIDE, 1978).

A lignificação segue a teoria receptor-elicitor, no qual o gene de resistência do hospedeiro codifica uma proteína receptora que reconhece especificamente uma molécula produzida pelo patógeno (CAMARGO, 1995). Vance et al. (1980),

propuseram que mais de um elicitor pode funcionar com um único receptor e que dois ou mais receptores podem independentemente ativar os mecanismos de resistência. Precusores de lignina de baixo peso molecular são produzidos pela planta e podem atuar como elicitores. Estes precusores são possivelmente capazes de reagir com as paredes fúngicas e polímeros de membrana para ativar o sistema de reconhecimento ou bloquear a ativação por outras combinações (VANCE et al., 1980).

Outro grupo de substâncias ativadas para promoção da defesa de plantas, são as fitoalexinas, substâncias tóxicas antimicrobianas produzidas em maiores quantidades após a estimulação por micro-organismos fitopatogênicos, ou por injúrias mecânicas ou químicas (AGRIOS, 2004). São acumuladas ao redor de células de plantas saudáveis, feridas ou células infectadas e são estimuladas por substâncias que se difundem das células feridas para tecidos saudáveis adjacentes (AGRIOS, 2004). A resistência ocorre quando uma ou mais fitoalexinas alcançam concentrações suficientes para restringir o desenvolvimento do patógeno. A maioria das fitoalexinas são produzidas em resposta a infecções fúngicas e acabam inibindo o crescimento dos fungos, mas algumas fitoalexinas são tóxicas para nematóides e bactérias (VAN DEN BERG, 2006).

Durante a reação de defesa, há a formação de espécies reativas de oxigênio devido à combustão oxidativa, alteração do potencial de membrana e aumento na concentração de moléculas sinalizadoras. Ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno, óxido nítrico e as espécies reativas de oxigênio são exemplos de sinalizadores para a ativação de genes envolvidos na resposta de resistência (GLAZEBROOK 1999; SINGH et al., 2002; FARMER et al., 2003; WENDEHENNE et al., 2004). Tais moléculas sinalizadoras podem induzir a expressão de proteínas protetoras. Estas proteínas são produzidas pela planta hospedeira, mas induzidas sobre condições patológicas (VAN LOON & STRIEN, 1999), entre elas estão as PR proteínas, citadas anteriormente. Como exemplos de PR proteínas, podem-se citar as quitinases, peroxidases e glucanases (KITAJIMA & SANTO, 1999). Algumas dessas PR-proteínas encontram-se expressas, embora em baixos níveis, de forma constitutiva em plantas, ou seja, sob condições normais. Entretanto, seus níveis são aumentados quando as plantas são submetidas a estresses. Há outras que, embora não sejam detectadas em condições fisiológicas normais, têm seus genes correspondentes ativados, vindo a ser detectadas nos tecidos vegetais após injúria,

após o ataque de patógenos e/ou pragas e sob condições de estresses ambientais do tipo salinidade, seca e baixas/altas temperaturas (BERNARDS et al. 1999; MARTINS-MIRANDA, 2002).

O ácido salicílico (AS) é uma molécula sinalizadora, a qual exerce importante papel como molécula de sinalização envolvida na geração eficiente de uma resposta hipersensitiva (RH) local, resistência local adquirida e resistência sistêmica adquirida (GAFFNEY et al., 1993; CHAMNONGPOL et a., 1998; REYMOND & FARMER, 1998). O AS é sintetizado a partir da rota do chiquimato que pode ser direcionada por dois caminhos: a via dos fenilpropanóides e a via do isocorismato. Na resposta de hipersensibilidade, onde ocorre a morte celular, foi sugerido que o ácido salicílico é biossintetizado pela via dos fenilpropanóides e durante a RSA, a síntese do AS ocorre pela via do isocorismato (WILDERMUTH et al., 2001; STRAWN et al., 2007).

A síntese de AS pode induzir a produção de PR-proteínas e, conseqüentemente, proteger as plantas contra o ataque de patógenos. Além disso, pode gerar em várias plantas a produção de um composto volátil, o metil-salicilato (MeSa) que, por sua vez, pode induzir plantas a sintetizar o AS, podendo tornar plantas saudias resistentes ao ataque de patógenos, induzindo a produção de PR-proteínas e a ativação de genes de resistência (SHULAEV et al., 1997; SPLETZER & ENYEDI, 1999).

A descoberta de um análogo funcional do ácido salicílico, o Acibenzolar-S-Metil (ASM), abriu caminho para o estudo utilizando compostos sintéticos para desenvolvimento de produtos que possuem a capacidade de ativar a resistência sistêmica contra diversos patógenos em diferentes culturas. A utilização do ASM tem tido comprovada eficiência na indução de resistência sistêmica adquirida, sendo então considerado um Ativador de Plantas (CASTRO et al., 2007; WHAN et al., 2009). Os indutores podem atuar de diferentes formas, porém, sempre levando à ativação do sistema de defesa das plantas (RODRIGUES, et al., 2006).

A busca pela utilização de compostos ativadores da resistência sistêmica adquirida em plantas surge como uma alternativa para o controle de doenças.

2.4.2 Atividade do Si na indução de resistência a doenças

Wagner (1940) relata pela primeira vez a ação do Si sobre a redução da severidade de uma doença. Ele observou uma relação direta entre deposição de ácido silícico nos sítios de infecção do oídio e o grau de resistência da planta. Houve uma silificação das células epidérmicas, sugerindo que a penetração do apressório foi impedida pelo Si, o qual agiu como uma barreira física. O Si atuou de forma análoga à lignina, componente estrutural resistente à compressão (MARTINATI, 2009).

Durante muito tempo acreditou-se que o papel do Si estava restrito a uma defesa física, entretanto, a barreira física proporcionada pelo Si nas células epidérmicas não é o único mecanismo de combate à penetração das hifas de fungos. A resistência mediada pelo Si contra patógenos está associada também com o acúmulo de compostos fenólicos e fitoalexinas como também com a ativação de alguns genes PR (RODRIGUES & DATNOFF, 2007).

Embora muitos estudos sugiram que Si ativa mecanismos de defesa da planta, a exata natureza da interação entre o elemento e as vias bioquímicas que levam a resistência, permanecem desconhecidos. O Si possui propriedades bioquímicas únicas que podem explicar a sua bioatividade como um regulador do mecanismo de defesa de plantas.

O ácido monossilícico pode atuar como um modulador influenciando o tempo e extensão de respostas de defesa das plantas agindo como mensageiro secundário. Os mensageiros secundários apresentam duas importantes funções: a) envolvimento na transferência de informações a partir do complexo hormônio-receptor para as proteínas-alvo e b) amplificam o sinal produzido pelo hormônio (HAVEN et al., 2007) na ativação da resistência sistêmica adquirida; ele pode também se ligar a grupos hidroxilas orgânicas presentes em resíduos de aminoácidos formando compostos estáveis (INGRI, 1978). Assim, acredita-se que quando o Si se liga ao grupo hidroxila de proteínas quinases poderia provocar alterações de atividade ou conformacional nesta proteína, a qual, através da fosforilação, é responsável pelo transporte de informações ao núcleo; ou pode ainda interferir com co-fatores catiônicos de enzimas influenciando eventos relacionados à patogênese (FAUTEUX et al., 2005). O Si pode, portanto, interagir com vários

componentes chaves do sistema de sinalização de estresse em plantas levando à indução de resistência.

No entanto, a resistência induzida pelo Si é rapidamente perdida quando este elemento é removido do meio, enquanto que a RSA é caracterizada pelo efeito durável (FAWE et al., 1998). De acordo com Martinati (2008), essa diferença no efeito protetor do Si em relação à RSA pode ser resultado das propriedades do Si dentro da planta, requerido na forma solúvel, mas apresenta-se na forma polimerizada dentro da planta, como discutido anteriormente. Embora seja um mecanismo altamente eficiente, a indução de resistência por elicitores antes da infecção, desvia o metabolismo energético de seu padrão normal, podendo resultar em perdas de produção. A vantagem da fertilização silicatada é que o Si parece induzir o mecanismo de defesa somente em resposta ao ataque do patógeno (MARTINATI, 2008).

Cai et al., (2008) avaliando os mecanismos fisiológicos e citológicos pelos quais o Si induz resistência contra a brusone em arroz, verificaram que aplicações exógenas de Si reduziram a doença em 45% e 56%, em plantas susceptíveis e resistentes, respectivamente. Alterações no conteúdo de lignina e atividade de enzimas relacionadas à defesa, peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO) e fenilalanina amônia- liase (PAL - FAL) só foram detectados quando os cultivares foram inoculados com o *Magnaporthe grisea*, resultados diferenciados foram obtidos com as cultivares não inoculados.

Segundo Moldes et al., (2006), a aplicação de diferentes concentrações de Si promove a atividade de enzimas antioxidantes tais como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaicol peroxidase (GOPX) e superóxido dismutase (SOD), a variação dos níveis de peroxidação lipídica e as relações entre os mecanismos antioxidantes das folhas e raízes de algodão.

Analisando a influência do Si em eventos citológicos e bioquímicos em cultivares de arroz resistentes e susceptíveis, Rodrigues et al., (2005) verificaram que houve um acúmulo diferencial de transcritos de glucanase, peroxidase e PR-1 em plantas susceptíveis quando suplementadas com este elemento. Estes resultados demonstram uma participação ativa do Si na defesa de arroz contra *Magnaporthe grisea*. Com esse estudo foi possível comprovar que o Si é capaz de alterar características moleculares e citológicas que estão envolvidas no fenômeno de aumento de resistência contra o patógeno.

A resistência induzida pelo Si ainda é capaz de modificar a estrutura polissacarídica da parede celular péctica, protegendo plantas de tomate contra *Ralstonia solanacearum*. Este fato pode ser explicado pela grande afinidade das formas de ácido monossilícico em formar compostos de polihidroxis orgânicos tais como orto-difenóis, os quais participam na síntese de lignina na parede celular durante o desenvolvimento da planta ou durante ataque de patógenos (DIOGO & WYDRA, 2007).

A síntese de fitoalexinas em plantas de trigo tratadas com Si em resposta à infecção com oídio foi relatada por Rémus-Borel et al., (2005), através de observações microscópicas, revelando que estas plantas produzem elevados níveis de compostos fluorescentes em resposta a um tratamento utilizando o Si como elicitor seguido pela infecção com o patógeno. Estes resultados foram significativamente importantes, pois fornecem evidências da produção de compostos antifúngicos como parte da resposta de defesa dessa cultura quando suplementada com Si.

Segundo Menzies et al., (1991) uma rápida deposição de compostos fenólicos ou lignina nos sítios de infecção é um mecanismo de defesa contra o ataque de patógenos e a presença de Si solúvel seria um facilitador deste mecanismo de resistência.

Ainda mais recentemente, Domiciano et al., (2010) relatam que a utilização do Si promoveu uma redução significativa da doença provocada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana* na cultura do trigo. Os autores verificaram que houve um aumento na atividade de algumas enzimas, como quitinase, peroxidase e polifenoloxidase nos tratamentos que foram suplementados com o elemento e inoculados com o fungo. Este resultado é mais uma evidência da atuação do Si como um elemento capaz de ativar o sistema de defesa das plantas.

Pode-se observar, diante do exposto, que o Si está envolvido em vários aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos das plantas, portanto, promovendo melhorias no metabolismo, ativando genes e enzimas relacionadas com os mecanismos de defesa de plantas.

2.4.3 Genes selecionados para análise da quantificação relativa por PCR em Tempo Real

Durante o curso de sua evolução, plantas e patógenos desenvolveram uma relação intrincada, resultando da contínua modificação de informações moleculares. Os patógenos desenvolveram um conjunto de estratégias ofensivas para parasitar as plantas, conseqüentemente, as plantas desenvolveram uma grande variedade de mecanismos de defesa (BENHAMOU, 1996). Resistência sistêmica adquirida ou a indução de resistência a patógenos é uma abordagem promissora para o controle de doenças em plantas. Fatores exógenos ou endógenos podem substancialmente afetar a fisiologia do hospedeiro levando a uma rápida e coordenada ativação de genes de defesa em plantas normalmente expressando suscetibilidade a infecção do patógeno (MANDAL et al., 2009). Este fenômeno, de resistência em plantas a patógenos pode ser aumentado através da aplicação de vários agentes bióticos e abióticos, chamados de indutores de resistência sistêmica em plantas (HOUSSEIN et al., 2010), sem qualquer alteração do genoma da planta, ocorrendo de maneira não-específica, por meio da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa (STADNIK, 2000; HAMMESCHMIDT et al., 2001).

A utilização de compostos químicos ativadores de resistência tem se mostrado como uma tendência para controle de patógenos. Da mesma forma que o ácido salicílico, o acibenzolar-S-metil (ASM), fornece proteção contra o mesmo espectro de patógenos e ativa os mesmos genes quando comparado com a indução biológica da RSA (FRIENDRICH et al., 1996). Por este motivo, para este trabalho, foram escolhidos genes que foram previamente identificados em banana após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FORSYTH, 2006; VAN DEN BERG et al., 2006), para estudar se o silício estaria envolvido na indução da expressão de tais genes, constituindo-se desta forma um possível ativador de resistência.

As catalases são enzimas com função de oxidoredutase, proteínas tetraédricas, constituídas de 4 grupos heme. Estão presentes em todas as células de plantas, animais e microrganismos aeróbicos (SCANDALIOS, 1990). Sendo responsáveis pela regulação dos níveis de H_2O_2 no interior das células, convertendo-o em H_2O e O_2 (RESENDE et al., 2003). Moléculas como H_2O_2 (espécies reativas de oxigênio) são necessários para ativação da morte celular do hospedeiro, sendo

também componentes de um sistema altamente amplificado e integrado de defesa. Este sistema envolve a ativação de fluxo de íons, mudanças nos padrões de fosforilação de proteínas, de pH extracelular, do potencial de membrana, e perturbações no nível de Ca^{2+} citosólico que ativam a expressão local de genes de resistência e podem exercer um papel importante nas rotas que levam a resposta de hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida (ROMERO-PUERTAS e DELLEDONNE, 2003; MA et al., 2008).

Embora as espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorram normalmente no metabolismo celular, quando se acumulam tornam-se tóxicas às células do hospedeiro. De acordo com Moller (2001), esses radicais podem reagir com proteínas e assim reduzir a atividade de enzimas, reagir com lipídios e aumentar a permeabilidade de membranas e ainda reagir com o DNA causando mutações. Portanto, como o acúmulo de EROs pode resultar em prejuízos consideráveis, a célula dispõe de vários mecanismos para detoxificar eficientemente essas espécies ativas de oxigênio (RESENDE et al., 2003), como as catalases. Por este motivo foi um dos genes selecionados para verificação do nível de expressão. Uma vez que a produção das EROs é frequentemente uma das primeiras respostas de defesa ativadas em plantas e pode ser responsável por desencadear o início da resposta de hipersensibilidade (GRANT e LOAKE, 2000).

Outro gene analisado neste estudo foi a fenilalanina amônia-liase (PAL), que codifica para uma enzima que é amplamente estudada devido seu importante papel no metabolismo secundário das plantas. Sua função é catalisar a eliminação não oxidativa da amônia L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico, o qual é o primeiro produto formado na rota biossintética dos fenilpropanóides em plantas superiores (JONES, 1984; RITTER; SCHULZ, 2004). Esse importante papel está ligado diretamente com a sua participação no fenômeno de resistência sistêmica adquirida (MORAES, 1998). A PAL tem sido encontrada principalmente em plantas superiores, mas também está presente em fungos (RÖSLER et al., 1997) e bactérias (XIANG; MOORE, 2005), mas não em animais (RÖSLER et al., 1997). Na planta, é encontrada principalmente dispersa no citoplasma das células em geral, embora possa estar associada a organelas membranosas (JONES, 1984; DIXON; PAIVA, 1995). É uma proteína codificada por muitos genes, evidenciando o alto grau de importância para a planta, podendo ter múltiplas combinações entre os monômeros

da enzima, cuja combinação estaria em função do estímulo indutor e que direcionaria para a produção de um produto final específico (DIXON; PAIVA, 1995).

