



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS



ANA CAROLINE DE MELO BASTOS MORAIS

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Colletotrichum truncatum* EM *Phaseolus lunatus* POR
ISOLADOS DE *Fusarium* spp. E *Rhizobium* spp.**

Rio Largo - AL

2022

ANA CAROLINE DE MELO BASTOS MORAIS

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Colletotrichum truncatum* EM *Phaseolus lunatus* POR
ISOLADOS DE *Fusarium* spp. e *Rhizobium* spp.**

Tese de Doutorado apresentada a banca do programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Proteção de Plantas.

Rio Largo - AL

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana - CRB4 - 1512

M827i Morais, Ana Caroline de Melo Bastos.

Indução de resistência a *Colletotrichum truncatum* em *Phaseolus lunatus* por isolados de *Fusarium* spp. e *Rhizobium* spp. / Ana Caroline de Melo Bastos Morais. – 2022.

109f.: il.

Orientador(a): Gildemberg Amorim Leal Júnior.

Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Programa de Pós - Graduação em, Proteção de Plantas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2022.

Inclui bibliografia

1. Microrganismos endofíticos. 2. Controle de doenças de plantas. 3. Antracnose. I.
Título.

CDU: 632.9

ANA CAROLINE DE MELO BASTOS MORAIS

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Colletotrichum truncatum* EM *Phaseolus lunatus*
POR *Fusarium* spp. e *Rhizobium* spp.**

Tese submetida à banca
avaliadora como requisito para
conclusão de Doutorado em
Proteção de Plantas, aprovada
no dia 31 de agosto de 2022.



Documento assinado digitalmente
GILDEMBERG AMORIM LEAL JUNIOR
Data: 11/10/2022 17:44:17-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior – Universidade Federal de Alagoas
Orientador

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
MARIA DE FATIMA SILVA MUNIZ
Data: 13/10/2022 20:08:20-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Silva Muniz - Universidade Federal de Alagoas



Documento assinado digitalmente
EDNA PEIXOTO DA ROCHA AMORIM
Data: 17/10/2022 09:35:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a Edna Peixoto da Rocha Amorim - Universidade Federal de Alagoas
Orientadora



Documento assinado digitalmente
TAMARA CLAUDIA DE ARAUJO GOMES
Data: 17/10/2022 12:01:36-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr.^a Tâmara Cláudia de Araújo Gomes – EMBRAPA Tabuleiros Costeiros

RIO LARGO – AL
2022

Aos meus pais,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter permitido que eu tivesse saúde física, mental e determinação para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Iêda Cristina e José Valderez, por tudo, mas principalmente pelo amor e empenho em me proporcionar a melhor formação acadêmica e como ser humano.

Ao meu esposo, João, por tanto amor, paciência e apoio.

Aos meus familiares que sempre acreditaram.

Aos colegas pelo apoio demonstrado ao longo de todo o tempo em que me dediquei a este trabalho, Geórgia, Thiago, Romário, Glauber, Tomaz, Joais, Camila, Bruno e tantos outros, a caminhada ficou mais tranquila com vocês.

Aos professores, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado, em especial as professoras Fátima, Edna e Jaqueline Figueiredo.

Ao meu orientador, Jupará, por tantos desafios.

Agradeço aos responsáveis pelos laboratórios de Nematologia, Micologia e Fitopatologia pela infraestrutura, reagentes e equipamentos, sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.

A todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, seria impossível citar todo mundo.

A FAPEAL pela concessão da bolsa e amparo a pesquisa no estado.

A todos que fazem parte do CECA – UFAL.

Gratidão.

Para isso existem as escolas: não para ensinar as respostas, mas para ensinar as perguntas. As respostas nos permitem andar sobre a terra firme. Mas somente as perguntas nos permitem entrar pelo mar desconhecido.

Rubem Alves

RESUMO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma cultura negligenciada que atende a agricultura familiar no Nordeste brasileiro, onde além de ser uma das principais fontes de proteínas e minerais na alimentação da população da região Nordeste do Brasil, também é utilizada como adubo verde, fonte de nitrogênio e cobertura morta para o solo. A produtividade da lavoura é prejudicada pela incidência de doenças, entre as quais, a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), cujo controle está restrito a utilização de sementes livres de patógenos e a rotação de culturas. A falta de relatos de materiais resistentes justifica a busca por alternativas sustentáveis e eficientes que fomentem a resistência ao patógeno, entre os quais a indução de resistência por agentes bióticos. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito de isolados *Fusarium* spp., obtidos de planta assintomáticas, e *Rhizobium* spp., obtidos de nódulos, de *Phaseolus lunatus* na ativação da resposta de defesa contra o agente causal da antracnose, *C. truncatum*. O experimento iniciou com a obtenção dos isolados de *Fusarium* spp. e *Rhizobium* spp., em seguida foi feita a caracterização morfológica, a avaliação da antibiose direta de *Fusarium* spp. e *Rhizobium* spp. em relação ao *C. truncatum*. A seleção do material para análise das enzimas de resistência foi feita a partir de experimentos de produção biomassa e reposta de resistência. A indução de resistência foi confirmada com a análise das enzimas Peroxidase e Fenilalanina amônia-liase. Os isolados de *Fusarium* spp. FF 11.1 e FF 3 e o isolado B. Nelita de *Rhizobium* sp. foram capazes de reduzir a severidade da doença e induzir resistência.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos; Controle de doenças de plantas; Antracnose.

ABSTRACT

The fava bean (*Phaseolus lunatus* L.) is a neglected crop that serves family farming in the Brazilian Northeast, where in addition to being one of the main sources of proteins and minerals in the diet of the population of the Northeast region of Brazil, it is also used as fertilizer, green, nitrogen source and mulch for the soil. Crop productivity is affected by the incidence of diseases, including anthracnose (*Colletotrichum truncatum*), whose control is restricted to the use of pathogen-free seeds and crop rotation. The lack of reports of resistant materials justifies the search for sustainable and efficient alternatives that promote resistance to the pathogen, including the induction of resistance by biotic agents. This work aimed to verify the effect of isolates *Fusarium* spp., obtained from asymptomatic plants, and *Rhizobium* spp., obtained from nodules, of *Phaseolus lunatus* on the activation of the defense response against the causal agent of anthracnose, *C. truncatum*. The experiment started with the obtaining of *Fusarium* spp. and *Rhizobium* spp., then the morphological characterization, the evaluation of the direct antibiosis of *Fusarium* spp. and *Rhizobium* spp. in relation to *C. truncatum*. The selection of material for analysis of resistance enzymes was made from experiments of biomass production and resistance response. The induction of resistance was confirmed with the analysis of the enzymes Peroxidase and Phenylalanine ammonia-lyase. *Fusarium* spp. FF 11.1 and FF 3 and the isolate B. Nelita from *Rhizobium* sp. were able to reduce disease severity and induce resistance.

Keywords: Endophytic microorganisms; Control of plant diseases; anthracnose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Conídios e apressórios de ICT 12 (A) e ICT 16 (B).	52
Figura 2	Coloração do micélio dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. em cultivo isolado e em confronto com os isolados de <i>C. truncatum</i>	54
Figura 3	Árvore filogenética baseada nas sequências parciais região ITS dos isolados FF 3, FF 11.1, FF 12.1 e FF12.2 e estirpes tipo dos gêneros obtidas no Genbank.	64
Figura 4	Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit) dos isolados FF 11.1, FF 12.1 e FF12.2 e estirpes tipo dos gêneros obtidas no Genbank.	65
Figura 5	Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit) do isolado FF 3 e estirpes tipo dos gêneros obtidas no Genbank.	66
Figura 6	Folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com <i>Fusarium</i> spp. e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> , 45 dias após o plantio.	63
Figura 7	Esquema exemplificando a avaliação do antagonismo em culturas pareadas. A – Confronto; B – Testemunha.	83
Figura 8	Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados B. Nelita e Olho de peixe e estirpes tipo dos gêneros obtidas no Genbank.	92
Figura 9	Resposta de indução de resistência conferida por espécies de <i>Rhizobium</i> em plantas de feijão fava inoculadas com <i>C. truncatum</i> .	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escala de notas para sintomas de <i>Fusarium</i> proposta por Tokeshi & Galli (1966)	46
Tabela 2	Morfometria dos macros e microconídios e índice de velocidade de crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. em meio BDA.	53
Tabela 3	Valores médios de escala de notas, altura de planta, número de folhas, matéria seca da parte aérea e raiz de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculados com isolados de <i>Fusarium</i> spp.	55
Tabela 4	Repetição do experimento. Valores médios de escala de notas, altura de planta, número de folhas, matéria seca da parte aérea e raiz de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculados com isolados de <i>Fusarium</i> spp.	56
Tabela 5	Avaliação de folhas na planta de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12 e ICT 16).	57
Tabela 6	Repetição do experimento. Avaliação de folhas na planta de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12 e ICT 16).	58
Tabela 7	Avaliação de folhas na planta de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12)	59
Tabela 8	Repetição do experimento. Avaliação de folhas na planta de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12)	59
Tabela 9	Atividade da Peroxidase em folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com <i>Fusarium</i> spp. e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹	61
Tabela 10	Repetição do experimento. Atividade da Peroxidase em folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com <i>Fusarium</i> spp. e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹	61
Tabela 11	Atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com <i>Fusarium</i> spp. e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> nos tempos de coleta de um dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a	62

inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹

Tabela 12	Repetição do experimento. Atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com <i>Fusarium</i> spp. e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> nos tempos de coleta de um dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹	63
Tabela 13	Caracterização morfológica das colônias dos isolados de rizóbio em meio YMA	88
Tabela 14	Taxa de crescimento diário dos isolados <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12 e ICT 16) e em cultivos pareados com isolados rizobiais. A avaliação aconteceu durante sete dias e em meio BDA.	89
Tabela 15	Avaliação de matéria seca da parte aérea, raiz e nódulos e quantidade de nódulos para a inoculação de isolado de rizóbio em solo autoclavado, por 45 dias.	90
Tabela 16	Avaliação de plantas de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12 e ICT 16) em solo autoclavado.	91
Tabela 17	Repetição do experimento. Avaliação de plantas de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12 e ICT 16) em solo autoclavado.	91
Tabela 18	Avaliação de plantas de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12).	93
Tabela 19	Repetição do experimento. Avaliação de plantas de <i>Phaseolus lunatus</i> inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> (ICT 12).	94
Tabela 20	Atividade da Peroxidase em folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com espécies de <i>Rizobium</i> e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹	94
Tabela 21	Repetição do experimento. Atividade da Peroxidase em folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com espécies de <i>Rizobium</i> e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> nos tempos de coleta de 1 dia antes da	95

inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹

Tabela 22	Atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com espécies de <i>Rizobium</i> e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹ .	96
Tabela 23	Repetição do experimento. Atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> tratadas com espécies de <i>Rizobium</i> e inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹ .	97
Tabela 24	Isolados submetidos à análise de DNA neste estudo com número de acessos ao GenBank	107
Tabela 25	Isolados submetidos à análise de DNA neste estudo com número de acessos ao GenBank	107
Tabela 26	Isolados submetidos à análise de DNA neste estudo com número de acessos ao GenBank	108
Tabela 27	Isolados submetidos à análise de DNA neste estudo com número de acessos ao GenBank	109

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
	2.1.A cultura do feijão-fava	20
	2.2.Doenças do feijão-fava	21
	2.2.1. A doença antracnose	21
	2.3.Mecanismos de resistência	22
	2.4.Indução de resistência por isolados de <i>Fusarium</i> spp.	24
	2.5.Indução de resistência por <i>Rhizobium</i> spp.	26
	2.6.Enzimas de defesa	27
	REFERÊNCIAS	29
	CAPÍTULO 1: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE EM <i>Phaseolus lunatus</i> POR ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.	40
3	INTRODUÇÃO	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
	4.1.Local de execução dos experimentos	43
	4.2.Material Vegetal	43
	4.3.Isolados de fungos (<i>Fusarium</i> spp. e <i>Colletotrichum truncatum</i>)	43
	4.4.Caracterização morfo cultural dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	44
	4.5.Antagonismo entre <i>Fusarium</i> spp. e <i>Colletotrichum truncatum</i>	45
	4.6.Patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> spp. em <i>P. lunatus</i>	45
	4.7.Avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados de <i>Fusarium</i> spp.	46
	4.8.Ensaio de indução de resistência com quatro isolados de <i>Fusarium</i> spp. selecionados.	47
	4.9.Atividade enzimática	48
	4.9.1. Peroxidase	48
	4.9.2. Fenilalanina amônia-liase	49
	4.10.Caracterização genética do <i>Fusarium</i> spp.	50
5	RESULTADOS	52
	5.1.Caracterização morfo cultural dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	52
	5.2.Antagonismo entre <i>Fusarium</i> spp. e <i>Colletotrichum truncatum</i>	53
	5.3.Patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> spp. em <i>P. lunatus</i> .	54