O ácido *trans*-cinâmico é precursor de numerosos compostos fenilpropanóides que realizam várias funções essenciais na planta (RITTER; SCHULZ, 2004). Estes compostos incluem lignina e fitoalexinas isoflavonóides, ambos envolvidos nas reações de defesa das plantas (HAHLBROCK; SCHEEL, 1989). A PAL além de ser importante no desenvolvimento normal da planta, mantendo de forma constitutiva essas características, é também uma enzima chave indicadora de estresse da planta (RITTER; SCHULZ, 2004). A atividade da PAL aumenta em resposta a estresses (abióticos e bióticos), aumentando a síntese dos protetores.

O último gene escolhido para análise foi o *pr3*, o qual é responsável pela codificação da enzima quitinase. Enzima citada por exercer um papel muito importante na indução de resistência contra fungos (VAN LOON, 1997; OLIVEIRA et al., 2004). A PR-3 é constituída por endoquitinases que são agrupadas em seis classes distintas (I, II, IV, V, VI e VII), atuando diretamente nas paredes celulares de fungos, hidrolisando os polímeros de quitina, enfraquecendo-o e tornando as células osmoticamente sensíveis (GUZZO, 2003). A hidrólise dos constituintes das paredes celulares dos fungos pelas quitinases leva a inibição do crescimento de vários fungos *in vitro* (PUNJA, 2006). Genes que codificam para a quitinase tanto de plantas como de microrganismos têm sido extensamente usados na geração de arroz transgênico resistente a fungos patogênicos (PUNJA, 2006). Desta forma a verificação do possível aumento da expressão de tal gene pelo Silício poderia ser um indicador efetivo para sua utilização com ativador de plantas.

Capítulo 1

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM BANANEIRA CULTIVADA
COM SILÍCIO E INOCULADA COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

RESUMO

Santos, A. F. J. Análise da expressão gênica em bananeira cultivada com Silício e inoculada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Dentre os problemas fitossanitários da bananeira, o mal-do-Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), é uma das doenças mais importantes. Como o controle usando fungicidas é inviável, a busca por medidas efetivas e ecologicamente corretas têm sido estudadas. O Silício (Si) tem sido relatado como tendo capacidade em controlar várias doenças em diversas culturas. O seu emprego na cultura da bananeira poderia representar uma opção para o controle do mal-do-Panamá. O objetivo deste trabalho foi verificar se o Si é capaz de ativar a expressão de genes de defesa indentificados em banana contra o *Foc*. Mudanças das cultivares Maçã e Grande Naine, suscetível e resistente, respectivamente, foram plantadas em solos suplementados ou não com Si e em seguida inoculadas com *Foc*. Amostras de raízes em diferentes tempos foram coletadas para a análise da expressão dos genes *catalase*, *pal* e *pr3*, utilizando PCR em Tempo Real com a metodologia SYBR Green. O controle endógeno utilizado foi o gene *Musa* 25S rRNA. A utilização simultânea de Si e inoculação com *Foc* apresentou apenas efeito na expressão da *catalase* para a cultivar Maçã nas primeiras horas após a inoculação, esta interação inibiu a expressão da *pal* e *pr3*. O tratamento contendo apenas Si só apresentou efeito significativo para o gene *pal* na cultivar Maçã; os tratamentos não suplementados com Si e inoculados com o *Foc*, apresentaram a mesma taxa de expressão que o controle negativo para os genes *catalase* e *pal* em ambas as cultivares; o controle negativo teve uma ação efetiva na ativação do gene *pr3* para a cultivar Grande Naine. Os dados poderão ajudar no entendimento dos efeitos do Si na expressão dos genes estudados.

Palavras-chave: mal-do-Panamá, fertilização silicatada, expressão gênica.

ABSTRACT

Santos, A. F. J. Analysis of gene expression in banana cultivated with silicon and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Panama disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) is among the most important banana diseases worldwide. Disease control with fungicides is not feasible and environmentally-friendly control methods have been searched for. Silicon (Si) has been reported as able to control several diseases in multiple crops and its application on bananas might represent an option against *Foc*. The objectives of this study were to verify if Si supplementation is capable of activating the expression of genes putatively involved in defense response of bananas against *Foc*. The Maçã and Grande Naine cultivars, susceptible and resistant to *Foc*, respectively, were planted in soils amended with Si and subsequently inoculated with *Foc*. Root samples were collected at different time points and used to extract RNA to study the expression of the *catalase*, *pal* and *pr3* genes by Real Time PCR with the SYBR Green methodology. The simultaneous use of Si and inoculation with *Foc* influenced the expression of *catalase* for cultivar Maçã in the first hours after inoculation. Si and *Foc* also inhibited the expression of the genes *pal* and *pr3* for both Maçã and Grande Naine cultivars. The negative control showed high levels of *pr3*, *pal* and *catalase* expression in both Maçã and Grande Naine. Si application showed a significant effect only in the expression of the *pal* gene in the Maçã cultivars. The treatment with Si application and inoculation with *Foc* showed the same expression level of the negative control for *catalase* and *pal* in both cultivars. These data will be important for understanding the complex defense responses of bananas against *Foc* under the influence of Si.

Key-words: Panama disease, silicon fertilization, gene expression.

1.0 INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea herbácea, pertencente à família Musaceae e originária do Sudoeste da Ásia, está presente em mais de 120 países, ocupa cerca de nove milhões de hectares, se destacando como a fruteira mais consumida no mundo. O seu cultivo é uma das atividades agrícolas mais antigas do Brasil.

Embora o Brasil apresente uma grande área de produção, a produtividade desta cultura está em torno de 14 t ha^{-1} , muito abaixo das 35 t ha^{-1} observadas na Índia (FAO, 2010), colocando o Brasil na 5ª posição no *ranking* de produtividade, o que representa cerca de 10% da produtividade mundial. Esta baixa produtividade está associada à incidência de pragas, mas principalmente, ao baixo nível de tecnologia que é dispensado ao cultivo da bananeira na maior parte das áreas produtoras, levando à constatação de bananais mal manejados, mal nutridos e com alta incidência de pragas.

O mal-do-Panamá é uma das doenças que ataca esta cultura, causando graves danos econômicos. O agente etiológico é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*). O fungo sobrevive na forma de clamidósporos em tecido em decomposição de banana e no solo até sua germinação ser estimulada pelas raízes do hospedeiro, exsudatos das raízes de espécies não-hospedeiras, ou contato com pedaços frescos de plantas não-colonizadas (STOVER, 1962).

Como a utilização de fungicidas é inviável para o controle desta doença, medidas alternativas de controle estão sendo estudadas para minimizar as perdas na produção ocasionadas pela doença.

O Silício é um elemento que tem recebido grande atenção nos últimos anos quanto a sua possível capacidade na indução de resistência e consequente ativação dos mecanismos de defesa de plantas contra patógenos em diversas culturas. Para a cultura da bananeira pouco se sabe sobre a influência deste elemento na ativação de mecanismos de defesa, embora tenham sido constatados efeitos positivos da redução da incidência do mal-do-Panamá em cultivos suplementados com o Si.

Embora se reconheça a participação do Si no aumento da resistência de plantas a patógenos, o exato mecanismo pelo qual essa resistência é ativada permanece desconhecida. As primeiras evidências sugeriam que o Si formasse

polímeros no interior das plantas e formando uma espécie de barreira física, desta forma impedindo a entrada do patógeno. Posteriormente, muitos estudos evidenciaram que além desta barreira física, a suplementação com Si teria a capacidade de induzir na planta um aumento da concentração de compostos, como fitoalexinas. Assim surgiram as primeiras evidências da participação do Si na ativação de vias bioquímicas, conferindo resistência nas plantas contra patógenos.

O objetivo deste trabalho foi verificar a expressão de genes envolvidos com o mecanismo de defesa em bananeiras das cultivares Maçã e Grande Naine suplementadas com Si e inoculadas com *Foc*, na tentativa de elucidar se este elemento tem participação na ativação da expressão de genes de defesa da planta

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio em Casa-de-vegetação

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em vasos com 2 kg de solo. Foram utilizados dois genótipos de bananeira, um suscetível (Maçã) e um resistente (Grande Naine) ao mal-do-Panamá causado pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Foram coletadas amostras de Latossolo Amarelo Distrocoeso, no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – Bahia, na profundidade de 60 cm, apresentando textura franco argilo arenosa. O solo foi seco ao ar, destorroado e peneirado em malha 4 mm. Foram retiradas subamostras peneiradas em malha 2 mm para caracterização química e física. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas e no Laboratório de Física do Solo da Embrapa Mandioca e Fruticultura. As análises químicas incluíram as determinações de cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e alumínio (Al^{3+}) trocáveis, extraídos em solução de cloreto de potássio 1 mol L^{-1} e H+Al extraído em solução de acetato de cálcio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ dosados por titulometria; fósforo disponível por colorimetria; sódio (Na^+) e potássio (K^+) trocáveis extraídos em solução de Mehlich 1 dosados por fotometria de chama; carbono orgânico e pH em água. A caracterização física incluiu análise granulométrica pelo método do densímetro. Foram calculadas a capacidade de troca de cátions potencial (CTC) e saturação por bases (V). Todas as análises foram realizadas conforme Embrapa (1999) e Embrapa (1997) (Tabela 1). A análise do silício foi realizada por colorimetria, seguindo método de Korndörfer et al., (2004).

Tabela 1. Propriedades químicas e físicas do solo utilizado no experimento

Propriedade	Valor
pH (em água 1:25)	4,6
Si (mg dm ⁻³)	2,41
P (mg dm ⁻³)	1,00
K ⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,12
Na ⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,02
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,7
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,3
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³)	1,0
H+Al (cmol _c dm ⁻³) ⁽¹⁾	3,30
S (cmol _c dm ⁻³) ⁽²⁾	1,14
CTC (cmol _c dm ⁻³) ⁽³⁾	4,44
V (%) ⁽⁴⁾	25,67
MO (g kg ⁻¹) ⁽⁵⁾	7,04
Areia total (g kg ⁻¹)	601
Silte (g kg ⁻¹)	77
Argila (g kg ⁻¹)	322
Dp (kg dm ⁻³) ⁽⁶⁾	2,43
Retenção de água	
0,1 atm (%)	12,40
15 atm (%)	9,10
Água disponível (%)	3,31

H+Al⁽¹⁾ = Acidez potencial; S⁽²⁾ = soma de base; CTC⁽³⁾ = capacidade de troca de cátions; V⁽⁴⁾ = saturação por bases; MO⁽⁵⁾ = matéria orgânica; Dp⁽⁶⁾ = densidade das partículas.

Como fonte de silício foi utilizado o silicato de cálcio e magnésio, gentilmente cedido pela Recmix do Brasil S. A., com nome comercial de AgroSilício[®]. O produto apresenta poder relativo de neutralização total (PRNT) de 88% e a composição química descrita na tabela 2.

Tabela 2. Composição química da fonte silicatada utilizada no experimento

Elemento	Forma	Teor Total
Cálcio	Ca	25%
	CaO	36%
Magnésio	Mg	6%
	MgO	9%
Silício	Si	10,5%
	SiO ₂	22,4%

Foi utilizada a dose de 5,71g de Agrosilício[®]/kg de solo (a qual foi determinada a partir de dados da literatura e dados de Conceição, 2010), distribuídos em vasos plásticos com capacidade para 2kg de solo. Para os

tratamentos que não receberam a dose de Agrosilício[®], foi adicionado: 0,85g de CaCO₃/kg de solo e 0,13g de MgO/kg de solo, para equilibrar o pH e teores de cálcio e magnésio entre os tratamentos, desta forma havendo a variação apenas na concentração de Si entre os tratamentos. O solo dos vasos após a adição de Agrosilício[®] e de CaCO₃/MgO permaneceu incubado por um período de 15 dias. Durante este período, a umidade do solo dos vasos foi mantida constante adicionando-se diariamente água destilada. Após o período de incubação, foi feita a homogeneização do solo em cada vaso, e foram coletadas sub-amostras que formaram uma amostra composta, para análise do pH em água e Si.

Mudas de bananeira das cultivares Grande Naine e Maçã foram transplantadas para os vasos (Figura 1). Após o transplântio as mudas foram adubadas com uma solução contendo (300 mg dm⁻³ de K; 238 mg dm⁻³ de P; 44 mg dm⁻³ de N e 50 mg dm⁻³ de S). Após 10 dias do transplântio, aplicou-se uma solução de micronutrientes contendo (2,85 mg dm⁻³ de B; 5,89 mg dm⁻³ de Cu; 21,99 mg dm⁻³ de Zn; 1,28 mg dm⁻³ de Mo). A adubação de cobertura com nitrogênio, na forma de uréia (107 mg dm⁻³), foi feita após 12 dias de transplântio, seguindo-se essa aplicação a cada 10 dias. As fontes utilizadas foram KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, H₃BO₃, CuSO₄.5H₂O; Zn SO₄.7H₂O, (NH₄)₆MoO₂₄.4H₂O e (NH₂)₂.

As plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação por 45 dias (Figuras 2 e 3), sendo irrigadas diariamente com água destilada.



Figura 1. Mudras de Bananeira sendo transplantadas para vasos plásticos.



Figura 2. Crescimento das plantas de bananeira das duas cultivares. Vista parcial do experimento.



Figura 3. Plantas de bananeira das duas cultivares após 30 dias de cultivo. Vista parcial do experimento.

2.1.1 Inoculação com o patógeno

Foi utilizado um isolado monospórico (VG01206) do fungo *F. oxysporum* f. sp. *cabense* (*Foc*), raça 1, obtido na Embrapa Mandioca e Fruticultura, comprovadamente patogênico à bananeira. Para a obtenção dos conídios foi utilizada a metodologia descrita por Subramaniam et al., (2006). As plantas foram inoculadas aos 45 dias após o transplante. As plantas foram removidas cuidadosamente do solo e suas raízes foram lavadas em água corrente, para retirada do excesso de solo e em seguida cortadas a 7-10 cm da base. A inoculação foi realizada por imersão das raízes na suspensão conidial (2×10^6 conídio mL⁻¹) durante 2 horas, quando foram transferidas para bandejas onde foi montado um sistema de inoculação (MOHAMED et al., 2000) (Figura 4). Plantas usadas como testemunhas foram submetidas ao mesmo procedimento, porém utilizando-se água destilada estéril.

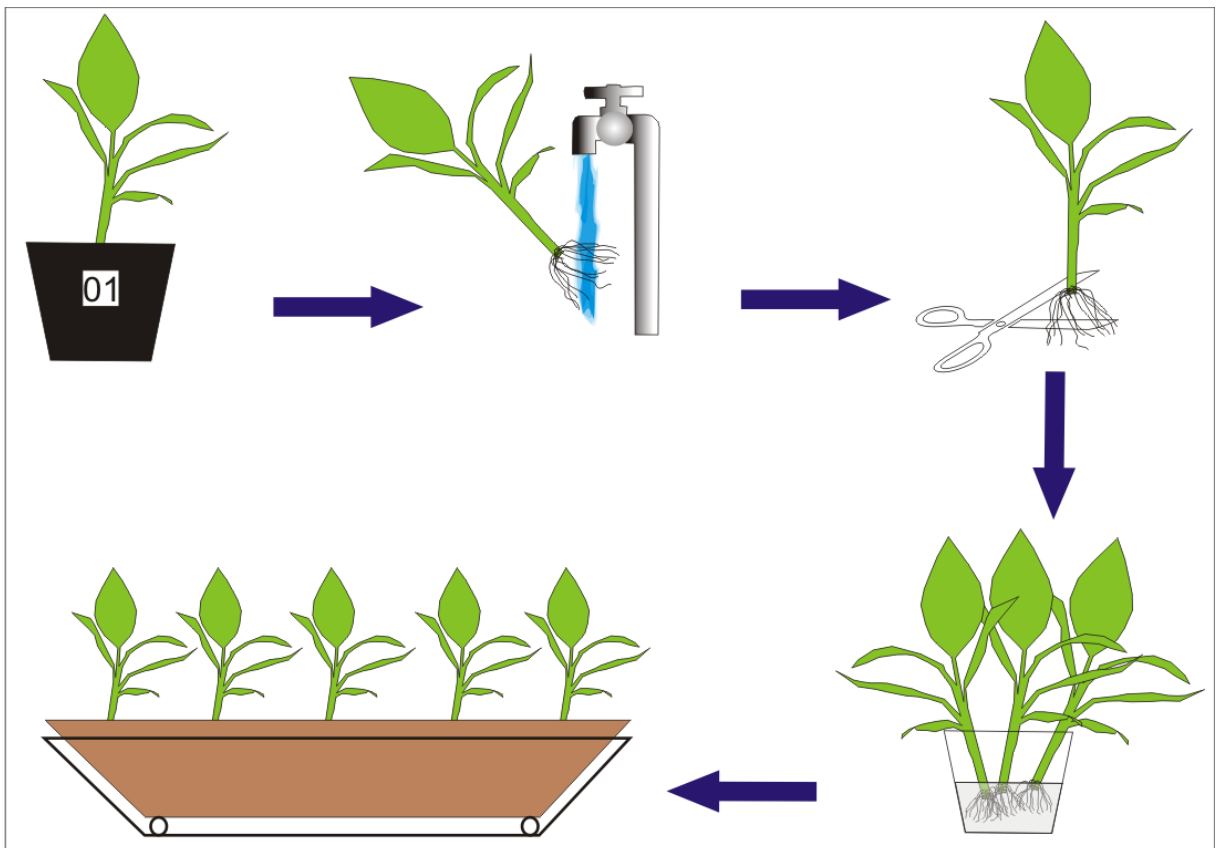


Figura 4. Esquema metodológico para inoculação das plantas com o fungo.

2.1.2 Delineamento Experimental

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições para cada uma das cultivares analisadas, consistindo de 4 tratamentos: cultivar suplementada com Si e inoculada com o patógeno; cultivar suplementado com Si sem a inoculação com o patógeno; cultivar sem suplementação com Si e inoculada com o patógeno e cultivar sem suplementação com Si e sem inoculação com o patógeno. Para análise da expressão gênica foram definidos 5 (cinco) tempos de coleta de material após a inoculação: 0, 3, 6, 24 e 48 horas (definidos a partir de VAN DEN BERG., 2006). As amostras foram constituídas por tecido da raiz das cultivares.

2.1.3 Coleta do Material

Para análise da expressão gênica foram coletadas amostras da raiz das plantas de cada vaso, cortadas próximo ao colo da planta. Após a retirada, o material foi lavado cuidadosamente em água corrente e em seguida em água deionizada, sendo embaladas em papel alumínio e devidamente identificadas com tratamento e tempo de coleta. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer a -80°C para posterior extração do RNA.

2.2 Análise da expressão dos genes de bananeira associados com a defesa

2.2.1 Seleção dos genes

Os genes para análise da expressão gênica relacionada à defesa foram selecionados de acordo com dados da literatura. Van den Berg et al. (2007) e Forysth (2006) identificaram *primers* que são capazes de amplificar genes responsáveis por codificarem proteínas que estão potencialmente relacionadas à defesa de bananeira quando esta é atacada por *Foc*. Entre estas proteínas (enzimas) foram selecionadas: PAL (fenilalanina amônia-liase), Catalase, PR3 (endoquitinase).

2.2.2 Extração do RNA total

A extração do RNA total das amostras foi feita a partir de 1-75 mg de tecido da raiz, macerado com nitrogênio líquido, usando o *RNAqueous® Kit (Applied Biosystems, Ambion)* seguindo as recomendações do fabricante. Todos os materiais utilizados no processo de extração foram tratados com DEPC. As amostras de RNA isoladas nos tempos de coleta foram agrupadas e estocadas a -80°C . O RNA foi analisado para a presença de bandas ribossomais distintas e ausência de RNA degradado através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) sobre condições não desnaturantes. As amostras de RNA foram tratadas com *Ambion® TURBO DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents (Applied Biosystems)* para remoção de contaminantes de DNA e subsequente remoção de DNase e cátions divalentes das amostras. A quantidade do RNA total extraído foi estimada por desintometria ótica (DO) a 260 nm. Após a quantificação, todas as amostras foram padronizadas para uma concentração de aproximadamente $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA total, utilizando água ultra-pura livre de RNase (*UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*).

2.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Como não é possível realizar uma reação de PCR a partir de uma fita simples, é necessário converter o RNA extraído em cDNA, a partir de um processo conhecido como transcrição reversa. A transcrição reversa é mediada pela enzima transcriptase reversa a qual polimeriza molécula de DNA a partir de RNA.

Dois microgramas de RNA total foi utilizado como fonte para a síntese de cDNA por transcrição reversa (RT), utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* seguindo as recomendações do fabricante. Este kit contém todos os reagentes necessários para conversão de 0,02-2 μg de RNA total em cDNA em uma reação final de 20 μL . Os componentes empregados neste kit são: tampão da enzima 10X, *primers* randômicos 10X, mix de dNTPs (100 mM) 25X e 50 U/ μL da enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*. Foi preparado um *master mix* da Transcrição Reversa 2X para reações de 20 μL ; em seguida 10 μL do *master mix* foi pipetado em microtubos de 0,2 mL, seguindo-se pela adição de 10 μL das amostras de RNA total, e iniciou-se a transcrição reversa em termociclador,

utilizando o seguinte programa: 25°C por 10', 37°C por 120' e 85°C por 5'. O produto da reação foi estocado a -15/-20°C até o momento do uso.

2.2.4 PCR Qualitativo

O PCR qualitativo foi utilizado para verificar a amplificação dos oligonucleotídeos antes de serem iniciados os testes em PCR quantitativo em tempo real. O material utilizado foi o DNA genômico de bananeira e um tipo de cDNA (amostra no tempo zero sem inoculação com o *Foc* e sem suplementação com o Si). As condições prévias de termociclagem foram: 95°C por 1 minuto, e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguida de 59°C por 30 segundos, para anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. Foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X (10mM de Tris e 50mM de KCl), 2 µL de MgCl₂ (50mM), 2 µL de dNTP's (4x2,5mM), 0,3 µL de Taq-Polimerase (5 U/µL), 1 µL de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (tabela 3) (10 mM) e 2 µL de DNA genômico ou cDNA, completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação.

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos escolhidos para as reações de PCR qualitativo e Tempo Real.

Gene alvo	Sequência do <i>Primer F</i> (5'-3')	Sequência do <i>Primer R</i> (5'-3')	(pb)
<i>pr-3</i> ¹	GTCACCACCAACATCATCAA	CCAGCAAGTCGCAGTACCTC	150
<i>pal</i> ¹	CCATCGGCAAACATCATGTTT	GTCCAAGCTCGGGTTTCTTC	150
<i>catalase</i> ²	AAGCATCTTGTCGTCGGAGTA	CGCAACATCGACAACCTTCTTC	96
<i>Musa 25 S rRNA</i> ²	GTAAACGGCGGGAGTCACTA	TCCCTTTGGTCTGTGCTTTG	106

Sequências de *primers* identificadas previamente por 1- Forsyth (2006) e 2- Van den Berg et al., (2006).

2.2.5 PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em equipamento ABI PRISM[®] 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems), em placas de PCR de 96 poços com adesivos óticos, no Laboratório de Genética de Microrganismos da

UFRB. A amplificação dos genes alvos foi realizada utilizando a metodologia SYBR Green, o qual tem a capacidade de intercalar fitas duplas de DNA, emitindo fluorescência durante a ligação. Esta fluorescência é então captada pelo sistema de detecção do equipamento, permitindo a detecção direta do produto da PCR monitorada pela medida do aumento da fluorescência. Como referência endógena foi utilizado o gene 25S rRNA para *Musa*, previamente identificado por Van den Berg (2006), como sendo um gene que não apresentou variação na expressão quando comparado em todos os tratamentos utilizados no seu experimento, constituindo-se desta forma como um bom candidato para servir como um controle endógeno. Foi realizado um experimento controle para a reação de PCR quantitativo em tempo real para examinar a linearidade de amplificação durante uma variação dinâmica. Uma diluição seriada (1, 1:5, 1:50, 1:500 e 1:5000) em 2µL de cDNA do cultivar Maçã (susceptível) e cada um dos conjuntos dos *primers* para os diferentes genes, foram utilizados para calcular a regressão da curva padrão. Cada diluição para o ponto da curva padrão foi realizado em triplicata. A curva padrão foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $y = mx + b$, onde $b = y$ - intercepta a linha da curva padrão (ponto de cruzamento) e $m = \text{ângulo (inclinação) da linha da curva padrão (função da eficiência da PCR)}$. Uma reação 100% eficiente produzirá um aumento de 10 vezes no produto da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3,3219$). Desvios da eficiência de 100% podem ser calculados expressando o valor do ângulo (s) na seguinte equação: eficiência da PCR = $(10^{1/s}) - 1$.

2.2.6 Ensaio da Expressão quantitativa

A expressão dos três prováveis genes relacionados com a defesa, *pr3*, *pal* e *catalase* nos cultivares Maçã e Grande Naine foram analisados em triplicata ($n=3$). O Perfil de amplificação foi apresentado como uma relação para cada fragmento dos genes a 0, 3, 6, 24 e 48 h após a inoculação em comparação com a expressão dos fragmentos dos genes no calibrador (amostra referência), Maçã 0 h sem suplementação com Si e sem inoculação com o *Foc*. Para amplificação foram utilizadas reações com volume final de 25 µL contendo 12.5 µL do *Power SYBR® Green Master Mix*, o qual contém: SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA

Polymerase, dNTPs, Referência Passiva (ROX) e tampão otimizado dos componentes; 1 µL de cada *primer* (10 µM); 2 µL de amostra do cDNA estoque e 8.5 µL de H₂O livre de nucleases. Reações como controle negativo foram realizadas utilizando H₂O livre de nucleases como amostra. As condições de termociclagem foram as seguintes: pré-incubação a 95°C por 15 minutos; seguido por 40 ciclos, cada um consistindo de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Por último foi traçada a curva de *Melting* para todas as amostras. Como foi utilizado o SYBR Green é necessário que seja realizado a curva de melting, uma vez que o SYBR Green pode detectar dímeros de primers, contaminante de DNA e produto de PCR mal amplificado, gerando desta forma a confirmação da amplificação correta dos fragmentos de interesse.

2.3 Análise dos dados

A regressão da curva padrão foi calculada a partir dos dados da amplificação originados das diluições seriadas (GINZINGER, 2002). A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos realizados foi realizada pela quantificação relativa utilizando a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para cada tratamento é detectado o valor de Ct (cycle threshold), tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor de Ct do gene alvo é subtraído do valor de Ct do controle endógeno, para normalizar a reação. Obtendo então o valor de ΔCt . O valor de ΔCt dos tratamentos é subtraído do valor de ΔCt da amostra controle (calibrador), tendo o valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor é utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência.

Para a análise estatísticas da expressão dos genes foi realizada uma análise de variância e comparação das médias usando o teste de *Tukey*. A comparação entre os tratamentos foi feita usando o teste *t* no SISVAR. Em todos os casos a significância foi avaliada a $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Inoculação com o Patógeno

Após a inoculação foram coletadas as amostras das raízes para análise da expressão gênica, no período de 0 a 48 horas. Plantas dos quatro tratamentos foram mantidas em casa de vegetação para acompanhar o desenvolvimento dos sintomas da doença, com o objetivo de avaliar a eficiência do procedimento de inoculação. Os resultados mostram que houve a infecção da planta com conseqüente aparecimento dos sintomas na cultivar Maçã após os 13 dias de inoculação, tanto no tratamento que foi suplementado com Si como no que não recebeu a dose utilizada no experimento. As figuras 5 e 6 mostram os tratamentos em que as cultivares Maçã e G. Naine foram inoculadas como o *Foc* e foram suplementadas com Si e as plantas que não receberam a dose do elemento, respectivamente, evidenciando o aparecimento dos sintomas externos do mal-do-Panamá na cultivar Maçã, e a cultivar G. Naine sem aparecimento evidente dos sintomas.



Figura 5. Plantas de Bananeira das Cultivares Maçã e G. Naine, suplementadas com Si e inoculadas com o *Foc*.

Figura 6. Plantas de Bananeira das Cultivares Maçã e G. Naine, não suplementadas com Si e inoculadas com o *Foc*

Além dos sintomas externos foram avaliados os sintomas internos após 60 dias da inoculação. As figuras 7 e 8 representam um corte longitudinal no pseudocaule e rizoma das mudas das cultivares Maçã e G. Naine. A figura 7 evidencia o desenvolvimento do sintoma na cultivar Maçã, e a ausência de sintomas para a cultivar G. Naine. Já na figura 8, pode ser visualizada a presença do sintoma interno nas duas cultivares, embora a variedade G. Naine seja considerada resistente ao patógeno. O desenvolvimento dos sintomas externos e internos nas plantas inoculadas evidencia que o método de inoculação foi eficiente, pois o desenvolvimento de sintomas é considerado evidência de infecção bem sucedida.

É interessante notar que a suplementação com silício suprimiu a infecção pelo *Foc* na cultivar resistente.



Figura 7. Plantas de Bananeira das Cultivares Maçã e G. Naine, suplementadas com Si e inoculadas com o *Foc*.

Figura 8. Plantas de Bananeira das Cultivares Maçã e G. Naine, não suplementadas com Si e inoculadas com o *Foc*

3.2 PCR qualitativo

O PCR qualitativo foi realizado com o objetivo de testar a amplificação correta dos oligonucleotídeos, utilizando DNA genômico de bananeira e empregando-se os 4 pares de *primers* selecionados. O resultado mostrou que todos os *primers* amplificaram fragmentos com tamanhos dos produtos esperados.

3.3 Ensaio da Expressão Quantitativa

A eficiência da PCR sobre uma faixa dinâmica (máxima para mínima) da concentração da amostra foi avaliada e a regressão da curva foi obtida após a amplificação de uma diluição seriada para cada conjunto de par de *primers* utilizado neste trabalho (Figura 9). A curva padrão fornece uma validação da eficiência da PCR para um conjunto específico de *primers*. A eficiência da PCR para os *primers* da catalase, *pal*, *pr3* e o controle endógeno *Musa* 25S rRNA, foi de: 98,73%, 102,72%, 103,50% e 103,54%, respectivamente (Tabela 4). Através da análise do valor do Ct pode-se verificar que o gene *musa* apresenta o maior nível de expressão, seguido pela *catalase*, *pr3* e *pal* (14, 21, 24 e 25, respectivamente).

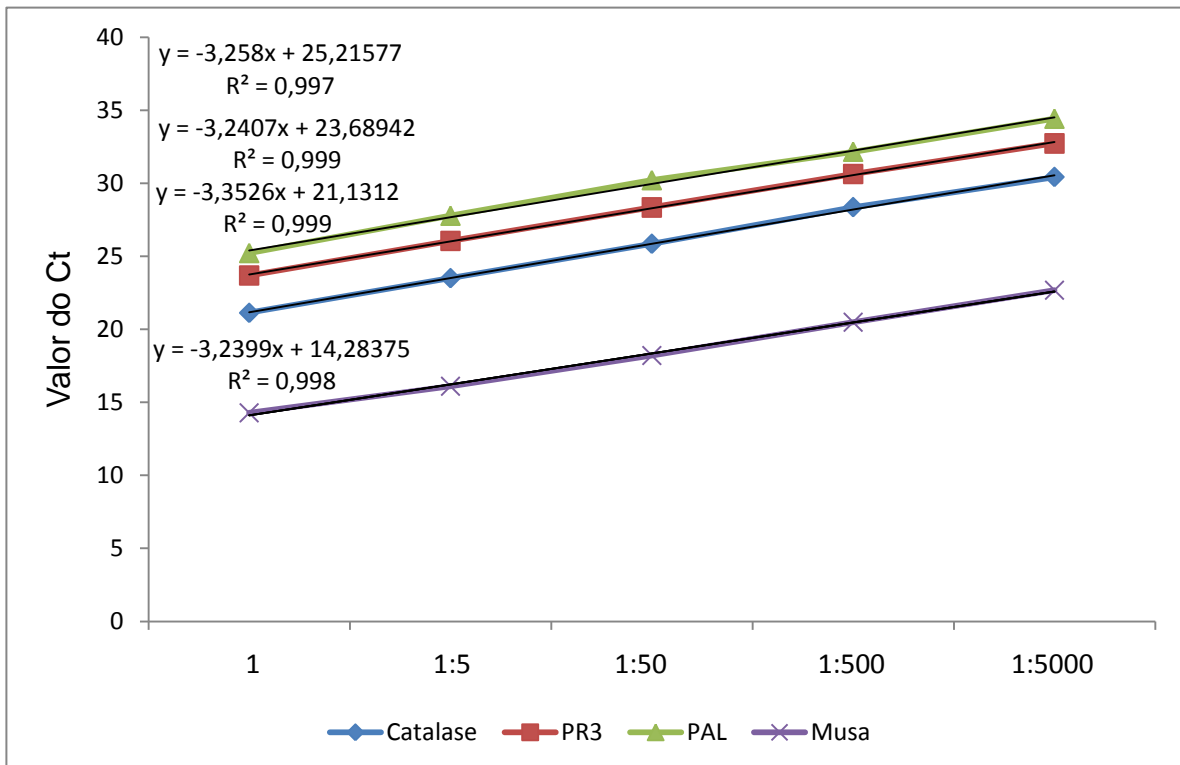


Figura 9. Curva padrão para calcular a eficiência da PCR e quantificação para os diferentes pares de *primers*. Diluições seriadas da amostra de cDNA (1,1:5, 1:50, 1:500, 1:5000) do cultivar Maçã amplificadas com *Musa* 25S, *catalase*, *pr3* e *pal* foram usadas para gerar a curva padrão para cada par de *primer* separado.