5.4.	Avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados de <i>Fusarium</i> spp.	56
5.5.	Ensaio de indução de resistência com quatro isolados de <i>Fusarium</i> spp. selecionados	58
5.6.	Atividade enzimática	60
5.6.1.	Peroxidase	60
5.6.2.	Fenilalanina amônia-liase	62
5.7.	Caracterização genética de <i>Fusarium</i> spp.	63
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	CAPÍTULO 2: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A <i>Colletotrichum truncatum</i> EM <i>Phaseolus lunatus</i> POR <i>Rhizobium</i> spp.	77
8	INTRODUÇÃO	79
9	MATERIAL E MÉTODOS	81
9.1.	Material Vegetal	81
9.2.	Obtenção dos microrganismos	81
9.3.	Caracterização fenotípica dos isolados rizobiais	82
9.4.	Antagonismo entre os isolados rizobiais e <i>C. truncatum</i> .	82
9.5.	Promoção de crescimento pelos isolados rizobiais em <i>P. lunatus</i> .	83
9.6.	Avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados rizobiais	84
9.7.	Extração de DNA de isolados contrastantes de rizóbio	84
9.8.	Ensaio de indução de resistência com dois isolados de <i>Rhizobium</i> spp. selecionados	86
9.9.	Atividade enzimática	86
9.9.1.	Peroxidase	86
9.9.2.	Fenilalanina amônia-liase	87
10	RESULTADOS	88
10.1.	Caracterização fenotípica dos isolados rizobiais	88
10.2.	Antagonismo entre os isolados rizobiais e <i>C. truncatum</i> .	88
10.3.	Promoção de crescimento pelo isolados rizobiais em <i>P. lunatus</i>	89
10.4.	Avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados rizobiais	90
10.5.	Caracterização molecular dos isolados contrastantes de rizóbio	91

10.6.	Ensaio de indução de resistência com 2 isolados de <i>Rhizobium</i> spp. selecionados	93
10.7.	Atividade enzimática	94
10.7.1.	Peroxidase	94
10.7.2.	Fenilalanina amônia-liase	95
11	DISCUSSÃO	98
12	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE	107

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, que é usada como fonte de alimento em países da América, África, Ásia, Europa e Brasil. A fava possui um alto teor de minerais, boa disponibilidade de ferro e proteínas. Suas funções são de grande importância para o ser humano, pois tais componentes são essenciais para o perfeito equilíbrio orgânico, fazendo parte de praticamente todos os tecidos do corpo humano. Apesar de suas excelentes propriedades, é uma cultura negligenciada e atende a agricultura familiar no Nordeste brasileiro, onde além de ser uma das principais fontes de proteínas e minerais na alimentação dessa população, também é utilizada como adubo verde, fonte de nitrogênio, e cobertura morta para o solo (JUNQUEIRA et al. 2010).

A produtividade da lavoura é prejudicada pela incidência de doenças. As doenças de maior severidade nesta cultura são: as viroses (*Bean golden mosaic virus*), a rizoctoniose (*Rhizoctonia solani*), a podridão radicular (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*), a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), o míldio (*Phytophthora phaseoli*), o crestamento bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*), a murcha vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) e as galhas radiculares causadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, que podem provocar a redução considerável da produção (BRINK & BELAY, 2006).

A suscetibilidade do feijoeiro a espécie *C. truncatum*, agente causador da antracnose, é um dos fatores limitantes para o controle da doença, que está restrito a utilização de sementes livres de patógenos e a rotação de culturas. A falta de relatos de materiais resistentes justifica a busca por alternativas sustentáveis e eficientes que fomente a resistência ao patógeno. A indução de resistência é uma estratégia válida principalmente para culturas negligenciadas que são desassistidas pela falta de controle químico e melhoramento genético, visando resistência a doenças. O processo de indução de resistência das plantas contra patógenos corresponde a fatores que leva a ativação dos mecanismos de defesa, que podem ser de dois tipos: resistência sistêmica adquirida (SAR) ou resistência sistêmica induzida (ISR). A resistência sistêmica induzida (ISR) pode ser ativada por estirpes não-patogênicas de *Fusarium* e bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio. Espécies como *Fusarium oxysporum* e *Rhizobium etli* já foram caracterizadas como indutores de resistência em diversas culturas. Contra fungos fitopatogênicos pertencentes aos mais diversos gêneros de fungos.

As interações da planta com os microrganismos do solo constituem uma barreira de proteção a doenças. As interações não patogênicas e simbióticas têm favorecido a indução de resistência contra patógenos. Na fava é bem conhecida a interação com simbioses fixadoras de

nitrogênio sendo os relatos com outros componentes da microbiota do solo mais escassos. As interações com microrganismos além de trazer vantagens para o desenvolvimento da planta têm contribuído para aumento da resistência a patógenos, porém é necessária a verificação da contribuição de agentes da microbiota do solo residentes da rizosfera ou simbioses como indutores de resistência.

OBJETIVOS

Objetivo geral: Investigar a eficiência de isolados de *Fusarium* spp. e de *Rhizobium* spp. como agente indutores de resistência a antracnose do feijão-fava.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a interação entre isolados de *Fusarium* spp. e *Colletotrichum truncatum* *in vitro*.
2. Realizar estudos sobre as características morfológicas e culturais de *Fusarium* spp.
3. Avaliar a capacidade de isolados de *Fusarium* spp. como indutor de resistência à antracnose do feijão-fava.
4. Verificar *in vivo* a capacidade simbiótica entre rizóbios na indução de resistência dos isolados de *C. truncatum* correlacionando-a com a patogenicidade e nível de agressividade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do feijão-fava

A fava possui características de ciclo anual, bianual ou perene, germinação epígea e hábito de crescimento determinado ou indeterminado (BEYRA & ARTILES, 2004), seu cultivo é feito na Europa, América do Norte, América do Sul, no leste e oeste da África e no sudeste da Ásia (BAUDOIN, 1988). Entre as dicotiledôneas, a família *Fabaceae* é uma das maiores, com 643 gêneros, reunindo 18.000 espécies (BROUGHTON et al., 2003). Dentre as espécies do gênero *Phaseolus*, o feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma das quatro exploradas comercialmente, junto com *P. vulgaris* (feijão comum), *P. coccineus* (feijão ayocote) e *P. acutifolius* (feijão tepari) (ZIMMERMANN & TEIXEIRA, 1996).

No Brasil, a cultura é explorada nos estados de Alagoas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Rio Grande do Sul (IBGE, 2020). É uma das principais leguminosas cultivadas na região tropical, tendo a possibilidade de consumo: os grãos verdes e secos e as vagens verdes; com potencial de fornecer proteína vegetal à população e redução da dependência do feijão-comum (VIEIRA, 1992).

No ano de 2020 o Brasil teve uma produção de 16.225 toneladas numa área plantada de 37.585 hectares, sendo o estado do Ceará o maior produtor nacional com 7.016 toneladas de feijão-fava (IBGE, 2020). A região Nordeste teve uma produção total de 16.562 toneladas em uma área plantada de 37.492 hectares. Alagoas ocupa a sexta posição na produção com 551 toneladas produzidas numa área de 691 hectares (IBGE, 2020). A geração de tecnologias para o cultivo resultará no aumento da área de cultivo, na produção e produtividade (BARREIRO NETO et al., 2015).

Algumas características permitem a identificação da cultura, como: a germinação epígena, as folhas geralmente mais escuras em vagens maduras, as bractéolas pequenas e pontiagudas, vagens bastante compridas e de formato, geralmente, oblonga e recurvada, com duas alturas distintas (ventral e dorsal) e, número de sementes que variam de duas a quatro (ZIMMERMANN & TEIXEIRA, 1996).

Entre os sistemas biológicos que envolvem plantas e microrganismos, o de maior importância para a economia é a simbiose rizóbio-leguminosa. (FRANCO et al., 2002), dessa forma o feijão-fava é capaz de realizar Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) (SANTOS et al., 2008). Entretanto, não há muitos estudos com esta espécie, sendo o maior enfoque direcionado a *P. vulgaris* (ANTUNES et al., 2011).

2.2. Doenças do feijão-fava

O feijão-fava é suscetível a vários patógenos, entre os quais se destacam por sua severidade, vírus, fungos, comicetos, bactérias e nematóides que causam diferentes doenças com capacidade em provocar redução considerável a produção da cultura (BRINK & BELAY, 2006). As espécies de *Colletotrichum* estão entre os patógenos vegetais mais importantes de todo o mundo, responsável por uma doença economicamente importante denominada antracnose.

2.2.1. A doença antracnose

A antracnose é uma doença de importância para diversas culturas (SERRA & SILVA, 2004). Embora não possua relatos das perdas causadas na produção de feijão-fava, ela é citada como uma doença de ampla ocorrência (VIEIRA, 1992), com elevada importância para o Nordeste do Brasil (SERRA & SILVA, 2004). Seus sintomas são manchas avermelhadas ao longo das nervuras, sobre hastes e pecíolos jovens e na face interior das folhas; as vagens adquirem lesões deprimidas, avermelhadas e grandes, onde são formados os acérvulos do patógeno (PAULA JÚNIOR et al., 1995).

A doença é causada pelo gênero *Colletotrichum* (*Glomerellaceae*, *Sordariomycetidae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*, descrito por Corda. Gênero amplamente distribuído e responsável por causar doenças em uma ampla gama de hospedeiros (PAMPHILE et al 2017). A identificação das espécies de *Colletotrichum* é feita através das diferenças morfológicas, características como a cor da colônia, tamanho e forma dos conídios e apressórios e taxa de crescimento (SMITH & BLACK, 1990), além de análises de sequências de ácidos nucleicos, as regiões mais estudadas são: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actina (ACT), quitina sintetase (CHS-1), B-tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), histona (HIS3), glutamina sintetase (GS), superóxido-dismutase de manganês (SOD) e a região do espaçador interno transcrito (ITS) (CANNON et al. 2012; WEIR et al. 2012).

Colletotrichum truncatum, *C. cliviae* e *C. fruticola* foram identificados como agente causal da antracnose em *Phaseolus lunatus* (SOUSA et al. 2018). No território brasileiro há poucos registros de doença em fava, provavelmente é um reflexo de poucos estudos sobre a cultura.

As medidas para o controle são o uso de agroquímicos, a utilização de sementes livres de patógenos e a rotação de culturas (BRINK & BELAY, 2006). Um dos métodos de controle de fitopatógenos, amplamente utilizado, com melhores resultados é a resistência genética, este tem sido utilizado como estratégia em diversas culturas (PEREIRA, 2015).

2.3. Mecanismos de resistência

As plantas possuem um mecanismo de defesa contra o ataque de patógenos, que falham quando estas são atacadas por um patógeno virulento com capacidade de apresentar mecanismos de supressão das reações de resistência ou evitar as defesas ativadas. Muitas vezes a supressão e a fuga da resposta de defesa pelo patógeno está associada a ativação tardia do sistema imune da planta. A indução de resistência parte do pressuposto que a ativação prévia da resposta por agentes bióticos ou abióticos. A ativação das defesas das plantas antes do contato com o agente patogênico evita ou atenua o efeito da supressão ou a fuga dos mecanismos de resistência reduzindo os danos causados pela doença (VAN-LOON et al., 1998). A resistência induzida faz com que a planta possua uma maior capacidade defensiva antes de ser atacada (KUC, 1982). Muitas vezes a indução de resistência assume um caráter de ação de amplo espectro devido a caráter multifatorial dos mecanismos ativados.

A resistência contra patógenos é sistêmica, pois a capacidade defensiva não fica restrita as partes primárias, mas também beneficia as áreas não infectadas (VAN-LOON et al., 1998). A indução dos mecanismos no hospedeiro acontece primeiramente pelo reconhecimento do patógeno que emite o sinal primário ou mensageiro que irá estimular a sinalização hormonal e, por fim, a planta ativa os genes ligados à defesa e/ou aumento da atividade enzimática importante para estas reações de defesa (VAN-LOON & VAN STRIEN, 1999). O processo ativa os mecanismos de defesa, tais como, enzimas pré-formadas para promover modificações específicas no metabolismo primário e secundário; modificação do status de fosforilação de proteínas e ativação da transcrição de numerosos genes relacionados à defesa (CORDEIRO & SÁ, 1999).

A resistência induzida ocorre naturalmente através do ataque de um patógeno, ativando mecanismos de defesa que mimetizam uma infecção primária em órgão não atacado pelo patógeno. Esse caráter sistêmico define como resistência sistêmica adquirida (SAR) (ROSS, 1961; RYALS et al., 1996; STICHER, 1997). A SAR é caracterizada pelo acúmulo do hormônio vegetal ácido salicílico (AS) e pelas proteínas relacionadas com a patogênese (PRs), destacando as peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases. (RYALS et al., 1996; STICHER,

1997). A planta que sofre a indução não apresenta necrose, e o indutor é, geralmente, um agente não-patogênico (VAN-LOON et al., 1998). O SAR pode ser induzido por agentes abióticos e bióticos. A verificação da SAR é feita por sete critérios: ausência de efeitos tóxicos do agente indutor ao patógeno; supressão da resistência induzida por uma aplicação prévia de inibidores, como a actinomicina D (AMD), que afetam a expressão gênica da planta; intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e o início da resistência; ausência de uma correlação entre a resistência e quantidade de indutor; inespecificidade de proteção; proteção local e sistêmica; dependência do genótipo da planta (STEINER & SCHONBECK, 1995). Outro mecanismo de resistência induzida é promovido por agentes não patogênicos presentes na rizosfera e promotores de crescimento na planta, denominado de resistência sistêmica induzida (ISR) (KLOEPPER et al., 1992). O ISR é mediado por outro hormônio vegetal o etileno e ácido jasmônico com a participação da proteína NPR1 que atua também no SAR (SHORESH et al., 2010).