A eficiência da PCR é definida como a taxa na qual um produto de PCR é gerado, geralmente medida como um valor de percentual. Se um produto dobrar em quantidade durante a fase geométrica de amplificação da PCR, então se diz que a

PCR foi 100% eficiente. O valor designado para a eficiência de uma reação de PCR é uma medida de desempenho global do ensaio de PCR em tempo real.

Se a eficiência da PCR é maior que 100%, então a pipetagem do “conhecido” (controle endógeno) pode ter sido imprecisa ou existir um inibidor da PCR no padrão (GINZINGER, 2002). Se isto ocorre e não é corrigido pode levar a uma superestimação da quantidade da amostra desconhecida se não tiver o mesmo erro de pipetagem ou inibidor da PCR, quando usando o método de quantificação da curva padrão.

Tabela 4. Função de calibração, coeficiente de correlação e eficiência de PCR dos 4 pares de *primers* (*catalase*, *pr3*, *pal* e *Musa 25S rRNA*).

Gene	Função da Calibração ($y = mx+b$)	Coeficiente de Correlação (R^2)	Eficiência da PCR (%) ^a
<i>catalase</i>	$y = -3,3526x + 21,1312$	0,999	98
<i>pr3</i>	$y = -3,2407x + 23,6894$	0,999	103
<i>pal</i>	$y = -3,258x + 25,2157$	0,997	102
<i>Musa 25S rRNA</i>	$y = -3,0285x + 14,2837$	0,998	103

^a Eficiência da PCR = $[(10^{(1/S)})-1]*100$, onde S é o *slope* (ângulo).

O perfil de expressão da catalase para a cultivar maçã (Figura 10), não apresentou muita variação. As mais significativas taxas de expressão foram encontradas para o tratamento suplementado com Si e inoculado com o *Foc*, no tempo 0 e 3 horas após a inoculação, cerca de 2,18X mais que o calibrador (Maçã sem Si e sem inoculação com *Foc*) mostrando uma expressão precoce deste gene para esta situação. O que pode ser notado também nesta figura é a menor expressão para o tratamento que foi apenas inoculado com *Foc* no tempo 0 seguido por um aumento linear até o tempo 6.

Já a análise da expressão da catalase para a cultivar G. Naine (Figura 12), mostra uma maior variação no perfil de expressão. Onde a maior taxa foi encontrada para o tratamento que não foi suplementado com Si e foi inoculado com *Foc*, no tempo 3, cerca de 4X mais que o calibrador e a menor para o tratamento suplementado com Si e inoculado com *Foc* no tempo 0, diferindo dos dados obtidos para a cultivar maçã. O que chama atenção também é a variação de expressão que ocorreu para o controle negativo, diferindo também da cultivar maçã, a qual manteve um padrão de expressão para este gene.

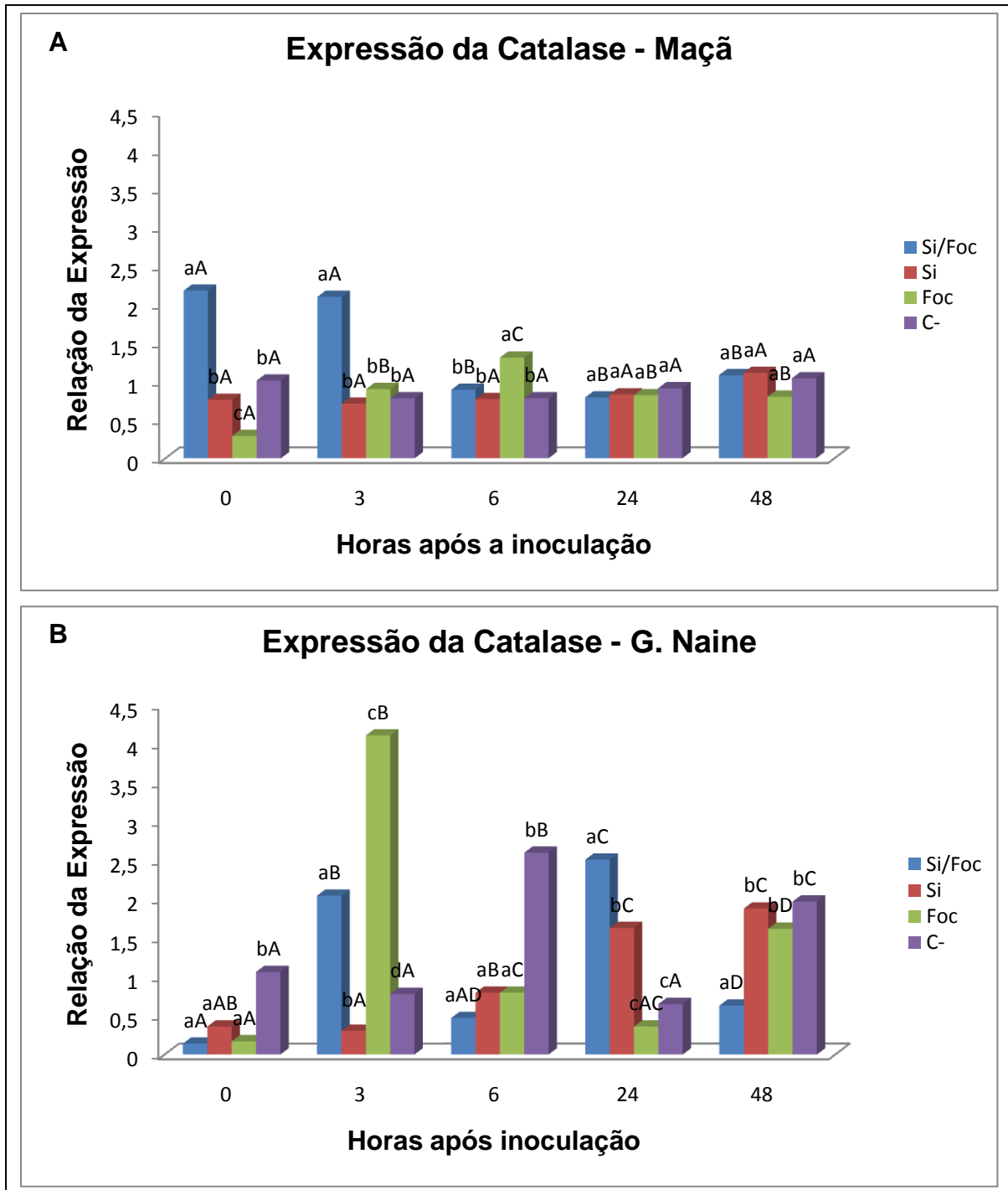


Figura 10. Análise da Expressão do gene *catalase* para a variedade Maçã (A) e Grande Naine (B). Comparação entre tratamentos diferentes ao longo do tempo. Amostras suplementadas com Si e Inoculadas com o *Foc* (Si/*Foc*); suplementadas com Si sem inoculação (Si); inoculadas sem suplementação (*Foc*) e sem suplementação e sem inoculação (C-). Médias de tratamentos com letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos no mesmo tempo de amostragem, enquanto que letras maiúsculas representam comparação das médias de cada tratamento nos tempos de amostragem.

A análise das médias gerais para a catalase, sem levar em consideração o tempo (Figura 11), mostrou que o tratamento Si/*Foc* apresentou maior taxa de

expressão entre os tratamentos na cultivar suscetível. Os demais tratamentos da cultivar resistente apresentaram maior taxa de expressão em comparação à cultivar suscetível. Embora os tratamentos suplementados com Si tenham apresentado menor taxa de expressão comparado com os tratamentos apenas inoculados com *Foc* e o controle negativo.

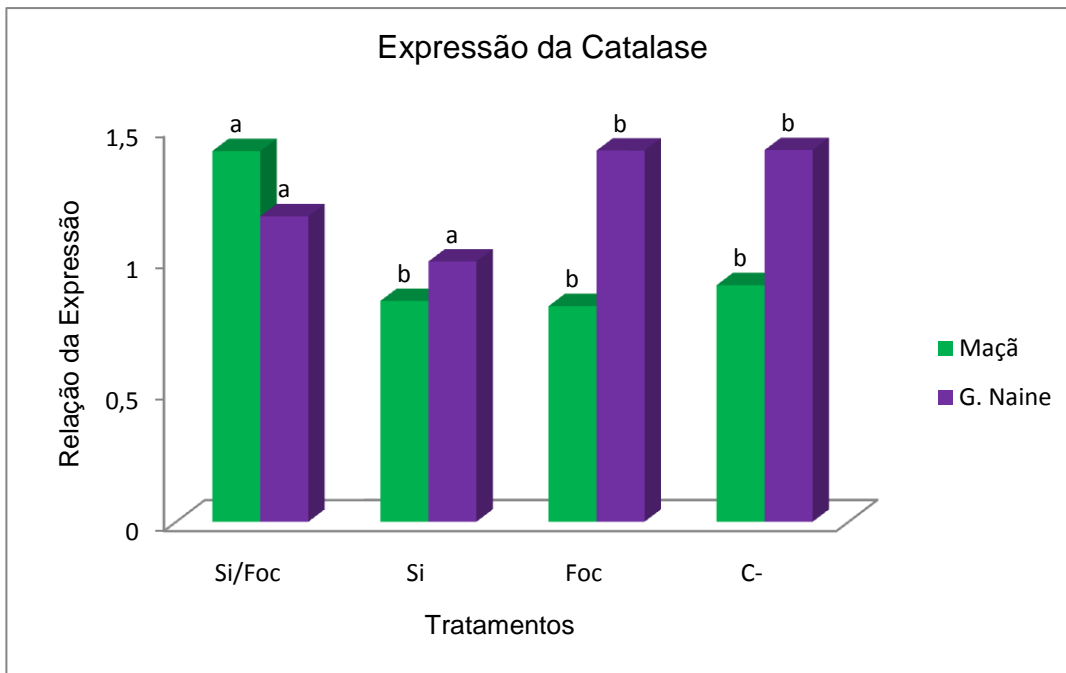


Figura 11. Comparação geral entre as médias dos tratamentos para a expressão do gene *catalase* nas duas cultivares, sem levar em consideração o tempo de amostragem. Letras acima das barras representam comparação entre os tratamentos e não entre os cultivares.

O perfil de expressão da fenilalanina amônia liase (Figura 12) na cultivar suscetível mostrou que as plantas que foram apenas suplementadas com Si apresentaram significativamente a maior taxa de expressão deste gene durante um período maior de tempo, tendo um crescimento linear a partir do tempo 3. Nesse tempo a expressão da *pal* sofreu uma redução. O tratamento controle apresentou um único pico de expressão, se mantendo constante durante os demais tratamentos. Já para a cultivar resistente a expressão nas plantas suplementadas apenas com o Si, não apresentou o mesmo perfil que a cultivar suscetível, tendo uma menor taxa de expressão. Diferindo também da cultivar suscetível, o controle negativo mostrou uma maior expressão ao longo dos tempos analisados, especialmente nos tempos 0, 6 e 24.

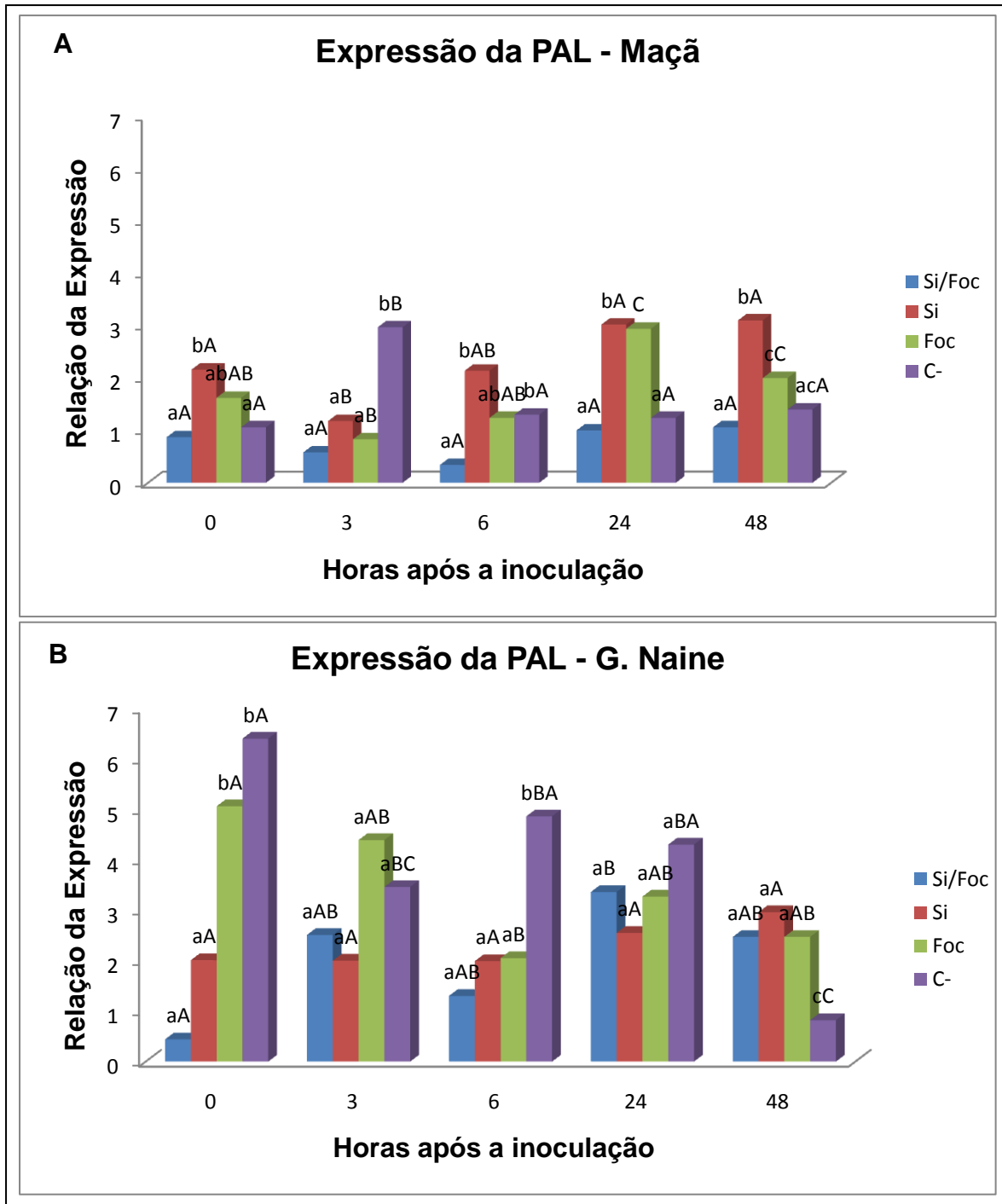


Figura 12. Análise da Expressão do gene *pal* para a variedade Maçã (A) e Grande Naine (B). Comparação entre tratamentos diferentes ao longo do tempo. Amostras suplementadas com Si e Inoculadas com o *Foc* (Si/*Foc*); suplementadas com Si sem inoculação (Si); inoculadas sem suplementação (*Foc*) e sem suplementação e sem inoculação (C-). Médias de tratamentos com letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos no mesmo tempo de amostragem, enquanto que letras maiúsculas representam comparação das médias de cada tratamento nos tempos de amostragem.

Os resultados da análise das médias gerais (Figura 13) para a cultivar suscetível, desconsiderando-se o fator tempo, mostra que os tratamentos que foram apenas suplementados com Si representaram a maior participação na ativação da

expressão do gene *pal* (2,32X mais que o calibrador), a menor expressão foi verificada para o tratamento suplementado com o Si e inoculado com o fungo. O tratamento apenas com o fungo e o controle negativo, não apresentaram diferença significativa entre si, mas diferiram entre os demais tratamentos. Já para a cultivar resistente, verifica-se que o tratamento controle negativo apresentou a maior taxa de expressão (3,97X mais) para o gene *pal*. As plantas que foram apenas inoculadas com *Foc* apresentaram taxa de expressão de 3,45X mais que o calibrador e o plantas que foram apenas suplementadas como o Si tiveram sua expressão 2,3X mais que o calibrador. Já a menor taxa da expressão para este gene foi observada para o tratamento suplementado com Si e inoculado com o *Foc* (2,01X mais).

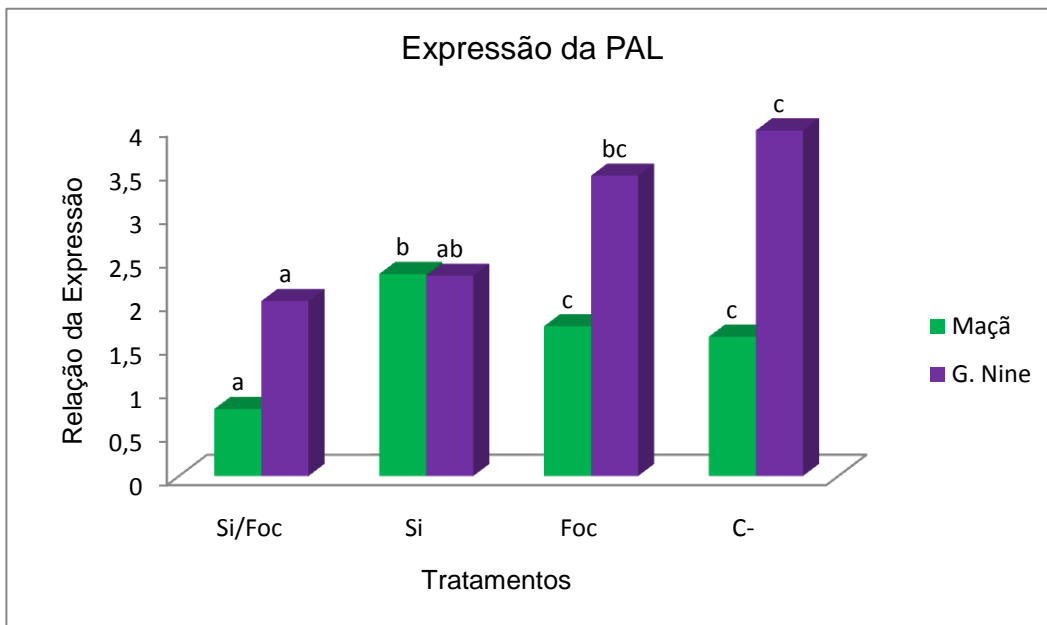


Figura 13. Comparação geral entre as médias dos tratamentos para a expressão do gene *pal* nas duas cultivares, sem levar em consideração o tempo de amostragem. Letras acima das barras representam comparação entre os tratamentos e não entre os cultivares.

Quanto a expressão da *pr3* para a cultivar suscetível (Figura 14), o tratamento Si/*Foc* apresentou a menor taxa de expressão em todos os tempos, sendo que no tempo 48 há um aumento desta expressão, no entanto, não sendo maior que os demais tratamentos. O tratamento que foi apenas suplementado com Si apresentou uma taxa de expressão de cerca de 5X mais que o calibrador, tendo um pico de expressão as 24 horas após a inoculação de aproximadamente 15X mais que o calibrador. O tratamento não suplementado com o Si e inoculado com *Foc*, apresenta uma alta taxa de expressão (9,5X mais), chegando até 10X no tempo no

48, embora não tenha apresentado diferença significativa de expressão ao longo do tempo. Já para o controle negativo, um único pico de expressão foi verificado para o tempo 24, os demais tempos não apresentaram diferença significativa.

Observando-se o perfil da expressão do *pr3* para a cultivar Grande Naine, pode-se observar que o controle negativo apresentou a maior taxa de expressão em todos os tempos, apresentando diferença significativa quando comparada com os demais tratamentos, a menor expressão para este tratamento foi detectada no tempo 6. Já o tratamento que não foi suplementado com Si e foi inoculado como o *Foc* apresentou uma expressão precoce no tempo 0, seguido por uma redução no tempo 3 e mantendo uma expressão sem diferença significativa para os demais tempos. Os tratamentos que foram suplementados com Si não apresentaram diferença significativa de expressão ao longo do tempo.

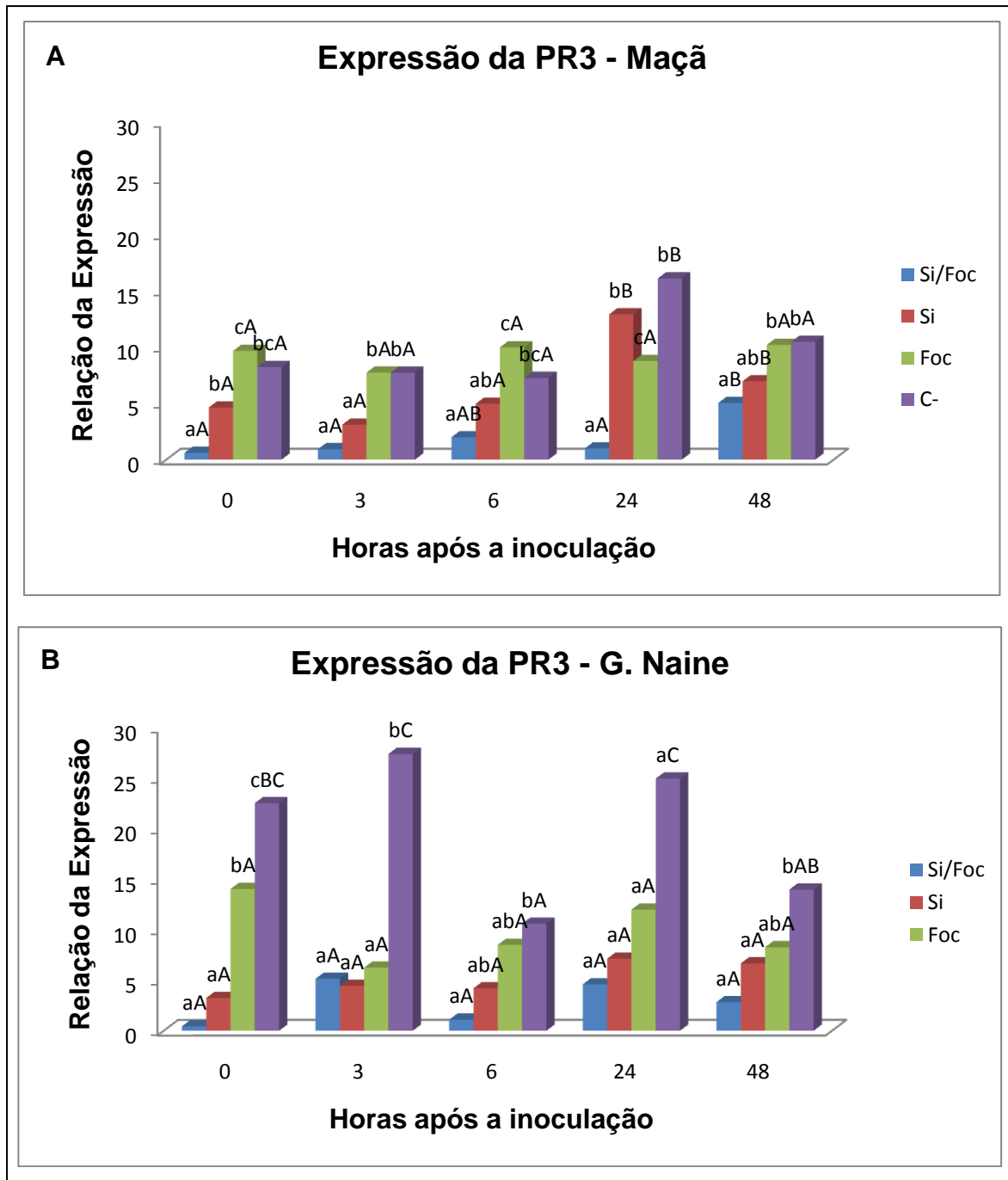


Figura 14. Análise da Expressão do gene *pr3* para a variedade Maçã (A) e Grande Naine (B). Comparação entre tratamentos diferentes ao longo do tempo. Amostras suplementadas com Si e Inoculadas com o *Foc* (Si/*Foc*); suplementadas com Si sem inoculação (Si); inoculadas sem suplementação (*Foc*) e sem suplementação e sem inoculação (C-). Médias de tratamentos com letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos no mesmo tempo de amostragem, enquanto que letras maiúsculas representam comparação das médias de cada tratamento nos tempos de amostragem.

Analisando as médias gerais dos tratamentos e comparando as duas cultivares (Figura 15), nota-se que os tratamentos com Si apresentaram as menores taxas de expressão para o *pr3*, e que o controle negativo da cultivar resistente apresentou uma alta taxa de expressão, cerca de 20 vezes mais que o calibrador. Já

o controle negativo da cultivar suscetível apresentou a mesma taxa de expressão do tratamento apenas inoculado com o *Foc* sem suplementação com Si.

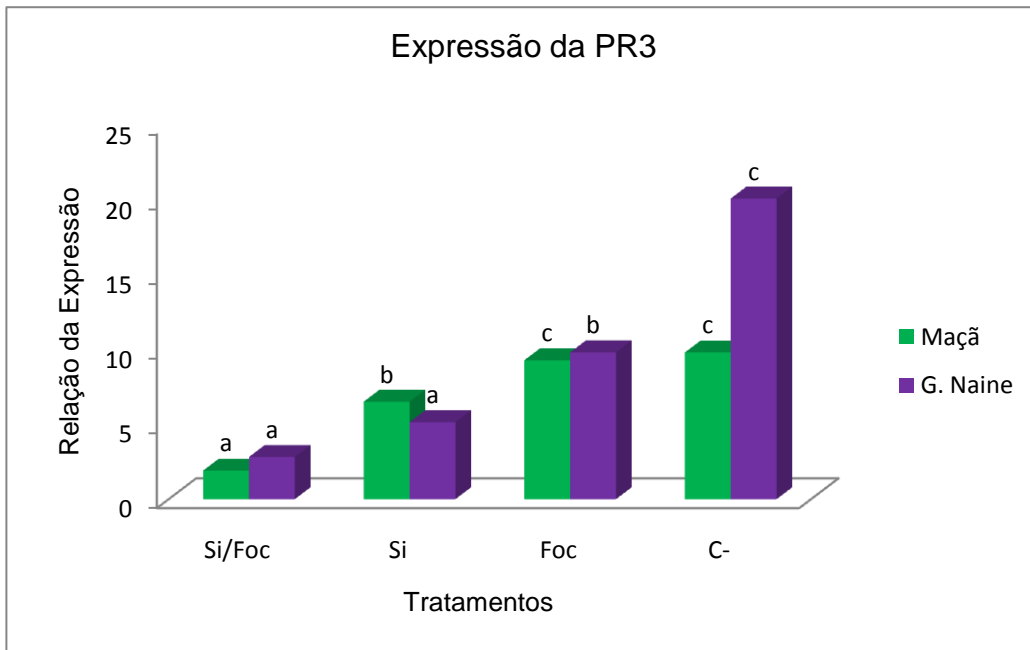


Figura 15. Comparação geral entre as médias dos tratamentos para a expressão do gene *pr3* nas duas cultivares, sem levar em consideração o tempo de amostragem. Letras acima das barras representam comparação entre os tratamentos e não entre os cultivares.

4. DISCUSSÃO

4.1 Teste de Inoculação

O aparecimento de sintomas na cultivar resistente pode ser explicado devido as condições de estresse as quais as cultivares foram expostas. Os estresses incluem a retirada destas plantas dos vasos onde foram plantadas e logo após o corte das raízes e imersão das mesmas em uma suspensão de 2.10^6 con.mL⁻¹ durante 2 h. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Ribeiro et al., (2009, 2010) e Conceição (2010), que utilizaram a mesma metodologia na inoculação das mesmas cultivares de bananeira usadas no presente experimento e verificaram o aparecimento de sintomas internos para as cultivares resistentes. Embora a metodologia para a inoculação seja muito estressante para a planta, o patógeno só é capaz de infectá-la mediante um ferimento.

4.2 Quantificação relativa dos genes expressos em bananeira ativadas por Sílicio e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Neste estudo a expressão do gene da *catalase* para a cultivar Maçã aumentou significativamente em três momentos, nos tempos 0, 3 e 6 horas após a inoculação (Figura 10). O alto nível de expressão da catalase classe II em tecidos vasculares foi relatada por Willekens et al. (1994) e Bagnoli et al. (2004), da mesma forma Willekens et al. (1994) mostraram que a expressão da CAT2 em tabaco é regulada durante respostas a estresses ambientais. O nosso estudo mostrou que a aplicação simultânea do Si com a inoculação com *Foc* na cultivar suscetível foi responsável por conferir uma resposta precoce para a expressão de genes codificadores da catalase, ou seja, o Si parece estimular uma resposta mais rápida ao estresse oxidativo, no entanto esta expressão não conseguiu se manter ao longo do tempo. Foyer et al (1994), sugere que a indução precoce da catalase está provavelmente relacionada com a queima oxidativa, um processo associado com um sistema de defesa antioxidante da planta. Segundo Guzzo (2004), após a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocorrer a transcrição de genes

codificadores de enzimas antioxidantes nos tecidos adjacentes ao sítio da infecção, como a catalase, glutathione-S-transferase (GST) e ascorbato peroxidase, as quais puderam ser identificadas em cafeeiro tratado com ASM. O fato da expressão da catalase não ficar num nível alto ao longo de todo o tempo no nosso estudo, pode estar relacionado com o fato de que a suplementação com Si pode influenciar a resposta transcricional apenas na sua intensidade e não na sua natureza. Isto pode levar apenas a um retardamento no começo da expressão da doença ou reduzir a sua incidência, como reportado por Fauteux et al., (2006), estudando o efeito de proteção do Si no patossistema *Arabidopsis* – oídio. Da mesma forma Blackman e Hardham (2008), verificaram uma baixa expressão da catalase em plantas de tabaco suscetíveis a *Phytophthora nicotianae* 4, 8 e 24 h após a inoculação.

Já na cultivar Grand Naine, o padrão da expressão foi diferenciado, cada tratamento apresentou um comportamento diferente para a expressão da catalase ao longo do tempo (Figura 10). Essa variação no nível de expressão pode estar relacionado com o fato de que o nível da catalase não pode se manter elevado nas células durante a resposta de defesa. Como o H_2O_2 é removido por catalase ou peroxidases incluindo ascorbato e glutathione peroxidases (LAMB e DIXON, 1997), a diminuição na expressão provavelmente ocorra para permitir a formação de H_2O_2 suficiente para ativação de genes de defesa (GUIDETTI-GONZALES, 2009), controlando assim as flutuações nos níveis de EROs sobre condições de estresse (VANDENABEELE et al., 2004). Van den Berg et al., (2007) verificaram o mesmo comportamento na expressão deste gene, para o tratamento que foi apenas inoculado com *Foc*: picos alternados de expressão. No entanto, no nosso trabalho a expressão ocorreu precocemente, as 3 horas após a inoculação, diferindo do tempo de 6 horas após a inoculação encontrado por estes autores. Nos nossos resultados verificamos que a cultivar resistente não teve o nível de expressão da catalase influenciado pela suplementação com Si em comparação com o controle negativo, mostrando uma capacidade natural da planta em ativar este gene para controle de ERO's. Este resultado está de acordo com Resende et al., (2003), o qual afirma que em plantas resistentes o sistema de defesa é eficientemente ativado, conduzindo à resistência natural.