Inúmeros gêneros de microrganismos da rizosfera podem melhorar o crescimento da planta ou promover uma melhor fitossanidade. Os gêneros de microrganismo da rizosfera são inúmeros. Algumas bactérias e fungos da rizosfera são conhecidos como indutores da promoção de crescimento sendo denominados de *plant growth-promoting fungi* - PGPF- ou *plant growth-promoting rhizobacteria* - PGPR (LUGTENBERG, 2009; SHORESH et al., 2010). Os microrganismos da rizosfera têm um importante papel na indução de resistência e no controle de patógenos, principalmente de solos. As bactérias e os fungos filamentosos podem desencadear a redução destas infecções através da competitividade direta por nutrientes ou indireta atuando na planta ativando os mecanismos de defesa (MARTINUZ et al., 2012).

Geralmente, os mecanismos de antagonismo aos patógenos estão associados com competição por nutrientes, afetando a taxa de germinação conidial; bem como a competitividade por sítios de infecções nas raízes; a respostas de hipersensibilidade e/ou sistêmica, quando nestas condições, tornar toda planta protegida contra infecções futuras (FRAVEL et al., 2003). Os fungos com potencial para o controle de patógenos incluem as espécies de *Trichoderma* spp., *Verticillium lecanii* (A'SKARY et al., 1997; BENHAMOU & BRODEUR, 2000.), *Pythium oligandrum* (BENHAMOU & CHET, 1997) e isolados não patogênicos de *Fusarium* spp. (LARKIN & FRAVEL, 1998). As bactérias com potencial para o controle de patógenos são *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* e algumas espécies de *Rhizobium* (ABDELAZIZ et al., 1996; A'SKARY et al., 1997; BENHAMOU & CHET, 1997; LARKIN & FRAVEL, 1998; BENHAMOU & BRODEUR, 2000; OZKOC & DELIVELI, 2001).

2.4. Indução de resistência por isolados de *Fusarium* spp.

O fungo *F. oxysporum* tem distribuição mundial no solo e na rizosfera de muitas espécies de planta (AGRIOS, 2010). O *F. oxysporum* é conhecido por sua patogenicidade a diversas culturas causando podridões na raiz ou murchas vasculares, entretanto, existe a possibilidade da sua utilização como agente de biocontrole (BRADER et al., 2017). Os isolados de *Fusarium* spp. são considerados como não-patogênicos quando na planta hospedeira inoculados com o isolado apresentam ausência completa de sintomas ou presença de sintomas leves. No caso de inoculações em feijoeiro, uma planta que apresente apenas sintomas de descoloração não devem ser classificada como suscetível (VAN SCHOONHOVEN, 1987).

Os fungos não-patogênicos possuem mecanismos específicos para induzir o hospedeiro a obter resistência a estirpes patogênicas (FUCHS et al., 1997). Os mecanismos de ação podem ser divididos em duas categorias: Antagonismo direto e indireto (FRAVEL et al., 2003). O antagonismo direto está relacionado com a competição no solo e na rizosfera por carbono ou a competição na superfície da raiz e nos tecidos das plantas, onde ao tentar colonizar ativa as respostas de defesa da planta com o espessamento da parede celular (OLIVAIN & ALABOUVETTE, 1999). Já o antagonismo indireto é quando a planta pré-inoculada com uma estirpe não-patogênica resulta na redução do sintoma quando inoculada com um patógeno compatível (MATTA, 1989), esse fenômeno é considerado uma expressão da indução de resistência sistêmica (ISR), uma resposta geral de defesa da planta a infecções microbiana ou vários estresses (FRAVEL et al., 2003).

Estirpes não-patogênicas de *Fusarium* reduziram os sintomas da doença (SILVA & BETTIOL, 2005) e são indicadas como indutor de resistência (KAUR et al., 2010) contra a murcha vascular causada por diversas *forma specialis* de *Fusarium oxysporum*. Já foi relatada sua eficiência antagônica in vitro contra 10 fungos patogênicos a plantas (*Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, *R. solani*, *Rhizoctonia* sp.) com efeito inibitório direto de antibiose e competição (THONGKAMNGAM & JAENAKSORN, 2017). Ao inocular plantas de grão de bico com isolados não patogênicos de *F. oxysporum* foi constatada uma diminuição dos sintomas quando as plantas foram posteriormente inoculadas com *F. oxysporum* patogênico (KAUR & SINGH, 2007).

O mecanismo primário da ação do *Fusarium* sp. não-patogênico está associado com a indução de resistência (ISR) e a competição, que por sua vez, pode ser categorizada em competição saprofítica por nutrientes no solo e rizosfera; e competição parasitária por sítios de

infecções nas raízes (KAUR et al., 2010). Observa-se atenuação dos sintomas a estirpes mais agressivas com inoculação de espécime não-patogênica (MATTA, 1989). A aplicação de isolados de *F. oxysporum* 47 não-patogênico, reduziram os sintomas da murcha de *Verticillium* (*Verticillium dahliae*); podridão nas raízes e ferrugem das folhas ambas causadas por *Phytophthora capsici* em plantas de pimenta (DIAZ et al., 2005). A indução de resistência *F. oxysporum* 47 pode estar associada a indução em Pimentão (*Capsicum annuum*) de proteínas relacionadas a patogênese (PR-1 e quitinase) e de enzimas das vias de síntese fitoalexinas (sesquiterpeno ciclase) (VELOSO & DIAZ, 2012).

Isolados de *Fusarium* spp. tem mostrado indução de resistência contra patógenos da parte aérea (ISHIBA et al., 1981). Estudos mostram que os mecanismos de indução de resistência diferenciam entre os ativados nas raízes e ativados nas folhas (PAPADOPOULOU et al., 2018). Outro fator a ser considerado que os efeitos benéficos restringem apenas à indução de resistência sistêmica por *F. oxysporum* 47, não havendo ganhos para o desenvolvimento da planta (SILVA & BETTIOL, 2005). No entanto, linhagens de *Fusarium* spp. hipo-patogênica isoladas de *Phaseolus lunatus* apresentaram efeitos de promoção de crescimento que precisam ser confirmados (CARDOSO FILHO et al., 2012)

A resposta de isolados não patogênicos de *Fusarium* spp. pode ser variada. Alguns isolados têm efeito direto e outros apresentam eliciadores que ativam a resposta de defesa da planta (PATIL et al., 2011). Apesar do crescente interesse em pesquisas dedicadas ao controle de doenças por *Fusarium* spp. o mecanismo exato sobre o efeito como bioprotetor ainda estão incompletos, sendo o fungo não patogênico capaz de iniciar eventos bioquímicos característicos da planta relacionados a resistência a doenças, através da competição de carbono na rizosfera e um iniciador de reações de defesa da planta (BENHAMOU & GARAND, 2001). Tendo evidência de que Fo47 exerce um efeito inibitório direto sobre *Pythium ultimum* por uma combinação de antibiose e micoparasitismo, além de um forte indutor de reações de defesa da planta (BENHAMOU et al., 2002). Entretanto, há divergências sobre o assunto. A falta de informações relacionadas ao surgimento de novas raças do patógeno gera insegurança em relação a possibilidade do agente de biocontrole tornar-se patogênico, sendo necessários maiores estudos sobre o assunto (FRAVEL et al., 2002).

O estudo dos efeitos benéficos de indução de resistência na parte aérea da planta devido as interações da planta com microbiota da rizosfera devem ser principalmente em relação a patógenos da parte aérea. Uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenicidade e no mutualismo facilitará e promoverá o desenvolvimento e aplicação de soluções microbianas sustentáveis na produção agrícola (BRADER et al., 2017),

principalmente para as culturas desassistidas cultivadas na agricultura de subsistência que apresentam um baixo investimento em tecnologia para melhoria da produção e proteção contra as perdas de produção causados pelos patógenos.

2.5. Indução de resistência por *Rhizobium* spp.

As rizobactérias estão presentes na superfície das raízes (LYNCH & WHIPPS, 1990) e algumas espécies são capazes de promover o crescimento das plantas. Enquanto outras são capazes de suprimir as doenças (WELLER, 1988). As rizobactérias são agentes promissores no controle biológico de fungos, vírus, nematoides e bactérias (ESSALMANI & LAHLOU, 2003). Entre as rizobactérias potenciais para promover a indução de resistência, os rizóbios oferecem a vantagem de fixar nitrogênio por associação simbiótica (PEOPLES et al., 1995).

O mecanismo de supressão de patógenos causada pelas bactérias simbiotes presentes na rizosfera são similares aos fungos. O controle de patógenos por *Rhizobium* spp. acontece via vários mecanismos de ação (ARFAOUI et al., 2006): competição por ferro (CARRILLO & DEL ROSARIO, 1992); competição por nutriente (ESSALMANI & LAHLOU, 2002); através da aceleração do crescimento da parte aérea e raiz (SIDDIQUI et al., 2000); produção de antibióticos (EHTESHAMUL-HAQUE & GHAFAR, 1993); indução de mecanismos de defesa da planta (ABDELAZIZ et al., 1996). O mecanismo de ação dessas bactérias tem relação com a antibiose contra o patógeno (BUCHENAUER, 1998), e a indução do sistema de resistência da planta (BAKKER et al., 2003). Substâncias com efeito inibitório podem ser antibióticos (DEFAGO & HAAS, 1990), substâncias voláteis (MOORE-LANDECKER & STOTZKY, 1972) ou enzimas (INBAR & CHET, 1991).

A resistência da planta a doenças foi demonstrada em diversas culturas com mecanismos muito variáveis, como por exemplo a síntese de ácido salicílico que induz um aumento na defesa da planta, lipopolissacarídeos, o envolvimento de estruturas por células mortas do antagonista (*Rhizobium etli* foi capaz de estimular a resistência das plantas de batata contra a infecção por *Globodera*) (ESSALMANI & LAHLOU, 2003). Além de beneficiar no controle de doenças, o rizóbio pode melhorar o crescimento e rendimento das plantas. *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum* são tipos de rizóbios que apresentam sucesso contra fungos patógenos pertencentes aos gêneros *Macrophomina*, *Rhizoctonia* e *Fusarium* (EHTESHAMUL-HAQUE & GHAFAR, 1993; OZKOC & DELIVELI, 2001). Isolados de rizóbio podem ser eficazes em condições comerciais, na redução dos danos causados por murcha de *Fusarium* (ARFAOUI et al., 2006).

2.6. Enzimas de defesa

A infecção por patógenos induz a síntese de um conjunto de proteínas relacionadas as respostas de defesa (VAN-LOON, 1997) como a quitinase, glucanase, glicosidase, NADPH oxidase e enzimas do metabolismo vegetal secundário, incluindo fenilalanina amônia-liase e peroxidase. Ao sofrer a invasão por um patógeno, geralmente há o aumento de várias atividades enzimáticas, resultando em compostos como fitoalexinas, fenólicos, lignina e vários outros (HOAGLAND, 1990). Devido a atuação generalizada nos mecanismos de indução de resistência a atividade das enzimas são utilizadas como marcadores da indução de resistência em planta por agentes bióticos e abióticos.

O funcionamento da peroxidase (E.C. 1.11.1.7) consiste na oxidação desidrogenativa do guaiacol, resultado em radicais fenoxi seguida de ligação de radicais instáveis que leva a polimerização de monômeros e de maneira similar hidroxicinamil álcool e os derivados são convertidos em radicais fenoxi formando lignina, ácido hidroxicinâmico convertido em suberina (HIRAGA et al., 2001). No processo de defesa é responsável por reforçar a parede celular, atuando também na sinalização induzindo a formação de fitoalexina (KAUHN, 2007), relacionada as repostas de defesa em muitas plantas, como as repostas do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a antracnose (CAMPOS et al., 2004), do caupi (*Vigna unguiculata* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (RODRIGUES, BEZERRA NETO & COELHO, 2006), do inhame (*Dioscorea* L.) a *Curvularia eragrostidis* (LEITE et al. 2020), da soja (*Glycine max* L.) a *Macrophomina phaseolina* (LORENZETTI et al., 2018), da rúcula (*Eruca sativa* L.) a *Eruca sativa* (IURKIV et al., 2020), entre outros.

A fenilalanina amônia-liase (E.C. 4.3.1.5) tem ampla distribuição em plantas e agindo através da conversão de L-fenilalanina em trans-cinamato e amônia sua atividade é ampliada pela exposição a vários fatores, como luz, feridas, mudança de temperatura e infecção por patógenos (HOAGLAND, 1990). Vários estudos mostram que há o aumento nos níveis de fenilalanina amônia-liase em tecidos resistentes, como em mudas de videira (*Vitis vinífera* L.) resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (LIMA et al., 2017), em *Opuntia* spp. a *Dactylopius opuntiae* (DA SILVA et al., 2021), aumento da resistência em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (DE LIMA et al., 2020), de arroz preto (*Oryza sativa* L.) a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (SOLEKHA et al., 2020), de café (*Coffea* L.) a *Hemileia vastatrix* (MONTEIRO et al., 2016), entre outros.