Em plantas inoculadas a suplementação com Si não afetou significativamente a expressão do gene da PAL na cultivar suscetível (Figura 12), na realidade, observando os resultados verificamos que houve uma inibição da

expressão quando comparada com o controle negativo. Este resultado foi inesperado, uma vez que sendo o silício um provável indutor de resistência, esperase que a inoculação com patógeno em tratamentos suplementados com tais compostos, aumentasse a expressão de genes codificadores de enzimas responsáveis pela indução de resistência, como sugerido por Martinati (2008). No entanto, este fato pode ocorrer devido a eliciação de diferentes vias de sinalização onde os elicitores (Si e *Foc*) podem interagir de uma maneira antagônica. Resultados semelhantes foram encontrados por Kurabachew e Wydrasz (2010), onde a aplicação simultânea de Si e rizobactérias não teve efeito na indução de resistência do tomate contra *Ralstonia solanacearum*. Ishida et al., (2008) também corroboram estes resultados, indicando um efeito não sinérgico na supressão da ferrugem bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em algodão quando da aplicação simultânea de Acibenzolar – S – metil e *Bacillus cereus*.

No entanto, na mesma cultivar, em plantas não inoculadas e suplementadas com Si, houve diferença significativa na expressão do gene da PAL, quando comparado com os demais tratamentos. Este resultado é contrário ao que alguns pesquisadores afirmam, que o Si sozinho não teria a capacidade de afetar o metabolismo das plantas em condições ambientais controladas (FAUTEUX et al., 2002; CAI et al., 2008; CHÉRIF et al., 2001; YANG, et al., 2003). Embora estes resultados não mostrem efeito do Si na alteração do metabolismo vegetal, Brunings et al, (2009) analisando a expressão diferenciada de genes em arroz suplementado com Si contra o *Magnaporthe oryzae*, verificaram que, apenas a aplicação do Si foi capaz de ativar cinquenta e dois genes, enquanto que as plantas que foram simultaneamente tratadas com Si e inoculadas com o patógeno tiveram 54 genes diferencialmente expressos. Dentre os genes que foram expressos, 11 são prováveis genes codificadores de proteínas ligadas a resistência e 1 PR proteína.

Já na cultivar resistente, os tratamentos suplementados com Si não tiveram efeito positivo na ativação da expressão do gene da PAL (Figura 12) em comparação com o tratamento apenas inoculado com *Foc* e com o controle negativo. Tais resultados podem evidenciar uma ativação natural deste gene nas plantas resistentes. Sustentando esta idéia Beckman, (1990) e De Ascensão e Dubery, (2000) sugerem que a resposta de resistência em banana é baseada principalmente na habilidade das plantas resistentes produzirem compostos fenólicos, aumento de deposição de lignina e aumento das enzimas envolvidas no

fortalecimento da parede celular. Como citado anteriormente a enzima fenilalanina amônia-liase está envolvida na síntese de precursores de tais compostos. A presença de altas quantidades de compostos fenólicos os quais podem estar relacionados com alta quantidade de proantocianidinas, foram encontradas em raízes de Grande Naine, tais metabólitos foram relacionados com os prováveis responsáveis pela capacidade de resistência desta cultivar ao ataque de nematóides (WUYTS et al., 2010).

O gene *pr3*, apresentou inibição da expressão (tempos 0, 3, 6, 24) tendo uma maior expressão apenas no tempo 48 para a cultivar maçã (Figura 14) para o tratamento que foi simultaneamente suplementando com o Si e inoculado com *Foc*, para explicação de tais resultados acredita-se que esteja havendo ou um efeito antagônico entre os dois elicitores (Si e *Foc*), o que acabaria inibindo a expressão do sistema de defesa, permitindo, desta forma, o desenvolvimento da doença (Kurabachew e Wydrasz 2010) ou uma ativação tardia do sistema de defesa, permitindo também desta forma a invasão do patógeno (OUCHI, 2006). Assim como para o gene *pal*, o *pr3* teve os níveis de expressão maiores quando utilizados os dois elicitores em tratamentos separados, comprovando uma possível ação antagônica para a expressão. A expressão precoce da *pr3* para a cultivar Maçã apenas inoculada com *Foc* pode sugerir que estas proteínas exerce um papel importante na tentativa precoce de defesa da banana contra *Foc*, embora a comparação com o controle negativo não tenha mostrado diferença significativa. Resultados semelhantes foram encontrados por Van den Berg (2006).

As plantas suplementadas com Si e inoculadas com *Foc* da cultivar Grande Naine apresentaram o mesmo padrão de expressão do *pr3* (Figura 14) comparado com a cultivar Maçã, mostrando que independentemente do nível de resistência, a utilização combinada dos dois elicitores proporcionou um efeito antagônico para a banana. A aplicação do Si sem inoculação do *Foc* não apresentou diferença significativa para a expressão do gene, indicando que o mesmo não teve a capacidade de modificar o metabolismo vegetal. Este resultado está de acordo com vários trabalhos que sugerem que o Si, aplicado sozinho na planta, não teria a capacidade de modificar o metabolismo e desta forma não podendo desenvolver uma resposta bioquímica de defesa (CHÉRIF et al., 2001; FAUTEUX et al., 2002; YANG, et al., 2003; CAI et al., 2008; CAI et al., 2009). Diferente da aplicação do Si, a inoculação com *Foc* teve efeito positivo na expressão deste gene, resultados

semelhantes foram encontrados por Van den Berg (2006). Bol et al., (1990) e Van't Kloostes et al., (1999), afirmam que em interações incompatíveis, a produção de PR-proteínas é efetiva e a invasão do patógeno é bloqueada em um estágio inicial, sem causar danos para as plantas. A indução da endoquitinase na cultivar resistente pode inibir o crescimento do fungo devido a degradação bioquímica da parede celular. Isto pode estar relacionado também com a ativação do sistema de resposta de defesa partindo do sítio inicial da infecção devido ao seu papel como liberador de elicitores (VAN DEN BERG, 2006). Pegg e Young (1982) relataram que a liberação de β -1-3 glucanase e quitinases podem servir para destruir *Foc* em banana.

Um fato interessante encontrado nos nossos resultados foi a participação ativa do controle negativo na expressão dos genes estudados (Figuras, 11, 13 e 15). Este tratamento não foi suplementado com Si e nem inoculado com *Foc*, no entanto passou pelos mesmos estresses mecânicos sofridos pelos demais tratamentos, a retirada das plantas do solo onde estava plantada e o corte das raízes. Desta forma acredita-se que a resposta pode ter sido gerada a partir das injúrias mecânicas sofridas pelas plantas. Agrios (2004) e Heath (2001), afirmam que, assim como a invasão por patógenos e estímulos químicos, injúrias mecânicas podem ser responsáveis pela acumulação de fitoalexinas nas plantas. Da mesma maneira Léon et al., (2001), afirmam que a resposta das plantas às injúrias podendo ser sistêmica e/ou localizada, envolvendo a geração, translocação, percepção e transdução de sinais específicos para ativar a expressão dos genes de defesa em resposta ao ferimento. Embora os demais tratamentos também tenham sofrido as injúrias mecânicas e terem sido expostos a possíveis elicitores (Si e *Foc*), não foi verificado um efeito aditivo de tais interações. Uma das hipóteses para este fenômeno é a possibilidade da interação entre as vias de sinalização na regulação da expressão dos genes de defesa, esta interação tem sido referida com o termo *cross talk*. De acordo com Kunkel e Brooks, (2001), este mecanismo está envolvido em uma complexa rede de sinalização na qual diferentes vias influenciam uma a outra de maneira positiva ou negativa, exemplificando que a rota do ácido jasmônico e ácido salicílico são antagônicas.

O presente estudo mostrou a influência da aplicação do Si e *Foc* no nível de expressão de três genes de duas cultivares de bananeira. O controle negativo apresentou altos níveis de expressão dos três genes em ambas cultivares. Foi observado um efeito sinérgico dos tratamentos Si/*Foc* na inibição da expressão da

pr3 e *pal*. O Si apresentou papel evidente apenas na ativação da *pal* para a cultivar suscetível. Esses dados são aditivos importantes para o entendimento das rotas metabólicas envolvidas nas respostas de defesa de bananeira a *Foc* sob influência do Si.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fato das plantas serem induzidas a ativar diferentes vias de defesa em resposta a diferentes fatores representou uma limitação para o nosso estudo, uma vez que não podemos concluir se o Si tem a capacidade de ativar os genes estudados em resposta a inoculação com *Foc*. Diante disto, estudos futuros são necessários para o entendimento das possíveis rotas de defesa induzidas pelo Si, buscando esclarecer se estas rotas são mutuamente dependes ou independentes.

O alto nível de expressão dos três genes estudados no controle negativo pode ser um reflexo do metabolismo natural da planta ou ter sido causado pelas injúrias sofridas durante o processo de inoculação. Na tentativa de anular o efeito da injuria sugere-se que as plantas de ambas as cultivares suplementadas com Si sejam analisadas sem sofrer injúrias mecânicas.

Sugere-se que pesquisas futuras sejam realizadas no sentido de se estudar o genoma completo da bananeira para que se possam identificar os genes que estão sendo expressos com a aplicação do Si, para que a partir deste resultado, estudos mais completos com relação a expressão dos genes ativados sejam realizados.

Esse estudo abre caminhos para o melhor entendimento da expressão gênica no patossistema *Foc* x bananeira por meio de indutores químicos, como o Si, considerando-se a escassez de trabalhos publicados na área.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, A. M. A. ; SOARES, C. R. F. S. ; SIQUEIRA, J. O. 2009. Silicato de cálcio como amenizante da toxidez de metais pesados em mudas de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44:1-9.
- ADATIA, M. H.; BESFORD, R. T. 1986. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. **Annals of Botany**,58:343-351.
- AGRIOS, G. N. 2004. **Plant Pathology**. 5th Edition. Academic Press, London.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Micology**. 4. Ed. Estados Unidos: J. W. & Sons, Inc 1996.
- ALMEIDA, C. O. 2004. Comercialização. In: **O Cultivo da Bananeira**. (Eds. A. L. Borges & L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, 279p.
- AMARAL, D. R. 2005. Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por elicitores abióticos e extratos vegetais. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- APPLIED BIOSYSTEMS, 2001. **ABI Prism 7500 Sequence Detection System**. User Boletim, nº 2.
- ARNON, D. I. & STOUT, P. R. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. **Plant. Physiology**. 14: 371-375.
- BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KRONN, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae specialis causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, 90:891-900.
- BAGNOLI, F.; DANTI, S.; MAGHERINI, V.; COZZA, R.; INNOCENTI, A. M.; RACCHI, M. L. 2004. Molecular cloning and characterisation and expression of two catalases from peach, **Functional Plant Biology**, 31:349-357.
- BARBOSA FILHO, M. P.; PRADHU, A. S. 2002. Aplicação de silicato de cálcio na cultura do arroz. Embrapa, Circular Técnica 5.
- BARON, C.; ZAMBRYSKI, P. C. 1995. The plant responses in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variation on a common theme. **Annual Review of Genetics**, 29:107-129.
- BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. 2010. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal Uberlândia**, 26(2): 231-239.

BECKMAN, C. H. 1990. Host responses to the pathogen. In.: **Fusarium wilt of banana**. (Ed. R. C. Plotz). APS Press, Minnesota, USA.

BECKMAN, C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 57: 101-110.

BENHAMOU, N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, 1 (7): 233-240.

BERNARDS, M. A.; FLEMING, D. W.; LLEWELLYN, D. B.; PRIFER, R.; YANG, X.; SABATINO, A.; PLOURDE, G. L. 1999. Biochemical characterization of suberisation-associated anionic peroxidase of potato. **Plant Physiology**, 121:135-146.

BLACKMAN, L. M.; HARDHAM, R. 2008. Regulation of catalase activity and gene expression during *Phytophthora nicotianae* development and infection of tobacco. **Molecular Plant Pathology**, 9(4):495-510.

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, 28:113-138.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. 2004. Exigências Edafoclimáticas. In: O Cultivo da Bananeira. (Eds. A. L. Borges & L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, 279p.

BOTELHO, et al. 2005. Effect of silicon doses and sources on the intensity of the brown eye spot of coffee seedlings. **Fitopatologia Brasileira**, 30(6):582-588.

BOWEN, P. et al. 1992. Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 117: 906-912.

BOWLES, D. J. 1990. Defense-Related proteins in higher plants. **Annual Review in Biochemistry**, 59: 873-907.

BRUNINGS, A. M.; DATNOFF, L. E.; MA, J. F.; MITANI, N.; NAGAMURA, Y.; RATHINASABAPATHIS, B.; KIRSTS, M. 2009. Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Annals of Applied Biology**, 155:161-170.

BUCHEL, A. S.; LINTHORST, H. J. M. 1999. PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: **Pathogenesis-related proteins in plants**. Edited by: DATTA & MUTHUKRISHNAN, 1999.

BURNS, D. L. 1999. Biochemistry of type IV secretion. **Current Opinion in Microbiology**, 2:25-29.

BÜTTNER, D.; BONAS, V. 2003. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, 6:312-319.

- CAI, K.; GAO, D.; CHEN, J.; LUO, S. 2009. Mini – Review: Probing the mechanisms of silicon-mediated pathogen resistance. **Plant Signaling & Behavior**, 4(1):1-3.
- CAI, K.; GAO, D.; LUO, S.; ZENG, R.; YANG, J.; ZHU, X. 2008. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in Rice against blast disease. **Physiologia Plantarum**, 134:324-33.
- CAMARGO, L. E. A. 1995. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIM FILHO A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo, Esalq, 455-469.
- CASTRO, R. M.; PAIVA, S. B.; VEIGA, J. S.; SAVINO, A. A. 2007. Ativadores químicos de resistência – a experiência brasileira com o Bion. In: Indução de resistência em plantas a patógenos (Anais da III Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas a patógenos – 2007). Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa.
- CASEY, W. H.; KINRADE, S. D.; KNIGHT, C. T. G.; RAINS, D. W.; EPSTEIN, E. 2003. Aqueous silicate complexes in wheat *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Environ**, 27:51-54.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. 2005. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DIPIERRO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, 13:81-124.
- CHAMNONGPOL, S.; WILLEKENS, H.; MOEDER, W.; LANGEBARTELS, C.; SANDERMANN, H. J.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN CAMP, W. 1998. Defense activation and enhancer pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, 95:5818-5823.
- CHÉRIF, M. et al. 1992. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 41:411-425.
- CLARK, R. B. 2001. Role of silicon in plant nutrition. In: SINGH, K.; MORI, S.; WELCH, R. M. **Perspective on the micronutrient nutrition of crops**. New Delhi: Scientific Publishers, p. 205-225.
- COOK, D.; DREYER, D.; DONNET, D.; HOWELL, M.; NONY, E.; VANDENBOSCH, K. 1995. Transient Induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. **Plant Cell**, 7:43-55.
- CONCEIÇÃO, E. G. J. 2010. Uso do silício na nutrição da bananeira e no controle do mal-do-Panamá. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas, BA.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. KIMATI, H. 2005. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas cultivadas** (Eds. H.

Kimati, L. Amorin, J. A. M. Rezende, A. Bergamin Filho, L. E. A. Camargo). Editora Agronômica Ceres, São Paulo.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. 2004. Doenças e Métodos de Controle. In: **O Cultivo da Bananeira**. (Eds. A. L. Borges & L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, 279p.

DALY, A. 2006. ***Fusarium wilt of bananas (Panama disease) (Fusarium oxysporum f. sp. cubense)***. Northern Territory Government.

DATNOFF, L. E. et al. 1990. Evaluation of calcium silicate slag and nitrogen on brown spot, neck rot, and sheath blight development on rice. **Biological and Cultural Tests for Control of Plant Disease**, 5:65.

DATNOFF, L. E. et al. 1994. Effect of calcium on blast and brown spot intensities and yields of rice. **Plant Disease**, 75:11-17.

DATNOFF, L. E.; RAID, R. N.; SNYDER, G. H., JONES, D. B. 1991. Effect of calcium silicate on blast and brown spot intensities and yields of rice. **Plant Disc.**, 75:729-732.

DE ASCENSAO, A. R. D. C. F.; DUBERY, I. A. 200. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race four. **Phytopatology**, 90:1173-1180.

DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. 1995. Signals in plant disease resistance . **Bulletin of Institute Pasteur** 93: 167-186.

DIOGO, R. V. C.; WYDRA, K. 2007. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 70:120-129.

DITA, M. A.; WAALWIJK, C.; BUDDENHAGEN, I. W.; SOUZA Jr., M. T.; KEMA, G. H. J. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. **Plant Pathology**, 59:348-357.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Baltimore, 7:1085-1097.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. 1994. Early events in the activation of plant defence responses. **Annual Review of Phytopathology**, 32:479-501.

DOMICIANO, G. P.; RODRIGUES, F. A.; VALE, F. X. R.; XAVIER FILHA, M. S.; MOREIRA, W. R.; ANDRADE, C. C. L.; PEREIRA, S. C. 2010. Wheat resistance to spot blotch potentiated by silicon. **Journal of Phytopathology**, 158:334-343.

DUMPE, B. B.; ORTIZ, R. 1996. Apparent male fertility in *Musa* germplasm. **Hortscience**, 31: 1019-1022.

EDREVA, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **Gen. Appl. Plant Physiology**, 31: 105-124.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. 1997. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de Métodos de análise de solo. 2. Ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 212 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. 1999. Manual de Métodos de análise de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: EMBRAPA, 370 p.

EPSTEIN, E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academic Science*. 91: 11-17.

EPSTEIN, E. 2001. **Silicon in plants: facts vs. concepts**. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Ed.). *Silicon in Agriculture*. The Netherlands: Elsevier Science, p. 1-15.

ESPETEIN, E. 1999. Silicon. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50:641-664.

EXLEY, C. 1998. Silicon in life: a bioinorganic solution to bioorganic essentiality. **Journal Biology Inorganic Chemical**, 69:139-144.

FAGGIANI, E. P. 2002. O silício na defesa do limão rugoso (*Citrus jambhiri*) a *Phytophthora nicotianae* pv. *parasitica*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FARMER, E. E.; ALMÉRAS, E.; KRISHNAMURTHY, V. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Current Opinion in Plant Biology**, 6:372-378.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acessado em 20/07/2010. Disponível em: www.faostat.fao.org/site/340/default.aspx

FAUTEUX, F.; CHAIN, F.; BELZILE, F.; MENZIES, J. G.; BELANGER, R. R. 2006. The protective role of silicon in the Arabidopsis – powdery mildew pathosystem. **PNAS**, 103(46):17554-17559.

FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J. G.; BELANGER, R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, 249:1-6.

FAWE, A., ABOU-ZAID, M., MENZIES, J.G. & BÉLANGER, R.R. 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology** 88:396-401.

FERNANDES, C. F.; COSTA, J. N. M.; HOLANDA FILHO, Z. F.; SOUZA, F. F. 2006. Doenças da Bananicultura: mal-do-Panamá. Embrapa Rondônia, Circular Técnica 86.

- FERNANDES, C. F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G.; REIS, N. D.; ANTUNES JUNIOR, H. 2009. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 14p. (Documentos/Embrapa Rondônia; 133).
- FORSYTH, L. M. 2006. Understanding the role of induced resistance in the control of Fusarium of banana. Thesis (PhD) – University of Queensland.
- FOX, R. L.; SILVA, J. A. 1978. Symptoms of plant malnutrition: silicon, and agronomically essential nutrient for sugarcane. In: **ILLUSTRATED concepts in tropical agriculture**. Honolulu: Agriculture and Human Resources, University of Hawaii.
- FOYER, C. H.; DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K. J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell Environment**, 17: 199-218.
- FRENCH-MONAR, R. D.; RODRIGUES, F. A.; KORNDORFER, G. H.; DATNOFF, L. F. 2010. Silicon Suppresses Phytophthora Blight Development on Bell Pepper. **Journal of Phytopathology**, 158:554-560.
- FRIENDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; RELLA, M. G.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J. P. KESSMANN, H.; RAYLS, J. 1996. Benzothiadiazole derivate induces systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Journal**, 10:61-67.
- FRUGOLI, J. A.; ZHONG, H. H.; NUCCIO, M. L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; MCCLUNG, C. R. 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.)Heynth. **Plant Physiology**, 112:327-336.
- GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. A. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, 261:754-756.
- GALVEZ, L.; CLARK, R. B.; GOURLEY, L. M.; MARAVILLE, J. W. 1989. Effects of silicon on mineral composition of sorghum groen with excess manganese. **Journal of Plant Nutrition**, 12:547-551.
- GERLACH, K. S.; BENTLEY, S.; MOORE, N. Y.; PEGG, K. G.; AITKEN, E. A. B. 2000. Characterisation of Australian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* by DNA fingerprinting analysis. **Australian Journal of Agricultural Research**, 51:945-953.
- GINZINGER, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, 30:503-51.
- GLAZEBROOK, J. 1999. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* . **Current Opinion in Plant Biology**, 2:280-286.

GÓMEZ-GÓMEZ, L. 2004. Plant perception systems for pathogen recognition and defense. **Molecular Immunology**, 41:1055-1062.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, 124(1): 21-30.

GREENBERG, J. T. YAO, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, 6:201-211.

GROENEWALD, S.; VAN DEN BERG, N.; MARASA, W. F. O.; VILIOEN, A. 2006. Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogeneous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. **Australasian Plant Pathology**, 35: 401-409.

GROTHGE-LIMA, M. T. 1998. Interrelação cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. *SP. meridionalis*), nodulação (*Bradyrhizobium japonicum*) e silício em soja [*Glycine max* (L.) merrill]. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUIDETTI-GONZALES, S. 2009. Identificação de genes envolvidos na defesa contra patógenos no banco de dados do CitEST e em macroarranjos da interação *Citrus sinensis* – *Guinarda citricarpa*. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUO, Y. et al. 2007. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.), **International Journal of Food Science and Technology**, 42:1012-1018.

GUZZO, S. D. 2004. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUZZO, S. D. 2003. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 11:283-332.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, 40:347-369.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉUTRAX, J. P.; VAN LOON, L. C. 2001. Inducing Resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases, corfu. **European Journal Plant of Pathology**, 107:1-6.

HARRISON, S. J.; CURTIS, M. D.; MCINTYRE, C. L.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M. 1995. Differential expression of peroxidases isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8: 398-406.

HAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. 2007. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007

HAWSKWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D.N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8. Ed. CAB International: Oxon, UK. 1995.

HEATH, M. C. 2001. Pathogenicity factors and resistance mechanisms. **Physiological and molecular Plant Pathology** , 58(4):147-148.

HENRIET, C.; OPFERGELT, S.; DOREL, M.; DELVAUX, B. 2008. Soil weathering degree of volcanic ash soils governs the silicon status of banana (*Musa* spp.). *In: Silicon Agriculture Conference – South Africa 2008.*

HINSINGER, P.; BARROS, O. N. F.; BENEDETTI, M. F.; NOACK, Y.; CALLOT, G. 2001. Plant-induced weathering of a basaltic rock: experimental evidence. **Geochem Cosmochim Acta**. 65:137-152.

HOUSSEIN, A. A.; AHMED, S. M.; ISMAIL, A. A. 2010. Activation of tomato plant defense response against *Fusarium* wilt disease using *Trichoderma harzianum* and Salicylic Acid under greenhouse conditions. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 6(3): 328-338.

INGRI, N. 1978. Aqueous silic acid, silicates and silicate complex. *In: BENDZ, G.; LINDQUIST, I. (ed.). Biochemistry of silicon and related problems* . New York: Plenum, p. 3-50.

ISHIDA, A. K. N.; SOUZA, R. M.; RESENDE, M. L. V.; CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, D. L.; POZZA, E. A. 2008. Rhizobacterium and acibenzolar-S-methyl (ASM) in induction on against bacterial blight and expression of defense responses in cotton. **Tropical Plant Pathology**, 33:1027-1034.

JAUHARI, O. S.; MISHRA, R. A.; TEWARI, C. B. 1974. Nutrient uptake of banana (*Musa parasidiaca*) var. Basrai Dwaf. **Indian Journal of Agriculture Chemistry**.

JEGER, M. J.; EDEN-GREEN, S.; TRESH, J. M.; JOHANSON, A.; WALLER, J. M.; BROWN, A. E. 1995. Banana disease. *In: Bananas and Plantains.* (Ed. S. Growen). Chapman and Hall, London.

JIANG, D.; ZEYEN, R. J.; RUSSO, V. 1989. Silicon enhances resistance of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). **Phytopatology**, 79:1198.

JONES, D. H. 1984. Phenylalanina ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, 23:1349-1359.

JONES, D. R. 2000. History of banana breeding. *In: Diseases of banana, abaca and enset.* (D. R. Jones). **CAB International**, Wallingford, UK.

KABLAN, L.; DELVAUX, B.; LEGREVE, A. 2008. **Impact of silicon on the susceptibility of banana plants (*Musa acuminata*) to black sigatoka disease.** *In: Silicon Agriculture Conference – South Africa 2008.*

KEEN, N. T. 1992. The molecular biology of disease resistance. **Plant Molecular Biology**, 19:109-122.

KIDANE, E. G.; LAING, M. D. 2008. Cold stress ameliorating effect of silicon and its impact on Fusarium wilt of banana. *In: Silicon Agriculture Conference – South Africa 2008.*

KIRK, T. K. 1971. Effects of micro-organisms on lignin. **Annual Review of Phytopathology**, 9:185-210.

KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. M. 1979. Lignin biodegradation: summary and perspectives. *In: Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications*, vol II. (Eds. T. K. Kirk, T. Higuchi, H. M. Chang). CRC Press, West Palm Beach, Florida.

KITAJIMA, S.; SATO, F. 1999. Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. **Journal of Biochemistry**, 125:1-8.

KOBAYASHI, A.; KOGUCHI, Y.; KANZAKI, H.; KAJIYAMA, S.; KAWAZU, K. 1994. A new type of antimicrobial phenolic produced by plant peroxidase and its possible role in the chemical defense systems against plant pathogens. **Z. Naturforsch**, 49:411-414.

KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; CAMARGO, M. S. 2004. Silicato de cálcio e magnésio na agricultura. Uberlândia:UFU/ICIAG. (**Boletim Técnico**, 1).

KUNKEL, B. N.; BROOKS, D. M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, 5:325-331.

KURABACHEW, H.; WYDRAZ, K. 2010. Induction of defence related enzymes and gene expression after resistance induction by rhizobacteria and silicon against *Ralstonia solanacearum* in tomato (*Solanum lycopersicum*). *In: Conference on international Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development.*

KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. 2002. Variabilidade genética entre formaes specialis de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, 24:1481-1485.

LAMB, C.; DIXON, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48: 251–275

LAMB, C. J.; LAWTON, M. A.; DRON, M. and DIXON, R. A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defences against microbial attack. **Cell**, 56: 215-224.

LAMBASIS, M. R. 1999. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. *In: PODILA, G. K.; DOUDS, D. D. Current advances in Mycorrhizae Research.* St. Paul: American Phytopathological Society Press, p. 46-60.

- LÉON, J.; ROJO, E.; SANCHEZ-SERRANO, J. J. 2001. Wound signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, 52:1-9
- LEONG, S. K.; LATIFFAH, Z.; BAHARUDDIN, S. 2009. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* of banana. **American Journal of Applied Sciences**, 6:1301-1307.
- LEUSCH, H. J.; BUCHENAUER, H. 2003. Effect of soil treatments with silica-rich lime fertilizers and sodium trisilicate on the incidence of wheat by *Erysiphe graminis* and *Septoria nodorum* depending on the form of N-fertilizer. **Journal of Plant Disease and Protection**, 96: 154-172.
- MA, J. F.; GOTO, S.; TAMAI, K.; ICHII, M. 2001. Role of root hairs and lateral roots in silicon uptake by rice. **Plant Physiology**, 127(4):1773-1780.
- MA, J. F.; TAKAHASHI, E. 2002. Soil, fertilizer, and plant silicon. **Research in Japan**, Elsevier Science.
- MA, J. F.; YAMAJI, N. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **TRENDS in Plant Science**, 11(8).
- MA, J. F.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; TAMAI, K.; KONISHI, S.; FUJIWARA, T.; KATSUHARA, M.; YANO, M. 2007. Na efflux transporter of silicon in Rice. **Nature**, 448:209-212.
- MA, W.; SMIGEL, A.; TSAI, Y. C.; BRAAM, J.; BERKOWITZ, G. A. 2008. Innate immunity signaling: cytosolic Ca^{2+} elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or calmodulin-like protein. **Plant Physiology**, 148:818-828.
- MAITI, R. K. et al. 1984. A comparative study of the haustorial development of *Striga asiatica* (L.) Kuntze on Sorghum cultivars. **Annals of Botany**, 54:447-457.
- MAJUMDER, N. D.; RAKSHIT, S. C.; BORTHAKUR, D. N. 1985. Genetics of silica uptake in selected genotypes of rice. **Plant and Soil**, 88:449-453.
- MALAVOLTA, E. 2006. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Ceres, 443 p.
- MANDAL, S.; MALLICK, N.; MITRA, A. 2009. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, 47:642-649.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral Nutrition of hight plants. Academic Press, London.
- MARTINATI, J. C. 2008. Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com silício. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- MARTINATI, J. C. et al. 2007. Redução dos sintomas causados pela *Xylella fastidiosa* por meio de aplicação de benzotiadizole e silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,42:1083-1089.
- MARTINS-MIRANDA, A. S. 2002. Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] expostas à salinidade e deficiência hídrica. 85f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- MASCHNER, H. 1995. **Mineral nutrition of higher plants**. 2 ed. New York: Academic Press, 887 p.
- MATHAI, G.; PAILY, P. V.; MENON, M. R. 1978. Effect of fungicides and silica in the control of sheath blight disease of rice of rice caused by *Corticium sasakii* (Shirai). **Agricultural Research Journal of Kerala**,19:79-83.
- MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVEIRA, J. S.; FERREIRA, D. M. V. 2001. O Mal-do-Panamá ou murcha de fusarium da bananeira. In: 1 Simpósio norte mineiro sobre a cultura da banana, Nova Porteirinha, Minas Gerais.,p 38-50.
- MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, 82: 535-540.
- McKEAGUE, J. A. & CLINE, M. G. 1963. Silica in soils. **Advances in Agronomy** 15:339-396.
- MENZIES, J. G. et al. 1991. Effects of soluble silicon on the parasitic fitness of *Sphaerotheca fuliginea* on *Cucumis sativus*. **Phytopathology**, 81:84-88.
- MÉTRAUX, J. P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plants Pathology**, 107:13-18.
- MÉTRAUX, J. P. 2007. **Induced defenses in plants**. In.: Indução de resistência em plantas a patógenos (Anais da III Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas a patógenos – 2007). Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa.
- MITANI, N.; MA, J. F. 2005. Uptake system of silicon in different plant species. **J. Exp. Bot.** 56:1255-1261.
- MITANI, N.; MA, J. F.; IWASHITA, T. 2005. Identification of the silicon form in xylem sap of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Physiol.** 46: 279-283.
- MITANI, N., YAMAJI, N., MA, J. F. 2008. Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. **Pflugers Arch.**, 456:679-686.
- MITANI, N.; YAMAJI, N.; MA, J. F. 2009. Identification of Maize Silicon Influx transporters. **Plant Cell Physiol.** 50(1): 5-12.
- MOHAMED, A.A., MAK, C., LIEW, K.W., and HO, Y.W. 2000. **Early evaluation of banana plants at nursery stage for Fusarium wilt tolerance**. *Banana Fusarium*

Wilt Management: towards Sustainable Cultivation, Proc. Int. Workshop on the Banana Fusarium wilt disease (Genting Highlands Resort, Malaysia, 18-20 October 1999). (Molina, A.B., Nik Masdek, N.K. Liew, K.W. Eds) 174-185.

MOLDES, C. A.; BATISTA, G. B.; FONTÃO-FILHO, O.; AZEVEDO, R. A.; TSAI, S. M. 2006. **Actividad de enzimas antioxidantes en algodón com diferentes dosis de silício.** In.: Reunión de Las Asociación Argentina de Fisiología Vegetal, 26. Chascomus, Argentina.

MOLLER, I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52:561-91.