As proteínas relatadas (Peroxidase e Fenilalanina amônia-liase) são ativadas e/ou potencializada por indutores de resistência, sendo seu aumento um indicativo do efeito protetor e sua durabilidade em relação ao ataque de plantas por patógenos (ITAKO, 2011).

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, R. A., RADWANSAMIR, M. A., ABDEL-KADER, M., & BARAKAT, M. A. Biocontrol of faba bean root-rot using VA mycorrhizae and its effect on biological nitrogen fixation. **Egyptian Journal of Microbiology (Egypt)**, 31, p. 273-286. 1996.
- AGRIOS, George N. **Introduction to plant pathology**. Elsevier Academic Press Publication, 2010.
- ANDRUS, C. F.; MOORE, W. D. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), n. comb., on garden and lima beans. **Phytopathology**, v. 25, p. 121-125, 1935.
- ANTUNES, J. E. L.; GOMES, E. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 35:751-757, 2011.
- ARFAOUI, A., SIFI, B., BOUDABOUS, A., HADRAMI, I. E., & CHERIF, M. Identification of Rhizobium isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. **Journal of Plant Pathology**, 88(1), p. 67-75, 2006.
- ASKARY, H.; BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. **Phytopathology**, v. 87, n. 3, p. 359-368, 1997.
- BAKKER, P. A. H. M., RAN, L. X., PIETERSE, C. M. J., & VAN LOON, L. C. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 25, n. 1, p. 5-9, 2003.
- BARREIRO NETO, M.; FAGUNDES, R. A. A.; BARBOSA, M. M.; ARRIEL, N. H. C.; FRANCO, C. F. O.; SANTOS, J. F. Características morfológicas e produtivas em acessos de feijão fava consorciado. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 9, n. 3, p.23 – 27, 2015.

BAUDOIN, J. P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: Gepts, P. (ed.). **Genetic resources of Phaseolus bean**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, p.393-407, 1988.

BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. **Phytopathology**, v. 90, n. 9, p. 932-943, 2000.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 2095-2099, 1997.

BENHAMOU, N.; GARAND, C. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **Phytopathology**, v. 91, n. 8, p. 730-740, 2001.

BENHAMOU, N.; GARAND, C.; GOULET, A. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4044-4060, 2002.

BEYRA, A.; ARTILES, G. R. Revisión taxonômica de los gêneros *Phaseolus* y *Vigna* (Leguminosae - Papilionoideae) en Cuba. **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**, v.61, p.135-154, 2004.

BRADER, G.; COMPANT, S.; VESCIO, K.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; M.A, L. J.; & SESSITSCH, A. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. **Annual review of phytopathology**, v. 55, p. 61-83, 2017.

BRINK, M.; BELAY, G. **Cereals and pulses**. PROTA, 2006.

BROUGHTON, W. J.; ERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v.252, n.1, p.55-128, 2003.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria/Biologische Bekämpfung von bodenbürtigen Krankheiten durch Rhizobakterien. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection**, 105 (4), p. 329-348, 1998.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

CAMPOS, Â. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M.; M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CANNON, P. F.; DAMM, U. JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. *Colletotrichum*-current status and future directions. **Studies Mycology**, v. 73, p 181-213 2012.
<https://doi.org/10.3114%2Fsim0014>

CARDOSO FILHO, J. A.; CORREIA, H. L. N.; BRITO NETTO, M. S.; SILVA, W. C.; MONTEIRO, J. H. A.; ASSUNÇÃO, I.; LIMA, G. S. A.; LEAL JUNIOR, G. A. Isolados hipo-patogênicos de *Fusarium oxysporum* aumentam a produção de vagens em Feijão-fava. In: FERTBIO, 2012, Maceió. **FERTBIO 2012**, 2012.

CARRILLO, G. C.; VAZQUEZ, M. del R. G. Comparative study of siderophore-like activity of *Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of plant nutrition**, v. 15, n. 5, p. 579-590, 1992.

CORDEIRO, M. C. R.; SÁ, M. DE F. G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 2, n. 10, p. 34-39, 1999.

DA SILVA, R. M.; DE LIMA, E. J.; BARBOSA, M. A. P.; DOS SANTOS, W. L.; DA SILVA, E. F. T.; BADJI, C. A.; SOUZA-MOTTA, C. M.; OLIVEIRA, J. T. C.; MOREIRA,

K. A. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in genotypes of *Opuntia* spp. against artificial infestation of *Dactylopius opuntiae* submitted to biotic and abiotic resistance inducers. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e41610515106-e41610515106, 2021.

DE LIMA, L. D.; BARBOSA, J. M. P.; MEDEIROS, M. D. B. C. L.; DE OLIVEIRA, M.; DE CARVALHO, J. S. B.; MOREIRA, K. A. Avaliação bioquímica e fisiológica em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) submetida ao indutor de resistência acibenzolar-s-metil. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 4, p. 2374-2393, 2020.

DEFAGO, GENEVIÈVE; HAAS, D. Pseudomonads as antagonists of soilborne plant pathogens: modes of action and genetic analysis. **Soil Biochem**, v. 6, n. 49, p. 291, 1990.

DIAZ, J; SILVAR, C; VARELA, M. M; BERNAL, A; MERINO, F. Fusarium confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. **Plant Pathology**. 54, 773–80, 2005.

EHTESHAMUL-HAQUE, S.; GHAFAR, A. Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. **Journal of phytopathology**, v. 138, n. 2, p. 157-163, 1993.

ESSALMANI, H.; LAHLOU, H. An in vitro investigation on the antagonist action of some microorganisms facing *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. **Cryptogamie Mycologie (France)**, 2002.

ESSALMANI, H.; LAHLOU, H. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, n. 12, p. 1163-1173, 2003.

FRANCO, M. C., CASSINI, S. T. A., OLIVEIRA, V. R., VIEIRA, C., & TSAI, S. M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1145-1150, 2002.

FRAVEL, D. R.; LARKIN, R. P. Reduction of fusarium wilt of hydroponically grown basil by *Fusarium oxysporum* strain CS-20. **Crop protection**, v. 21, n. 7, p. 539-543, 2002.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist** 157: p, 493–502. 2003.

FUCHS, J. G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; DÉFAGO, G. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to Fusarium wilt in tomato. **Plant Diseases**. 81: p, 492-496. 1997.

HAWARE, M. P.; NENE, Y. L.; NATARAJAN, M. The survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in the soil in the absence of chickpea. **Phytopathologia mediterranea**, p. 9-12, 1996.

HIRAGA, S., SASAKI, K., ITO, H., OHASHI, Y., & MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). *Microbes and microbial products as herbicides*. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. p. 87-113

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum*—names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.

INBAR, J.; CHET, I. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, n. 10, p. 973-978, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/panorama>. Acesso em: 01 de julho de 2022.

ISHIBA, C.; TANI, T.; MURATA, M. Protection of cucumber against anthracnose by a hypovirulent strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 47, n. 3, p. 352-359, 1981.

ITAKO, A. T. Avaliação de produtos químicos no controle e na indução de mecanismos bioquímicos de resistência a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) do tomateiro. 2012. (Tese)

IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R. Biotic and abiotic resistance inducers for controlling white rust in rocket (*Eruca sativa*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, 2020.

JUNQUEIRA, S. F.; OLIVEIRA, E. O.; MASCARENHAS, R. J. Caracterização físico-química da fava rajada (*Phaseolus lunatus* L.) cultivada no sertão paraibano. In: **CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO**, 5, 2010, Maceió. Anais. Maceió – AL, p. 1-7, 2010.

KAUR, R.; KAUR, J.; SINGH, S. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological Control Agent. **Plant Patology Journal** 9 (3): p. 79-91, 2010.

KAUR, R.; SINGH, R. S. Study of induced systemic resistance in *Cicer arietinum* L. due to nonpathogenic *Fusarium oxysporum* using a modified split root technique. **Journal of phytopathology**, v. 155, n. 11-12, p. 694-698, 2007.

KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S.; KUĆ, J. A. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, n. 4, p. 349-351, 1992.

KUC, J. Induced immunity to plant disease. **Bioscience**, v. 32, n. 11, p. 854-860, 1982.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LARKIN, R. P.; FRAVEL, D. R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. **Plant disease**, v. 82, n. 9, p. 1022-1028, 1998.

LEITE, R. P.; NASCIMENTO, L. C. D.; GOMES, E. C. D. S.; OLIVEIRA, M. D. D. M. Indução de resistência no manejo da queima das folhas do inhame. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 1, p. 31-35, 2020.

LIMA, M. A. G.; PEIXOTO, A. R.; BORGES, I. V.; SILVA, M. S.; BARBOSA, M. A. G.; CAVALCANTI, L. S. Induction of Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. viticola in Grapevine Plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 2, 2017.

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; & PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.

LYMMAN, J. M. Adaptation studies on lima bean accessions in Colombia. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 108, n. 3, p. 369-373, 1983.

LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and soil**, v. 129, n. 1, p. 1-10, 1990.

MARTINUZ, A.; SCHOUTEN, A.; MENJIVAR, R. D.; SIKORA, R. A. Effectiveness of systemic resistance toward *Aphis gossypii* (Hom., *Aphididae*) as induced by combined applications of the endophytes *Fusarium oxysporum* Fo162 and *Rhizobium etli* G12. **Biological Control**, n. 62, p. 206–212, 2012.

MATTA, A. Induced resistance to fusarium wilt diseases. In: Tjamos EC, Beckman CH, eds. Vascular wilt diseases of plants – basic studies and control. **NATO ASI Series. Berlin**, Germany: Springer Verlag, p. 175–196, 1989.

MONTEIRO, A. C. A.; DE RESENDE, M. L. V.; VALENTE, T. C. T.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; PEREIRA, V. F.; DA COSTA, J. R.; DA SILVA, J. A. G. Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: Biochemical and Molecular Analyses. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 11-12, p. 1043-1053, 2016.

MOORE-LANDECKER, E.; STOTZKY, G. Inhibition of fungal growth and sporulation by volatile metabolites from bacteria. **Canadian journal of microbiology**, v. 18, n. 7, p. 957-962, 1972.

OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. **The New Phytologist**, v. 141, n. 3, p. 497-510, 1999.

ÖZKOÇ, İ.; DELİVELİ, M. H. In vitro inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* isolates. **Turkish Journal of Biology**, v. 25, n. 4, p. 435-445, 2001.

PAMPHILE, J. A., COSTA, A. T., ROSSETO, P., POLONIO, J. C., PEREIRA, J. O., & AZEVEDO, J. L. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Uningá Journal**, v. 53, n. 1, 2017.

PAPADOPOULOU, G. V.; MAEDICKE, A.; GROSSER, K.; VAN DAM, N. M.; MARTÍNEZ-MEDINA, A. Defence signalling marker gene responses to hormonal elicitation differ between roots and shoots. **AoB PLANTS**, v. 10, n. 3, p. ply031, 2018.

PATIL, S.; SRIRAM, S.; SAVITHA, M. J.; ARULMANI, N. Induced systemic resistance in tomato by non-pathogenic *Fusarium* species for the management of *Fusarium* wilt. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 44, n. 16, p. 1621-1634, 2011.

PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; VIEIRA, R. F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, v.17, n.182, p.63-71, 1995.

PEOPLES, M. B.; LADHA, J. K.; HERRIDGE, D. F. Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management. **Plant Soil**. 174:83–101. 1995.

PEREIRA, G. V. N. Seleção fenotípica e identificação de snps em regiões genômicas ligados a resistência à ferrugem em *Eucalyptus grandis*. 2015. (Tese)

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492-499, 2006.

ROSS, A. Frank. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, v. 14, n. 3, p. 340-358, 1961.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The plant cell**, v. 8, n. 10, p. 1809, 1996.

SANTOS, J. O.; ARAÚJO, A. S.; GOMES, R. L.; LOPES, A. C. A.; FIGUEIREDO, M. V. Rhizobia *Phaseolus lunatus* Symbiosis: Importance and diversity and tropical soils-a review. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v. 2, n. 2, p. 56-60, 2008.

SERRA, I. M. R. S.; DA SILVA, G. S. Caracterização morfofisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agentes de antracnose em frutíferas no Maranhão. **Summa phytopatológica**, v. 30, n. 4, p. 475-480, 2004.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 21-43, 2010.

SIDDIQUI, I. A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; ZAKI, M. J.; GHAFFAR, A. Greenhouse evaluation of rhizobia as biocontrol agent of root-infecting fungi in okra. **Acta Agrobotanica**, v. 53, n. 1, p. 13-22, 2000.

SILVA, J. C.; BETTIOL, W. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of Fusarium wilt of tomato. **Fitopatologia Brasileira** 30: p, 409-412. 2005.

SINDHU, S. S.; RAKSHIYA, Y. S.; SAHU, G. Biological control of soilborne plant pathogens with rhizosphere bacteria. **Pest Technol**, v. 3, n. 1, p. 10-21, 2009.

SMITH, B. J.; BLACK, L. L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, v. 74, n. 1, p. 69-76, 1990.