MOORE, N. Y.; BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; JONES, D. R. 1995. Fusarium wilt of Bananas. **Musa Disease Fact Sheet** N° 5. INIBAP.

MORAES, M. G. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M. PICININI, E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas.** Passo Fundo, Embrapa Trigo, 6:261-284.

MORAES, S. R. G. et al. 2006. Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 31(1):69-75.

NARWAL, R. P. 1973. Silica bodies and resistance to infection in jowar (*Sorghum vulgare* Perc.). **Agra University Journal Research**, 22:17-20.

NOJOSA, G. B. A. 2003. Efeito dos indutores na resistência de *Coffea arábica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. E *Phoma costarricensis* ECHANDI. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; GUERGEL, L. M. S. 2004. Indução de resistência em doenças pós-colheira em frutas e hortaliças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 12:343-371.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. 2003. Compatibilidade vegetativa de Nit-mutantes de *Fusarium solani* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro e à soja. **Fitopatologia Brasileira**, 28:89-92.

O'NEILL, T. M. 1991. Investigations of glasshouse structure, growing medium and silicon nutrition as factors affecting disease incidence in cucumber crops. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen**, 56 (2):359-367.

OSEBELE, H. O.; TENKOUANO, A.; PILLAY, M. 2006. Ploidy variation of *Musa* hybridis form crosses. **African Journal of Biotechnology**, 5:1048-1053.

OSUNA-CANIZALES, F. J.; DEDATTA, S. K.; BONMAN, J. M. 1991. Nitrogen form and silicon nutrition effects on resistance to bruzone disease of Rice. **Plant and Soil**, 135: 223-231.

OUCHI, S. A. 2006. Retrospective of an unconventionally trained plant pathologist: Plant diseases to molecular plant pathology. **Annual Review of Phytopatology**, 44:1-17.

PEGG, G. F.; YOUNG, D. H. 1982. Purification and characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium albo-atrum* – infected tomato plants and from *V. albo-atrum*.

PENG, M.; KÚC, J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. **Phytopatology**, 82: 696-699.

PEREIRA, S. C.; RODRIGUES, F. A.; CARRÉ-MISSIO, V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ZAMBOLIM, L. 2009 (a). Effect of foliar silicon application on resistance against coffee leaf rust and on the potentiation of defense enzymes in coffee. **Tropical Plant Pathology**, 34:223-230.

PEREIRA, S. C.; RODRIGUES, F. A.; CARRÉ-MISSIO, V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ZAMBOLIM, L. 2009 (b). Effect of foliar application of silicon on soybean resistance against soybean rust and on the activity of defense enzymes. **Tropical Plant Pathology**, 34:164-170.

PLOETZ, R. C. 1994. Panama disease – Return of the first banana menace. **International Journal of Pest Management**, 40:326-336.

PLOETZ, R. C. 2006. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* fsp. *cubense*. **Phytopathology**, 96:653-656.

POZZA, A. A. A. 2004. Silício em mudas de cafeeiro: efeito em nutrição mineral e na suscetibilidade à cercosporiose em três variedades. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J.; GREGORY, M. 2004. Systematics and biology of silica bodies in monocotyledons. **Botanic Review**, 69:377-440.

PUNJA, Z. K. 2006. Recent developments towards achieving fungal disease resistance in transgenic plants. **Canadian Journal Plant Pathology**, 28:298-308.

RAID, R. N.; ANDERSON, D. L.; ULLOA, M. F. 1992. Influence of cultivar and amendment of soil with calcium silicate slag on foliar disease development and yield of sugar cane. **Crop Protection**, 11(1):84-88.

RAVEN, J. A. 1983. The transport and function of silicon in plants. **Biological Review** 58:179-207.

REIS, V. M. 2005. Interações entre plantas e microrganismos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 194).

RÉMUS-BOREL, W. MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. 2005. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infection wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 66:108-115.

- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, 28(2):123-130.
- REYMOND, P.; FARMER, E. E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defence gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, 1:404-411.
- RIDE, J. P. 1978. The role of cell wall interactions in resistance to fungi. **Annual Applied Biology**, 89:302-306.
- RIBEIRO, L. R.; AMORIM, E. O.; CORDEIRO, Z. M.; SILVA, S. O.; DITA, M. A. 2009. Discrimination of Banana Genotypes for Fusarium Wilt Resistance in Greenhouse. **Promusa**.
- RIBEIRO, L. R.; SILVA, S. O.; RODRIGUES, M. A. D.; TROCOLI, R. O. 2010. Detecção precoce da resistência ao mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) em genótipos de bananeira (*Musa* spp). Disponível em:< http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/jornada/resumos/Resumo_LindineiaRR_SebastiaoOS_rev_JR_ED_.pdf>. Acesso em 08 de novembro de 2010.
- RICHMOND, K. E.; SUSSMAN, M. 2003. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. **Current Opinion in Plant Biology**, 6:268-272.
- RITTER, H.; SHULZ, G. E. 2004. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**, 16:3426-3436.
- RODRIGUES, A. A. C.; NETO, E. B.; COELHO, R. S. B. 2006. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficácia de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, 31:492-499.
- RODRIGUES, F. A. et al. 2003. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, 93:535-546.
- RODRIGUES, F. A.; DATNOFF, L. E. 2007. Silicon-mediated resistance in monocots: the Rice-*Magnaporthe grisea* model. In.: **Indução de resistência em plantas a patógenos** (Anais da III Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas a patógenos – 2007). Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa.
- RODRIGUES, F. A.; JURICK II, W. M.; DATNOFF, L. E.; JONES, J. B.; ROLLINS, J. A. 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 66:144-159.
- ROMERO-PUERTAS, M. C.; DELLEDONNE, M. 2003. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. **IUBMB Life**, 55(10/11): 579-583.

- RÖSLER, J.; KREKEL, F.; AMRHEIN, N.; SCHMIDT, J. 1997. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, Rockville, 113:175-179.
- RUFYIKIRI, G.; NOOTENS, D.; DUFEY, J. E.; DELVAUX, B. 2004. Mobilization of aluminium and magnesium by roots of banana (*Musa spp.*) from kaolinite and smectite clay minerals. **Applied Geochemical**, 19:633-643.
- SANTOS, D. M. 2002. Efeito do silício na intensidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke) em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SANTOS, M. C. 2008. Efeito de diferentes doses de silício, nitrogênio e potássio na incidência da traça-do-tomateiro, pinta-preta e produtividade do tomate industrial. Dissertação (Mestrado – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária).
- SAVANT, N. K.; SNYDER, G. H.; DATNOFF, L. E. 1997. Silicon management and sustainable rice production. **Advances in Agronomy**, 58:151-199.
- SCANDALIOS, J. G. 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, 28:1-41.
- SCHMELZER, E. 2002. Cell polarization, a crucial process in fungal defense. **Trends in Plant Science**, 7:411-415.
- SHEF, B. A.; BAJAR, A. M. KOLATTUKUDY, P. E. 1993. Abolition of an inducible highly anionic peroxidase activity in transgenic tomato. **Plant Physiology**, 101:201-208.
- SHULAEV, V.; SILVERMANN, P.; RASKIN, I. 1997. Methyl salicylate an airborne signal in pathogen resistance. **Nature**, 385:718-721.
- SIEGEL, B. Z. 1993. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, 12:303-312.
- SILVA, R. A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. 2008. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 49 p. (Documentos/Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 250).
- SILVA, R. V.; OLIVEIRA, R. D. L.; NASCIMENTO, K. J. T.; RODRIGUES, F. A. 2010 (a). Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicon. **Plant Pathology**, 59:586-593.
- SILVA, I. T.; RODRIGUES, F. A.; OLIVEIRA, J. R.; PEREIRA, S. C.; ANDRADE, C. C. L.; SILVEIRA, P. R.; CONCEIÇÃO, M. M. 2010 (b). Wheat Resistance to Bacterial Leaf Streak Mediated by Silicon. **Journal of Phytopathology**, 158:253-262.
- SILVA, S. D. E.; MATOS, A. P.; ALVES, E. J. 1998. Genetic improvement of banana tree. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33:693-703.

- SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; OÑATE-SANCHEZ, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, 5:430-436.
- SMITH, S. N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. **Plant Pathology Bulletin**, 16:97-120.
- SMITH, M. K.; HAMILL, S. D.; LANGDON, P. W.; GILDES, J. E.; DOOGAN, V. J.; PEGG, K. G. 2006. Towards the development of a Cavendish banana resistant to race 4 of fusarium wilt: gamma irradiation of micropropagated Dwarf Parfitt (*Musa* spp.; AAA group, Cavendish subgroup). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 46: 107-113.
- SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, 27:64-67.
- SOUZA, S. L. 2006. Análise do proteome de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsica à micorriza arbuscular. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
- SPLETZER, M. E.; ENYEDI, A. J. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. **Phytopathology**, 89:722-727.
- STADNIK, M. 2000. Indução de resistência a oídios. In.: Congresso Paulista de Fitopatologia, 23. Campinas. **Anais. Campinas GPF, 2000**. 176-181.
- STOVER, R. H.; HILDRETC, R. C. THORNTON, N. C. 1961. Studies of *Fusarium* wilt of bananas. VII Field control. **Canadian Journal of Botany**, 39:197-206.
- STOVER, R. H. 1962. Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species. **CAB International**, Great Britain.
- STOVER, R. H.; WAITE, B. H. 1954. Colonization of banana roots by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and other soil inhabiting fungi. **Phytopathology**, 44: 689-693.
- STRAWN, M. A.; MARR, S. H.; INOUE, E.; INADA, N.; ZUBLETA, C.; WILDERMUTH, M. C. 2007. Arabdopsis isochorismate synthase functional in pathogen induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. **Journal of Biological Chemistry**, 282:5919-5933.
- SUBRAMANIAM, S., MAZIAH, M., SARIAN, M., PUAD, M.P. & XAVIER, R. 2006. Bioassay method for testing *Fusarium* wilt disease tolerance in transgenic banana. **Scientia Horticulturae**, 108:378-389.
- TAKAHASHI, E. 1995. Uptake model and physiological functions of silica. **Science of the Rice Plant**, 2:58-71.

- TAKAHASHI, E.; MA, J. F.; MIYAKE, Y. 1990. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. **Comments Agricultural Food Chemical**, 2:99-122.
- TISDALE, S. L.; NELSON, W. J.; BEATON, J. D. 1993. **Soil fertility and fertilizers**. New York: Macmillan Publishing Company, p. 202-331.
- VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. **Crop Science**, 44:1920-1934.
- VANDENABEELE, S.; VANDERAUWERA, S.; VUYLSTEKE, M.; ROMBATUS, S.; LANGEBARTELS, C.; SEIDLITZ, H. K.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F. V. 2004. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, 39:45-58.
- VAN DEN BERG, N. 2006. Identification of genes associated with tolerance in the Cavendish Banana selection, GCTCV-218, against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, 'subtropical' race 4. Tese (Doutorado em Plant Pathology – University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences), Pretoria.
- VAN DEN BERG, N.; BERGER, D. K.; HEIN, I.; BIRCH, P. R. J.; WINGFIELD, M. J.; VOLJOEN, A. 2007. Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulated of cell wall-strengthening genes in the roots. **Molecular Plant Pathology**, 8:333-341.
- VAN DER VORM, P. D. J. 1980. Uptake of Si by five plant species, as influenced by variations in Si-supply. **Plant Soil**, 56:153-156.
- VAN LOON, L. C. 1997. Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, 103:753-765.
- VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, 12:245-264.
- VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological Molecular Plant Pathology**, 55: 85-97.
- VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, 18:259-298.
- VAN'T KLOOTES, J. W.; VLEESHOWERS, V. G. A. A.; KAMOUN, S.; GOVERS, F. 1999. Characterisation of a cDNA encoding pathogenesis-related protein PR-1 from potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Physiology**, 121:1384.
- VILJOEN, A. 2002. The status of *Fusarium* wilt (Panama disease) of banana in South Africa. **South African Journal of Science**, 98:341-344.

- VOLK, R. J.; KAHN, R. P.; WEINTRAUB, R. L. 1958. Silicon content of the rice plant as a factor in influencing its resistance to infection by the rice blast fungus, *Piricularia oryzae*. **Phytopathology**, 48:121-178.
- VOOGT, W. 1990. Si applications on grown cucumber. In: GLASSHOUSE CROPS RESEARCH STATION. **Annual Report**, 199:13-14.
- VOOGT, W. 1992. The effects of Si application on roses in rockwool. In: GLASSHOUSE CROPS RESEARCH STATION. **Annual Report**, 1992:17-18.
- WAGNER, F. 1940. Die bedeutung der Kieselsäure für das Wachstum einiger Kulturpflanzen ihren Nährstoffhaushalt und ihre Anfälligkeit gegen echte Mehltaupilze, **Phytopathology**, 12:427-429.
- WALTER, M. H. 1992. **Regulation of lignification in defense**. In: Plant Gene Research: Genes involved in plant defense. (Eds. T Boller & F. Meins). Springer-Verlag, Wien, Austria.
- WARDOP, A. B. 1971. **Occurrence and formation in plant**. In: Lignins: Occurrence and formation, structure and reactions. (Eds. K. V. Sarkanen and C. H. Ludwig). Wiley-Interscience, New York, USA.
- WANG, Q. S. et al. 1994. Yield response of rice to silica fertilizer. **Soils**, 26(2): 92-94.
- WHAN, J. A.; DANN, E. K.; SMITH, L. J.; AITKEN, E. A. B. 2009. Acibenzolar-S-methyl-induced alteration of defense gene expression and enzyme activity in cotton infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 73: 175-182.
- WILDERMUTH, M. C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F. M.; Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. **Nature**, 414:562-565.
- WILLEKENS, H.; LANGEBARTELS, C.; TIRÉ, C.; VAN MANTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, D. 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana glauca* (L.). **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, 91:10450-10454.
- WINDELS, C. E. 1991. Current status of *Fusarium* taxonomy. **Phytopathology**, 81:1048-1051.
- WINSLOW, M. D. 1992. Silicon, disease resistance and yield of rice genotypes under upland cultural conditions. **Crop Science** 32:1208-1213.
- WENDEHENNE, D.; DURNER, J.; KLESSIG, D. F. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signaling and defense response. **Current Opinion in Plant Biology**, 7:449-455.

- WU, W. S.; HSIEH, T. F. 1990. The effect of nutrient condition on *Rhizoctonia solani* Kuhn AG-1 caused sorghum sheath blight. **Plant Protection Bulletin Taipei**, 32(4):265-276.
- WUYTS, N.; LOGNAY, G.; SÁGI, L.; DE WAELE, D.; SWENNEN, R. 2010. Secondary metabolites in roots and implications for nematode resistance in banana (*Musa* spp.). Disponível em: www.musalit.inibap.org/pdf/IN050571_en.pdf. Acesso em 22 de Nov. de 2010.
- XIANG, L.; MOORE, B. S. 2005. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia-lyase. **Journal of Bacteriology**, 187:4286-4289.
- YAMAJI, N.; MITANI, N.; MA, J, F. 2008. A transporter regulating silicon distribution in Rice shoot. **Plant Cell**, 20: 1381-1389. ZUCCARINI, P. 2008. Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, 52(1):157-160.
- YANG, L.; ZHAO, P.; WANG, L.; FILIPPUS, I.; MENG, X. 2010. Synergistic effect of oligochitosan and silicon on inhibition of *Monilinia fructicola* infections. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90:630-634.
- YANG, Y. F.; LIANG, Y. C.; LOU, Y. S; SUN, W. C. 2003. Influences of silicon on peroxidase, superoxide dismutase activity and lignin content in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relation to resistance to powdery mildew. **Scientia Agricultura Sinica**, 36:813-817.
- ZANÃO JUNIOR, L. A.; FONTES, R. L. F.; COELHO, P. H. M.; KORNDORFER, G. H.; ZAMBOLIN, L. 2010. Soil-applied silicon decreases severity of wheat spot blotch on silicon-deficient soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 34: 401-408.
- ZANÃO JUNIOR, L. A.; RODRIGUES, F. A.; FONTES, R. L. F.; KORNDORFER, G. H.; NEVES, J. C. L. 2009. Rice Resistance to Brown Spot Mediated by Silicon and Its interaction with Manganese. **Journal of Phytopathology**, 157:73-79.
- ZUCCARINI, P. 2008. Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. **Plant Biology**, 52:157-160.