SOLEKHA, R.; SUSANTO, F. A.; JOKO, T.; NURINGTYAS, T. R.; PURWESTRI, Y. A. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) contributes to the resistance of black rice against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 2, p. 359-365, 2020.

SOUSA, E.S; SILVA, J. R. A; ASSUNÇÃO, I. P; MELO, M. P; FEIJÓ, F. M; MATOS, K. S; LIMA, G. S. A; BESERRA JR, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: **Induced resistance to disease in plants**. Springer, Dordrecht, p. 86-110. 1995.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, and JP. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997.

THONGKAMNGAM, T.; JAENAKSORN, T. *Fusarium oxysporum* (F221-B) as Biocontrol Agent against Plant Pathogenic Fungi in Vitro and in Hydroponics. **Plant Protection Science**, v. 53, n. 2, 2017.

VALE, F. X. R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Controle de doenças: doenças de parte aérea causada por fungos. In: Vale, F.X.R.; Zambolim, L (Editores). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, v.1, p.335-374, 1997.

VAN-LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European journal of plant pathology**, v. 103, n. 9, p. 753-765, 1997.

VAN-LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN-LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis – related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN SCHOONHOVEN, Aart. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. CIAT, 1987.

VELOSO, J.; DIAZ, J. *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. **Plant pathology** v. 61, p. 281-288, 2012.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, v.16, n.174, p.30-37, 1992.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, n. 1, p. 379-407, 1988.

WEIR, B. S.; JOHNSTON P R; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115-180, 2012. <https://doi.org/10.3114/sim0011>

ZIMMERMANN, M. J. de O.; TEIXEIRA, M. G. Origem e evolução. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, p. 57-70, 1996.

CAPÍTULO 1: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE EM *Phaseolus lunatus*
POR ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

RESUMO

Várias espécies de *Fusarium* são capazes de provocar doenças que causam sérios danos às culturas agrícolas. No entanto, algumas variantes são potenciais como promotoras de crescimento com efeitos para indução de resistência para doenças dos sistemas radicular e da parte aérea. Tornando variantes hipo-patogênicos de *Fusarium* spp. com potencial agente de biocontrole, principalmente para culturas negligenciadas com benefício do aumento do desenvolvimento da planta. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de isolados de *Fusarium* spp. como indutor de resistência a antracnose do feijão-fava (*Phaseolus lunatus*). Foram realizados a caracterização morfo cultural de 11 isolados de *Fusarium* spp., obtidos de plantas assintomáticas de feijão-fava, seguida da avaliação do antagonismo entre *Fusarium* spp. e *Colletotrichum truncatum* bem como a avaliação das enzimas Peroxidase e Fenilalanina amônia-liase. Não houve antibiose entre os isolados de *Fusarium* spp. a *C. truncatum*, os isolados de *Fusarium* spp. não promoveram acréscimo na produção de feijão-fava, os isolados FF 11.1 e FF 3 conseguiram reduzir a severidade através da indução de resistência observada pelo aumento das enzimas: Peroxidase e Fenilalanina amônia-liase.

Palavras-chave: Enzimas de resistência; Controle de doenças de plantas; Antracnose.

3. INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), também chamada de fava ou feijão-lima, é cultivado em grande parte do território nacional, com maior importância para o nordeste brasileiro devido à sua rusticidade e consequente resistência à seca, ao excesso de umidade e ao calor (VIEIRA, 1992). Com alto teor de minerais, disponibilidade de ferro e proteínas, o feijão-fava possui componentes essenciais para o equilíbrio orgânico do ser humano, fazendo parte de praticamente todos os tecidos do corpo, além de exercer funções de importância nos processos metabólicos (JUNQUEIRA et al., 2010). Os principais estados onde a cultura é explorada são: Alagoas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Rio Grande do Sul (IBGE, 2020), embora pouco explorada devido à tradição de consumo do feijão comum (LYMMAN, 1983).

Doenças geram diversas perdas para a agricultura, sendo a antracnose um dos principais fatores limitantes da cultura do feijão-fava, devido sua ampla ocorrência (VIEIRA, 1992). As principais medidas adotadas no manejo da cultura são: utilização de sementes livres de patógenos, rotação de cultura e uso de produtos químicos (BRINK & BELAY, 2006). O uso da resistência é pouco estudado na cultura, porém trata-se de um método promissor, que apresenta entre as vantagens mais importantes, o custo relativamente baixo aplicável em larga escala e baixo impacto ambiental (ZAMBOLIM et al. 2014).

Dividida em Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e Resistência Sistêmica Induzida (ISR), a resistência de plantas refere-se a mecanismos de defesa em resposta a presença de um agente patogênico ou parasita, agente benéfico, simbiote ou abiótico (BARROS et al. 2010). As proteínas Peroxidase e Fenilalanina amônia-liase são ativadas e/ou potencializada por indutores de resistência, sendo seu aumento um indicativo do efeito protetor e sua durabilidade em relação ao ataque de plantas por patógenos (ITAKO, 2011). Um exemplo de organismo causador de Resistência Sistêmica Induzida com relatos na literatura são as espécies de *Fusarium* que reduziu os sintomas da murcha vascular do tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 (SILVA & BETTIOL, 2005).

O objetivo desse trabalho foi investigar a eficiência de isolados de *Fusarium* spp. na indução de resistência à antracnose do feijão-fava.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de execução dos experimentos

O presente estudo foi desenvolvido na Clínica de Diagnose Vegetal do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA – UFAL), localizado no município de Rio Largo – AL, durante o período de fevereiro de 2019 a fevereiro de 2022.

4.2. Material vegetal

Foi utilizada a variedade Sura Lúcio obtidas no município de Taquarana (STL) (suscetível a *Colletotrichum truncatum*) de *P. lunatus* obtida de agricultores do estado de Alagoas (SOARES, 2019). A variedade é suscetível aos isolados de *Colletotrichum truncatum* (ICT12 e ICT 16) (SOARES, 2019). As plantas foram mantidas por 100 dias em vasos (2 L) contendo solo, para produção de sementes e, posteriormente usadas nos experimentos.

4.3. Isolados de fungos (*Fusarium spp.* e *Colletotrichum truncatum*)

Os isolados utilizados de *Fusarium spp.* e *Colletotrichum truncatum* foram obtidos da coleção de microrganismos da Clínica Fitossanitária do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias (Murici, isolado ICT 16; e Messias, ICT 12). Os isolados de *Fusarium spp.* foram obtidos em Rio Largo – AL de plantas de *P. lunatus* com sintomas leves de escurecimento no colo da raiz que após isolamento e re-inoculação não desenvolveram sintomas severos da doença nas plantas. Os onze isolados de *Fusarium spp.* utilizando foram denominados de FF 1, FF 2, FF 3, FF 5, FF 6, FF 7.1, FF 8, FF 9, FF 11.1, FF 12.1 e FF 12.2. Os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e cultivados em *Biochemistry Oxygen Demand* (BOD) por 7 a 10 dias a 25°C com fotoperíodo de 12 horas.

Os dois isolados de *C. truncatum* foram obtidos no laboratório de Fitopatologia do CECA - UFAL de diferentes genótipos de *P. lunatus* com sintomas da doença no município de Murici e Messias, Alagoas. Na coleção, os isolados recebem a denominação de ICT12 e ICT16. Os isolados diferenciam na agressividade em variedades crioulas cultivadas em Alagoas (SOARES, 2019). Os isolados foram caracterizados filogeneticamente previamente,

confirmando pertencer a espécie *C. truncatum* (SOARES, comunicação pessoal, 2020). A análise filogenética foi realizada tendo como referência sete regiões gênicas: Actina (ACT); β -tubulina (TUB2); Calmodulina (CAL); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Glutamina sintetase (GS) e Espaço Interno Transcrito (ITS) e Mating-type locus - MAT1-2.

4.4. Caracterização morfo cultural dos isolados de *Fusarium* spp.

Para a caracterização morfo cultural, os isolados de *Fusarium* foram cultivados por sete dias em BDA e em seguida discos de 5 mm das margens das colônias foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA sintético incubados em BOD por 7 dias a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi estimado através de medições diárias, em duas direções diametralmente opostas, durante sete dias, com o auxílio de um paquímetro digital e aos sete dias foi observado a coloração e o aspecto das colônias. Os resultados foram submetidos ao cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), de acordo com a fórmula:

$$IVCM = \frac{D - D_a}{N}$$

IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial;
D=diâmetro médio atual da colônia;
D_a=diâmetro médio da colônia do dia anterior;
N=número de dias após a inoculação na placa de Petri.

O delineamento estatístico, foi inteiramente casualizado com 11 tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. As médias do IVCM foram comparadas, com o auxílio do programa Sisvar pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para caracterização morfológica dos isolados foram avaliados taxa de crescimento, pigmentação da colônia, tipo de fíalides, o tamanho e formato de conídios (comprimento e largura), bem como a presença de macro e microconídios e presença ou ausência de clamidósporos (LESLIE & SUMMERREL, 2006). Posteriormente, foram mensurados 50 macro e 50 microconídios para cada isolado, com auxílio do programa BELView. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa Sisvar pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com onze tratamentos e 50 repetições.

4.5. Antagonismo entre *Fusarium* spp. e *Colletotrichum truncatum*

Os experimentos de antagonismo de isolados de *Fusarium* spp. foram realizados separadamente para cada isolado de *C. truncatum* (ICT12 e ICT16). Utilizou discos de 5mm dos isolados de *Fusarium* spp. e *C. truncatum* crescidos em meio BDA por sete dias. Os discos foram depositados nas extremidades de cada placa de Petri contendo 20 mL de meio BDA sintético. Para testemunha utilizou apenas placas apenas com os isolados de *C. truncatum* (ICT 12 e ICT 16) foram utilizadas como testemunha (ISAIAS et al. 2014). Totalizando onze tratamentos, mais testemunha e 3 repetições para cada experimento. As medições do IVCm foram realizadas durante sete dias, em duas direções perpendiculares, após as testemunhas atingirem o centro da placa. A comparação de médias foi realizada com o auxílio do programa Sisvar pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Ao final dos sete dias, foi feita a avaliação da coloração e da presença ou ausência da zona de inibição entre os dois microrganismos.

4.6. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. em *P. lunatus*

Para a realização da patogenicidade foi utilizado sementes de *P. lunatus* variedade Sura Lúcio obtidas no município de Taquarana (STL), Alagoas. Três sementes foram semeadas em copos descartáveis (250mL) contendo solo previamente esterilizado por 2 horas em autoclave a 120 °C. Quando as plântulas possuíam folhas verdadeiras foi realizado o desbaste, mantendo no copo apenas a muda mais vigorosa.

As plantas foram inoculadas com suspensão de 10^6 conídios mL^{-1} , ajustado com o auxílio da câmara de Neubauer, no décimo dia após a semeadura. O inóculo foi obtido do crescimento dos isolados em meio de cultura BDA por sete dias. Foi utilizada 1 placa para cada um dos onze isolados. Após obtenção das colônias, foi acrescido 20 ml de Água Destilada Esterilizada (ADE) em cada placa e, com o auxílio de uma escova com cerdas macias, foi feita a raspagem da colônia fúngica (DÍAZ et al., 2005). Posteriormente, utilizando gaze cirúrgica esterilizada, foi feita a filtragem desse material, restando apenas suspenso em ADE os conídios para inoculação. A suspensão foi ajustada para uma concentração de 10^6 conídios mL^{-1} , em câmara de Neubauer. A inoculação com os isolados de *Fusarium* spp. foi realizada em mudas de *P. lunatus* suscetível, utilizando o método de imersão do sistema radicular em suspensão de esporos concentrada (PASTOR-CORRALES & ABAWI, 1987). As plantas tiveram seus sistemas radiculares feridos e inseridos em um béquer contendo 100 ml de suspensão

concentrada de cada isolado por 20 minutos. Para a testemunha foi utilizada somente ADE (DÍAZ et al., 2005). As plantas foram ficaram em casa de vegetação (temperatura e umidade médias: 27°C e 85%, respectivamente) e transplantadas para vasos maiores (2 L) contendo solo autoclavado. A presença de sintomas foi verificada aos 45 dias após o plantio. A severidade foi avaliada usando a escala proposta por Tokeshi & Galli (1966) (Tabela 1).

Tabela 1. Escala de notas para sintomas de *Fusarium porpora* por Tokeshi & Galli (1966)

Nota	Sintoma
1	Planta sadia, sem sintomas externos ou internos
2	Plantas com escurecimento castanho na região interna dos primeiros vasos recebe
3	Plantas com escurecimento castanho até a altura da primeira folha
4	Plantas demonstrando escurecimento nos vasos até a metade do comprimento dos caules, com amarelecimento das duas ou mais folhas
5	As plantas demonstrando escurecimento em grande parte da aérea exceto nas folhas novas
6	Morte das plantas ou plantas mostrando escurecimento que vai das folhas velhas até as folhas novas

Foi realizado o reisolamento do isolados de *Fusarium* spp., a matéria seca da parte aérea e raiz, número de folhas e tamanho das plantas foram avaliados. Para a determinação da matéria seca, as amostras foram colocadas em estufa de circulação forçada a 60° C, por 24 horas, o experimento foi realizado com onze tratamentos, mais testemunha e três repetições, a comparação de médias foi realizada com o auxílio do programa Sisvar pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.7. Avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados de *Fusarium* spp.

Três sementes foram semeadas em copos descartáveis (250 mL) contendo solo previamente esterilizado por 2 horas em autoclave a 120°C. Quando as plântulas possuíam folhas verdadeiras foi realizado o desbaste, mantendo no copo apenas a muda mais vigorosa, as plantas foram retiradas do solo e inoculadas através da imersão do sistema radicular ferido em uma suspensão de conídios (10^6 conídios mL⁻¹) dos onze isolados de *Fusarium* spp. no décimo

dia após a semeadura, posteriormente foi colocada em vasos de 2 L com solo esterilizado e matidas por 45 dias.

Na avaliação *in vitro*, as folhas foram destacadas, inoculadas e mantidas em BOD, com temperatura ajustada para 28°C e fotoperíodo de 12 horas. As folhas trifolioladas completamente expandidas foram destacadas e inoculada uma suspensão de 10^5 conídios mL⁻¹ do isolado ICT 12 e ICT 16. A suspensão de esporos foi pulverizada em ambas as faces da folha. As folhas tratadas foram mantidas em placa de Petri, com papel filtro e algodão umedecidos com água destilada esterilizada para manter a umidade (CARVALHO, 2009).

Na avaliação seguinte as plantas mantidas na casa de vegetação foram inoculadas com os isolados de *C. truncatum*. A suspensão de conídios foi pulverizada em uma folha trifoliolada, completamente expandidas, de cada planta. As folhas foram cobertas com sacos plásticos (20 x 14 cm) por 48 h simulando ambiente de câmara úmida, para favorecer a colonização dos fungos. No segundo dia após a inoculação os sacos plásticos foram retirados. As plantas foram observadas diariamente para verificação do aparecimento dos primeiros sintomas (CARVALHO, 2009).

A reposta das plantas a inoculação do *C. truncatum* foi avaliada no sétimo e decimo dias após a inoculação (DAI). A quantificação da doença foi determinada por uma escala de notas, que varia de 0 a 5 de acordo com a porcentagem da área foliar (CARVALHO, 2009), sendo 0 – ausência de sintomas, 1 – até 10% da área afetada, 2 – 11 a 25%, 3 – 26 a 50%, 4 – 51 a 75% e 5 – 76 a 100% da área afetada. A comparação das médias das notas foi realizada com o auxílio do programa Sisvar pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Com base na média das notas atribuídas as plantas foram classificadas em imune (I), nota 0, altamente resistente (AR), nota 0,1 a 1,4, moderadamente resistente (MR), nota 1,5 a 2,4, moderadamente suscetível (MS), nota 2,5 a 3,0, e altamente suscetível (AS), notas acima de 3,0 (BELMINO, 2004).

A partir dos resultados dessa etapa, foi selecionado o isolado de *Colletotrichum truncatum* com maior controle dos sintomas e foram selecionados os isolados de *Fusarium* spp. mais contrastantes, ou seja, os com maior e menor inibição dos sintomas causados por *C. truncatum*.

4.8. Ensaio de indução de resistência com quatro isolados de *Fusarium* spp. selecionados.

O experimento iniciou com a desinfestação de sementes da variedade suscetível de *P. lunatus* em etanol 70% por 3 min, hipoclorito de sódio 5%, 10 min, e lavagens sucessivas com

água destilada autoclavada, 10 vezes (ZILLI et al. 2011), seguida do plantio em copos descartáveis contendo solo esterilizado. Após 10 dias da germinação as plantas foram inoculadas separadamente pelos isolados de *Fusarium* spp. (FF 3, FF 11.1, FF 12.1, FF 12.2) pelo método de imersão do sistema radicular ferido. Plantas sem inoculação foram mantidas como testemunha. Todas as plantas foram transplantadas para vasos e mantidas em casa de vegetação (Temperatura e umidade médias: 29°C e 77%, respectivamente). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado contando com quatro tratamentos sendo planta inoculadas com isolados de *Fusarium* spp. (FF 3, FF 11.1, FF 12.1, FF 12.2) e a testemunha e seis repetições.

Aos 45 dias após a germinação, as plantas foram inoculadas com a suspensão de ICT 12 e iniciou a avaliação de resistência pela resposta das plantas a inoculação ao patógeno e avaliação da alteração da atividade de enzimas associadas a reposta de defesas. As folhas destinadas a avaliação enzimática foram coletadas em três momentos: um dia antes da inoculação, sete e dez dias após a inoculação com *C. truncatum*, foram coletadas 6 folhas por planta (duas a cada avaliação, onde era destinada a análise da Peroxidase e Fenilalanina amônia-liase). As folhas coletadas foram congeladas com nitrogênio líquido e conduzidas ao local armazenamento. As folhas foram armazenadas a -80°C até o momento da realização dos ensaios para determinação da atividade enzimática (BOAVA et al, 2010; BOAVA et al, 2010). A reposta das plantas a inoculação do *C. truncatum* foi avaliada no sétimo e décimo dia após a inoculação (DAI) (RODRIGUES, BEZERRA NETO & COELHO, 2006). A quantificação da doença foi determinada por uma escala de notas, que varia de 0 a 5 de acordo com a porcentagem da área foliar (CARVALHO, 2009).

4.9. Atividade enzimática

4.9.1. Peroxidase

As amostras foram armazenadas conforme descrita no item 4.8 e foram submetidas a análise enzimática de Peroxidase, de acordo com o protocolo de Boava et al, 2010; Boava et al, 2010. As amostras de folhas foram coletadas em três momentos: antes da inoculação com *Colletotrichum truncatum*, com sete e 10 dias após a inoculação (DAI), as folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer vertical (-80°C) para posterior análise. O extrato enzimático para análise da Peroxidase foi preparado com 0,5 g de folha, 1 ml do tampão acetato de sódio, pH 5,0 (0,25 ml de ácido acético puro, 1,296 g de

acetato de sódio anidro, completar volume para 1000 ml), 2,56 g de Polivinilpirrolidona (PVP), macerado com auxílio de nitrogênio líquido, cadinho e pistilo até a obtenção de massa homogênea, posteriormente foi centrifugada a 15.000 x por 25 min a 4°C, o sobrenadante foi armazenado em freezer até a análise em espectrofotômetro. A atividade enzimática foi analisada através do espectrofotômetro Biochrom WPA Lightwave II, observando-se a variação na absorbância em comprimento de onda de 470 nm, para o branco foi usado 3 mL da solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), para a amostra 0,10 mL do extrato protéico e 2,9 mL de solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A atividade da Peroxidase foi quantificada a cada 15 s por 3 minutos, expressa como atividade específica (unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹). Os valores calculados de atividade enzimática foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

4.9.2. Fenilalanina amônia-liase

As amostras foram armazenadas conforme descrita no item 4.8 foram submetidas a análise enzimática de Fenilalanina amônia-liase, de acordo com o protocolo de Rodrigues, Neto & Coelho (2006). As amostras de folhas foram coletadas antes da inoculação com *Colletotrichum truncatum*, com sete e 10 dias após a inoculação (DAI), as folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer vertical (-80°C) para posterior análise. O extrato enzimático para Fenilalanina amônia-liase foi preparado com 1 g de folha e 6 ml, a 4°C, de tampão de extração (22,2 g de tris, 0,37 g de EDTA, 85,5 g de sacarose, 10 g de PVP, completando para 1000 ml e ajustando o pH para 8,0 com ácido clorídrico), macerada com nitrogênio líquido e auxílio de cadinho e pistilo até a obtenção de massa homogênea. Posteriormente foi centrifugada a 6.000 x por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi diluído, com 200 µl para 5 ml do tampão de extração, a mistura foi encubada em banho-maria a 40°C por uma hora, interrompendo a reação com banho de gelo e realizando as leituras, em cubeta de quartzo. A determinação da atividade enzimática foi constatada a partir da diferença de absorbância na conversão de fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO et al., 1978), por meio de variação na absorbância em comprimento de onda de 290 nm, com o auxílio do espectrofotômetro Biochrom WPA Lightwave II, a amostra foi preparada com 1,5 ml de extrato enzimático, 1,0 ml do tampão de extração e 0,5 ml de fenilalanina amônia-liase (49,6 mg/mL) ou água destilada na amostra “branco”, expressa em U.A./min./mg de proteína.

Os valores calculados de atividade enzimática e foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

4.10. Caracterização genética do *Fusarium* spp.

A caracterização filogenética foi realizada com quatro isolados contrastantes no ensaio de indução de resistência, avaliação de redução de sintomas, e foram utilizados no ensaio de indução de resistência com análise das enzimas associadas a resposta de defesa. A extração do DNA foi realizada utilizando três discos do crescimento micelial e colocados em Erlenmeyer de 20 mL contendo meio BD (Batata-dextrose) por cinco dias, após esse período a massa de micélio formada foi lavada com água destilada esterilizada (VELOSO & DÍAZ, 2012), embalado com envelopes de papel alumínio e mantido em congelador até o momento da extração. O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações: a massa de micélio congelada foi macerada com 750 µl de CTAB e 5 µl de Beta mercapto etanol em cadinho previamente resfriado, o macerado foi transferido para microtubos e colocado em banho-maria a 65 °C por 1 hora. Posteriormente, foi acrescido de 500 µl de CIA e agitado a mão, centrifugado por 10 minutos a 9.000 rpm, o sobrenadante foi recuperado em um novo tubo e adicionado isopropanol 500 µl, deixado em freezer por 24 horas, centrifugado por 10 minutos a 15.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 100 µl de álcool 70% por 10 minutos em temperatura ambiente, posteriormente foi centrifugado por cinco minutos a 15.000 rpm, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, permanecendo apenas o pellet. Após secagem por 1 hora foi adicionado 50 µl de TE e colocado em banho-maria a 37 °C por 20 minutos. Após o término da extração de DNA foi verificado com eletroforese em gel de agarose a 1,0% por 60 min a 60 V. O DNA foi corado com Sybr Safe® (Invitrogen, Eugene, Oregon, Estados Unidos) e visualizado com e revelação sob luz ultravioleta em transiluminador L.PIX (Loccus biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). O registro foi armazenado na forma de fotografia digital.

Análise da sequência genômica da região ITS (espaço interno transcrito) e RPB2 (subunidade II da RNA polimerase) foi amplificado pela reação em cadeia da enzima DNA polimerase, realizada com o uso do termociclador (2720 Thermal Cycler) e oligonucleotídeos iniciadores ITS (ITS5F, 5' - GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3'; ITS4R, 5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') em condições específicas de amplificação (temperatura de desnaturação de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de: 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, e 72°C

por 1:30 s, e extensão final a 72°C por 10 min) para obtenção de fragmentos com tamanho de 500 pb, estimado com o auxílio do ladder 1kb (Ludwing Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil) e oligonucleotídeos iniciadores RPB2 (5F2, 5' - GGGG WGAYCAGAAGAAGGC 3'; 7cR 5' - CCCATRGCTTGYTTRCCCAT 3') em condições específicas de amplificação (temperatura de desnaturação de 94°C por 1:30 min, seguida de 40 ciclos de: 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, e 68°C por 2:00 s, e extensão final a 68°C por 5 min). A presença do fragmento de DNA amplificado foi observada após eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Syber Safe® em cuba de eletroforese durante 120 min a 90 V. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador L.PIX (Locus Biotecnologia, Cotia São Paulo, Brasil) e os dados foram registrados em formato fotográfico. O sequenciamento foi realizado pelo laboratório ACTgene. Após o recebimento das sequencias foi feita a conferência com o banco de dados GenBank.

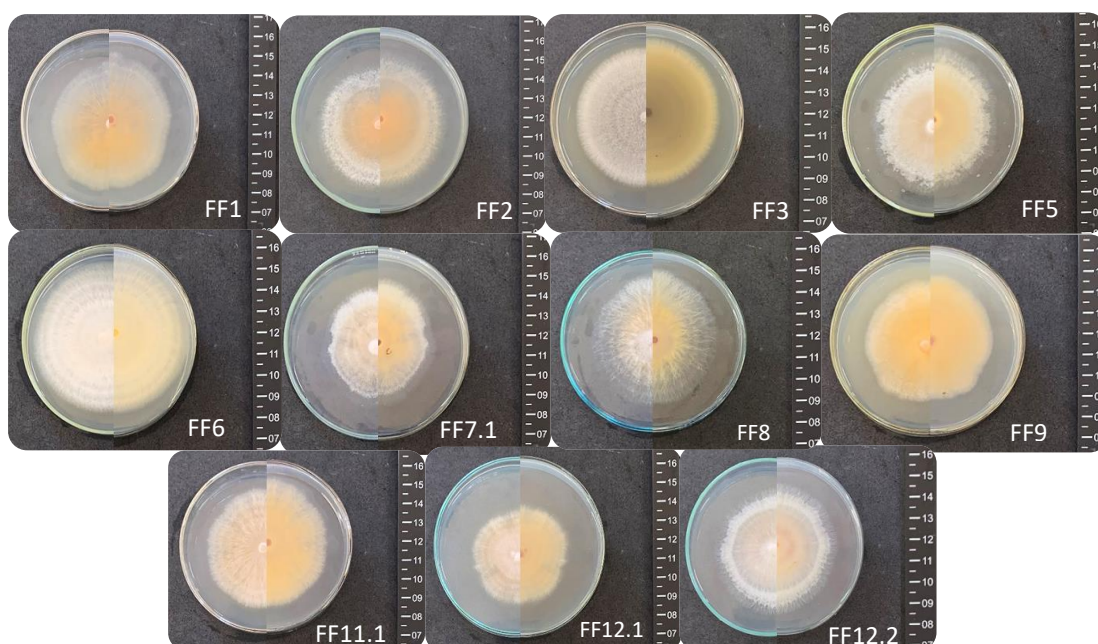
As sequências dos isolados e as sequências das estirpes tipos mais similares foram alinhadas utilizando o ClustalW do MEGA e as árvores filogenéticas inferidas pelo método de Inferência Bayseana com uso do site Cipres.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização morfo cultural dos isolados de *Fusarium* spp.

No tocante ao aspecto cultural, a maioria dos isolados foram classificados como laranja com bordas brancas (FF1, FF2, FF5, FF6, FF7.1, FF8 e FF12.2), cor laranja (FF9, FF11.1, FF12.1), cor amarela (FF3), Figura 1, a maioria dos isolados foram classificados como pouco cotonoso (FF1, FF2, FF5, FF6, FF8, FF11.1 e FF12.1). Os onze isolados apresentaram raio micelial radiado.

Figura 1. Isolados de *Fusarium*, em meio sintético com 7 dias de crescimento.



As características morfológicas avaliadas dos isolados de *Fusarium* spp, como: tamanho e formato de conídios e velocidade de crescimento micelial, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Morfometria dos macros e microconídios e índice de velocidade de crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. em meio BDA.

Isolado	IVCM (cm/dia)	Mensuração de Macroconídios (μm)		Mensuração de Microconídio (μm)	
		C	L	C	L
FF1	0,96 b	9,10 b	1,54 a	4,60 f	1,56 c
FF2	1,01 c	7,99 a	1,54 a	3,32 b	1,40 b
FF3	0,99 c	13,28 c	2,60 e	5,97 g	2,67 e
FF5	1,07 c	7,30 a	1,75 b	4,15 e	1,65 d
FF6	0,96 b	7,19 a	1,58 a	3,53 b	1,51 c
FF7.1	1,07 c	7,26 a	1,61 a	3,42 b	1,56 c
FF8	1,10 c	17,21 e	2,06 d	3,31 b	1,69 d
FF9	0,86 a	13,42 c	1,92 c	3,92 d	1,50 c
FF11.1	1,01 c	17,65 e	2,02 d	3,69 c	1,59 c
FF12.1	0,89 a	15,33 d	2,03 d	3,04 a	1,25 a
FF12.2	1,05 c	8,70 b	1,55 a	4,53 f	1,45 b
C.V. (%)	6,69	18,76	12,17	14,03	13,42

Médias de cinco repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

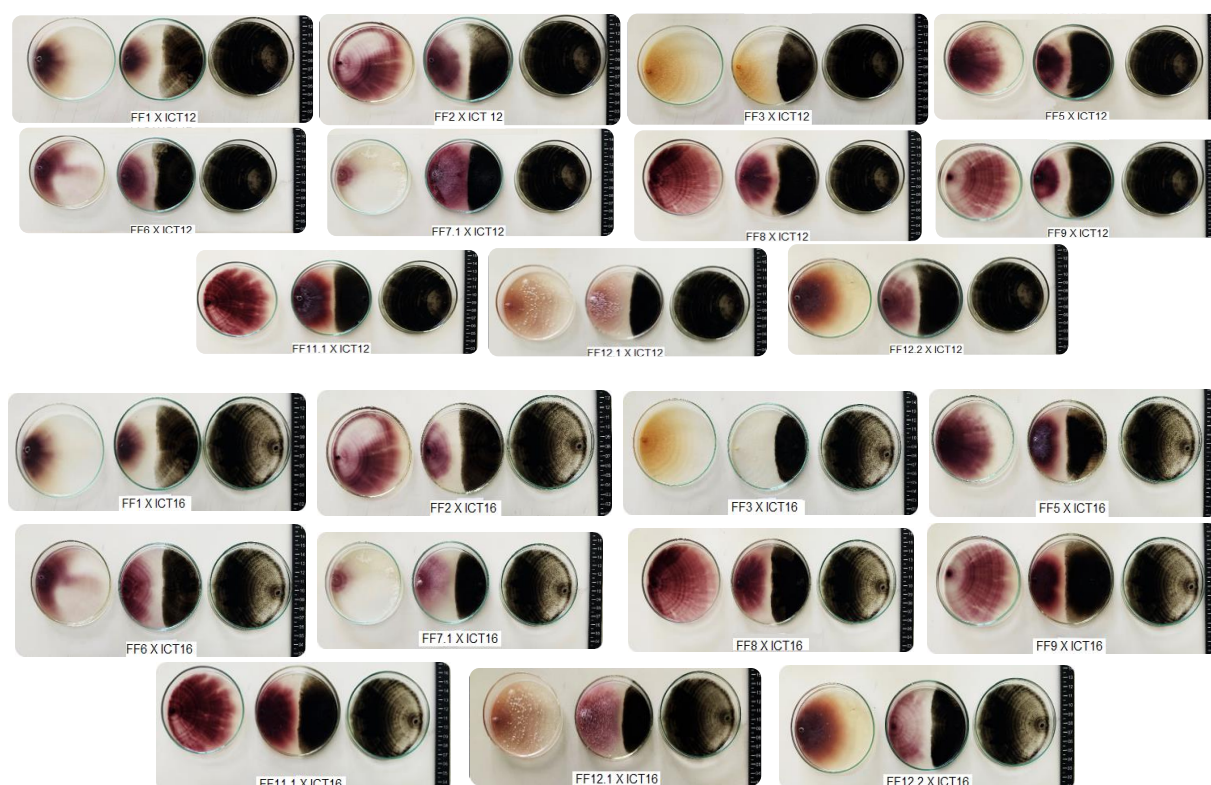
A maioria dos isolados apresentaram taxa de crescimento acima de 1 cm dia⁻¹ diferenciando os isolados em 3 classes. As colônias produziram clamidósporo, macroconídios e microconídios. Os clamidósporos eram globosos. Os macroconídios possuíam um formato ligeiramente curvado tendo de três a cinco septos e eram produzidos em monofialides simples e curtas. Os microconídios foram classificados como elípticos e cilíndricos, com 0 a 2 septos. As dimensões comprimento e largura dos macro e microconídios apresentaram maior diversidade. As diferenças entre as dimensões formaram mais de cinco grupos (Tabela 2).

5.2. Antagonismo entre *Fusarium* spp. e *Colletotrichum truncatum*

O confronto dos isolados de *Fusarium* spp. com os isolados ICT 12 e ICT 16 de *C. truncatum* indicou ausência de antagonismo. O crescimento diário de *C. truncatum* sem a presença de *Fusarium* spp., foi de 0,79 cm dia⁻¹ e crescimento em co-cultivo variaram de 0,67 a 0,81 cm dia⁻¹. Nos confrontos, foi observada alteração na coloração do micélio dos isolados de *Fusarium*

spp. (Figura 2). Os isolados FF7.1 e FF12.2 mudaram a coloração quando confrontados com ICT 12, passando de roxo central com branco predominante para completamente roxo e roxo escuro para roxo claro, respectivamente e os isolados FF3, FF7.1, FF12.1 e FF12.2 quando confrontados com ICT 16, passando de amarelo para branco, branco para roxo e laranja para roxo, respectivamente.

Figura 2. Coloração do micélio dos isolados de *Fusarium* spp. em cultivo isolado e em confronto com os isolados de *C. truncatum*



5.3. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. em *P. lunatus*.

As plantas de feijão-fava inoculadas com 11 isolados *Fusarium* spp. apresentaram desenvolvimento com aspecto sadio, apenas com escurecimento vascular e sem registro de plantas mortas. No entanto, algumas mudanças em determinadas características botânicas das plantas, tais como altura, sistema radicular e número de folhas, foram observadas frente a alguns isolados: (Tabela 3). As plantas inoculadas com os isolados FF 2, FF 5 e FF 12.1 apresentaram altura maior, crescimento do sistema radicular em relação as plantas não inoculadas. As plantas inoculadas com os isolados FF 11.1, FF 8, FF 6 e FF 7.1 apresentaram menor peso seco para biomassa de raízes. As plantas inoculadas com os isolados FF 12.1, FF 11.1, FF 8, FF 6 e FF

7.1 apresentaram menor número de folhas. As plantas inoculadas com os demais isolados apresentaram altura similar as plantas sem inoculação.

Tabela 3. Valores médios de escala de notas, altura de planta, número de folhas, matéria seca da parte aérea e raiz de *Phaseolus lunatus* inoculados com isolados de *Fusarium* spp.

Tratamentos	Nota	Altura (cm)	Nº de folhas	Peso seco parte aérea (g)	Peso seco raiz (g)
FF 1	3,0 b	33,0 c	12,7 b	4,7 a	4,3 b
FF 2	3,3 b	39,0 e	12,7 b	6,2 a	4,4 b
FF 3	4,0 b	32,0 c	10,0 b	4,4 a	3,4 b
FF 5	3,7 b	35,0 d	10,3 b	4,6 a	4,5b
FF 6	2,7 b	31,1 c	9,0 a	3,8 a	1,9 a
FF 7.1	3,7 b	26,0 a	5,7 a	2,3 a	1,1 a
FF 8	4,0 b	29,8 b	8,0 a	2,1 a	1,4 a
FF 9	3,3 b	32,0 c	14,7 b	5,6 a	3,8 b
FF 11.1	2,7 b	29,0 b	6,7a	2,5 a	1,7 a
FF 12.1	3,3 b	35,5 d	5,7 a	3,4 a	3,3 b
FF 12.2	3,3 b	29,5 b	14,0 b	6,1 a	4,1 b
TESTEMUNHA	1,0 a	32,3 c	11,7 b	6,4 a	3,4 b
C.V. (%)	24,43	5,31	27,9	42,3	41,9

Médias de três repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

As notas médias das plantas ficaram entre o intervalo de três e sete (Tabela 3). As plantas inoculadas com os isolados FF11.1 e FF7.1 tiveram a menores notas. Os isolados FF3 e FF8 causaram nas plantas os sintomas internos com maior intensidade, nota quatro. No entanto, apesar da variação no crescimento, números de folhas e biomassa das raízes, as plantas apresentaram a mesma produção de biomassa seca da parte aérea, mostrando ausência de sintomas severos da doença. O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 4)

Tabela 4. Repetição do experimento. Valores médios de escala de notas, altura de planta, número de folhas, matéria seca da parte aérea e raiz de *Phaseolus lunatus* inoculados com isolados de *Fusarium* spp.

Tratamentos	Nota	Altura (cm)	Nº de folhas	Peso seco parte aérea (g)	Peso seco raiz (g)
FF 1	3,3 b	18,93 a	5,33 b	3,40 c	2,02 b
FF 2	5,3 c	17,1 a	3,00 a	2,24 a	1,30 a
FF 3	2,0 b	20,9 a	6,33 b	2,84 b	1,57 a
FF 5	1,0 a	23,97 a	5,00 b	3,35 c	2,71 c
FF 6	4,7 c	18,37 a	5,67 b	2,60 a	1,47 a
FF 7.1	4,3 c	21,33 a	4,00 a	2,91 b	1,44 a
FF 8	5,0 c	16,27 a	3,00 a	2,28 a	1,49 a
FF 9	5,0 c	18,13 a	4,33 a	2,33a	1,45 a
FF 11.1	2,7 b	18,77 a	5,33 b	3,46 c	1,84 a
FF 12.1	6,0 c	13,67 a	2,67 a	2,16 a	1,35 a
FF 12.2	5,0 c	15,23 a	3,67 a	2,30 a	1,42 a
TESTEMUNHA	1,0 a	21,37 a	3,67 a	2,13 a	1,67 a
CV (%)	25,34	17,64	34,55	34,24	39,60

Médias de três repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

5.4. Avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados de *Fusarium* spp.

Na avaliação de patogenicidade feita com ICT 12 (Tabela 5) em folhas destacadas, não houve diferença significativa para a primeira avaliação, com sete dias. O isolado com melhor desempenho na redução da severidade da doença foi FF 11.1. A folhas inoculadas apresentaram redução de sintomas sendo a reação classificada como moderadamente resistentes. A reação das folhas ao patógeno tratadas com os isolados FF 1, FF 3, FF 6, FF 8 e FF 12.2, foram classificados como moderadamente suscetível. Na segunda avaliação os isolados FF 3, FF 5, FF 6, FF 8 e FF 9, reduziram a severidade da doença e tiveram o melhor desempenho, porém os isolados FF 1, FF 2, FF 11.1 e FF 12.2 também foram estatisticamente divergentes da testemunha. Folhas tratadas com FF 6 classificadas como moderadamente suscetíveis.

Em relação a inoculação das folhas mantidas nas plantas tratadas, na primeira avaliação todos os isolados diferiram da testemunha e não diferiram entre si, os isolados FF 3,

FF 5, FF 6, FF 7.1, FF 9 e FF 11.1 tiveram a reação contra o patógeno classificada como moderadamente resistente. Na segunda avaliação, os efeitos foram reduzidos em todos os casos, exceto nas plantas inoculadas com FF 1 que foi o único tratamento equivalente a testemunha. FF 3, FF 7.1, FF 9 e FF 11.1 foram classificados como moderadamente suscetível.

Na avaliação de ICT 16 (Tabela 5) em folhas destacadas apenas FF 9 e FF 12.2 não diferiram da testemunha na primeira avaliação, sendo a amostra tratada com FF 12.1 moderadamente resistente. Na segunda avaliação apenas os isolados FF 5, FF 6, FF 7.1, FF 8 e FF 9 diferiram da testemunha, todos classificados como altamente suscetíveis. Para a primeira avaliação na planta todos as parcelas tratadas com FF 1, FF 3, FF 5, FF 6, FF 9 e FF 11.1 divergiram da testemunha, sendo FF 9, classificada como altamente resistente e FF 1, FF 3, FF 5 e FF 6 classificadas como moderadamente resistente, FF 2 e FF 8 moderadamente suscetível. Para segunda avaliação os isolados FF 2, FF 12.1 e FF 12.2 foram equivalentes a testemunha, divergindo dos demais, sendo FF 1, FF 3, FF 5, FF 6, FF 7.1, FF 9 e FF 11.1 classificados como moderadamente suscetível. O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 6).

Tabela 5. Avaliação de folhas na planta de *Phaseolus lunatus* inoculadas com *Colletotrichum truncatum* (ICT 12 e ICT 16).

Tratamentos	ICT 12				ICT 16			
	Folha		Planta		Folha		Planta	
	1av	2av	1av	2av	1av	2av	1av	2av
FF 1	3,00 a	4,00 b	3,33 a	5,00 b	3,00 a	5,00 b	2,00 a	3,00 a
FF 2	3,33 a	4,00 b	3,33 a	4,00 a	3,00 a	5,00 b	3,00 b	4,00 b
FF 3	3,00 a	3,67 a	2,00 a	3,00 a	3,00 a	4,67 b	2,00 a	3,00 a
FF 5	3,33 a	3,33 a	2,00 a	3,33 a	3,00 a	4,00 a	2,33 a	3,00 a
FF 6	2,33 a	3,00 a	3,00 a	4,00 a	3,33 a	4,00 a	2,00 a	3,00 a
FF 7.1	3,33 a	5,00 c	2,33 a	3,00 a	3,33 a	4,00 a	3,33 b	3,00 a
FF 8	3,00 a	3,33 a	2,67 a	4,00 a	3,00 a	4,00 a	3,00 b	3,67 a
FF 9	3,33 a	3,33 a	2,00 a	3,00 a	4,00 b	4,00 a	1,33 a	3,00 a
FF 11.1	2,33 a	4,00 b	2,33 a	3,00 a	3,00 a	5,00 b	2,33 a	3,00 a
FF 12.1	4,00 a	5,00 c	3,00 a	4,00 a	2,00 a	5,00 b	4,00 b	5,00 b
FF 12.2	3,00 a	4,00 b	3,00 a	3,67 a	4,00 b	5,00 b	4,33 b	4,00 b
TESTEMUNHA	4,00 a	4,67 c	5,00 b	5,00 b	4,00 b	5,00 b	3,33 b	5,00 b
C.V. (%)	14,71	15,23	23,99	23,74	15,20	10,05	26,18	20,14

Médias de três repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.
C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 6. Repetição do experimento. Avaliação de folhas na planta de *Phaseolus lunatus* inoculadas com *Colletotrichum truncatum* (ICT 12 e ICT 16).

Tratamentos	ICT 12				ICT 16			
	Folha		Planta		Folha		Planta	
	1av	2av	1av	2av	1av	2av	1av	2av
FF 1	2,33 b	3,00 a	4,00 a	4,00 a	2,00 a	3,00 a	2,00 a	2,00 a
FF 2	4,00 c	3,00 a	3,00 a	3,33 a	3,00 b	3,33 a	2,33 a	3,00 b
FF 3	2,33 b	3,00 a	2,67 a	3,00 a	3,67 b	3,00 a	2,00 a	2,00 a
FF 5	3,00 c	3,33 a	2,33 a	3,33 a	3,00 b	3,00 a	1,67 a	2,33 a
FF 6	1,67 a	2,33 a	3,00 a	3,33 a	3,00 b	3,33 a	2,00 a	2,00 a
FF 7.1	3,00 c	3,33 a	2,00 a	2,33 a	3,33 b	3,33 a	3,00 b	3,00 b
FF 8	2,67 b	3,00 a	2,00 a	3,33 a	3,33 b	3,00 a	3,00 b	3,00 b
FF 9	4,00 c	3,33 a	2,00 a	2,33 a	3,33 b	3,00 a	1,33 a	2,33 a
FF 11.1	1,00 a	3,00 a	2,00 a	3,00 a	3,00 b	3,00 a	2,00 a	2,33 a
FF 12.1	4,00 c	4,00 a	3,00 a	3,33 a	2,00 a	3,00 a	3,00 b	4,00 b
FF 12.2	2,33 b	3,00 a	2,67 a	3,33 a	3,33 b	4,00 b	4,00 b	4,33 b
TESTEMUNHA	4,00 c	4,00 a	4,00 a	5,00 a	3,67 b	4,00 b	3,33 b	4,00 b
C.V. (%)	23,24	14,71	29,23	23,99	22,06	15,20	24,69	26,18

Médias de três repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.
C.V. = Coeficiente de variação.

Foi selecionado o ICT 12 devido o melhor desempenho na redução dos sintomas causados e selecionados como os melhores resultados na redução de sintomas encontrados nas folhas tratadas com FF 3 e FF 11.1 e os resultados menos promissoras obtidas por FF 12.1 e FF 12.2 estes microrganismos foram selecionados para seguir os experimentos.

5.5. Ensaio de indução de resistência com quatro isolados de *Fusarium* spp. selecionados

Na primeira avaliação da planta (Tabela 7), observou-se indução de resistência para as plantas tratadas com o isolados FF 3, FF 11.1 e FF 12.1 Os tratamentos FF 3, FF 11.1 e FF 12.1

foram classificados como moderadamente resistentes (BELMINO, 2004). As plantas tratadas com isolado FF 12.2 apresentou notas de severidade para a doença similares às do controle. Na segunda avaliação (com dez dias), as plantas tratadas com o isolados FF 11.1, FF 3 e FF 12.2 apresentaram menores notas. As plantas foram classificadas como moderadamente resistente (como FF11.1), moderadamente suscetível (FF 3) e os demais tratamentos, como altamente suscetíveis (BELMINO, 2004). O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 8).

Tabela 7. Avaliação de folhas na planta de *Phaseolus lunatus* inoculadas com *Colletotrichum truncatum* (ICT 12)

Tratamentos	Avaliação	
	7 dias	10 dias
FF 11.1	1,75 a	2,0 a
FF 3	1,5 a	3,0 a
FF 12.2	2,5 b	3,25 a
FF 12.1	2,0 a	3,75 b
Testemunha	3,0 b	4,50 b
C.V. (%)	8,22	9,26

Médias de seis repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 8. Repetição do experimento. Avaliação de folhas na planta de *Phaseolus lunatus* inoculadas com *Colletotrichum truncatum* (ICT 12)

Tratamentos	Avaliação	
	7 dias	10 dias
FF 11.1	1,25 a	2,5 a
FF 3	1,5 a	2,5 a
FF 12.2	1,75 a	3,5 b
FF 12.1	2,5 b	4,5 c
Testemunha	3,5 c	4,50 c
C.V. (%)	9,89	8,42

Médias de seis repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

5.5.1. Atividade enzimática

5.5.1.1. Peroxidase

A atividade da peroxidase foi aumentada nas plantas inoculadas na raiz com todos os isolados de *Fusarium* spp. (Tabela 9). Antes de inocular as plantas com o patógeno, 1 dia antes da inoculação de ICT 12, as plantas inoculadas na raiz com os isolados de *Fusarium* spp. apresentavam atividade da enzima aumentada. Os isolados FF11.1 e FF3 apresentavam maiores valores para atividade com 1,208 e 1,168 unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹. Os isolados FF 12.2 e FF 12.1 induziram a atividade da peroxidase com menor intensidade com valores, 0,649 e 0,568 unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹. Na segunda avaliação, aos sete dias após o desafio com o patógeno observa-se diferenças entre os isolados, quanto a indução de resistência. A presença do patógeno com nas plantas inoculada com o *Fusarium* sp. FF 11.1 expressou uma maior atividade (28,484 unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹), seguida por FF 3 (15,344 unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹). Em dois outro isolados, a presença do patógeno neutralizou a indução de resistência. Aos 10 dias após o desafio com o patógeno, a indução de resistência foi reduzida. A maior expressão da proteína foi em FF 11.1 e FF 3 (7,214 e 4,426 unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, respectivamente). Os demais tratamentos foram estatisticamente equivalentes a testemunha. O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 10).

Tabela 9. Atividade da Peroxidase em folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com *Fusarium* spp. e inoculadas com *Colletotrichum truncatum* nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹

Tratamento	1 dia antes da inoculação	7 dias após a inoculação	10 dias após a inoculação
FF 11.1	1,208 cA	28,484 cB	7,214 bA
FF3	1,168 cA	15,344 bB	4,426 bA
FF 12.2	0,649 bA	6,686 aA	1,753 aA
FF 12.1	0,568 bA	3,423 aA	0,694 aA
Testemunha	0,271 aA	9,369 aA	2,454 aA
C.V. (%)	6,42	18,26	25,98

Médias de seis repetições. Valores seguidos da mesma letra (minúscula), na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Valores seguidos da mesma letra (maiúscula), na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 10. Repetição do experimento. Atividade da Peroxidase em folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com *Fusarium* spp. e inoculadas com *Colletotrichum truncatum* nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹

Tratamento	1 dia antes da inoculação	7 dias após a inoculação	10 dias após a inoculação
FF 11.1	1,124 b	18,152 b	3,066 b
FF 3	0,497 a	9,782 b	1,881 b
FF 12.2	0,115 a	2,182 a	1,043 a
FF 12.1	0,276 a	5,973 a	0,295 a
Testemunha	0,242 a	4,262 a	0,745 a
C.V. (%)	41,60	29,72	81,84

Médias de seis repetições. Valores seguidos da mesma letra (minúscula), na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Valores seguidos da mesma letra (maiúscula), na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

5.5.1.2. Fenilalanina amônia-liase

A atividade da Fenilalanina amônia-liase foi aumentada nas plantas inoculadas na raiz com todos os isolados de *Fusarium* spp. (Tabela 11). Antes de desafiar as plantas com o patógeno, 1 dia antes da inoculação de ICT 12, as plantas inoculadas na raiz com os isolados de *Fusarium* spp. apresentavam atividade da enzima aumentada. Os isolados FF11.1 e FF3 apresentavam maiores valores para atividade com 5,265 e 4,619 unidades de absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹. Os isolados FF 12.2 e FF 12.1 induziram a atividade da peroxidase com menor intensidade com valores, 3,687 e 3,597 unidades de absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

Na segunda avaliação, aos sete dias após o desafio com o patógeno observa-se diferenças entre a indução de resistência promovidas pelos isolados. A presença do patógeno com nas plantas inoculada com o *Fusarium* spp. FF 11.1 e FF 3 expressou uma maior atividade 7,847 e 5,803 unidades de absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹. Em dois outros isolados, a presença do patógeno neutralizou a indução de resistência. Aos 10 dias após o desafio com o patógeno, a indução de resistência foi neutralizada apesar de apresentar um mesmo padrão de valores da avaliação anterior. Os valores de atividade foram similares para todos os tratamentos. O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 12).

Tabela 11. Atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com *Fusarium* spp. e inoculadas com *Colletotrichum truncatum* nos tempos de coleta de um dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹

Tratamento	1 dia antes da inoculação	7 dias após a inoculação	10 dias após a inoculação
FF 11.1	5,265 cA	7,847 bA	10,537 aB
FF 3	4,619 cA	5,803 bA	7,285 aB
FF 12.2	3,687 bA	3,030 aA	6,675 aA
FF 12.1	3,597 bA	2,625 aA	5,422 aA
Testemunha	1,584 aA	2,273 aA	4,956 aB
C.V. (%)	9,28	12,39	22,68

Médias de seis repetições. Valores seguidos da mesma letra (minúscula), na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Valores seguidos da mesma letra (maiúscula), na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 12. Repetição do experimento. Atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com *Fusarium* spp. e inoculadas com *Colletotrichum truncatum* nos tempos de coleta de um dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹

Tratamento	1 dia antes da inoculação	7 dias após a inoculação	10 dias após a inoculação
FF 11.1	2,218 c	4,201 b	4,924 a
FF 3	2,068 c	4,294 b	4,396 a
FF 12.2	1,468 a	2,301 a	3,437 a
FF 12.1	1,832 b	2,161 a	3,683 a
Testemunha	1,367 a	2,289 a	2,935 a
C.V. (%)	10,12	29,61	36,81

Médias de seis repetições. Valores seguidos da mesma letra (minúscula), na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Valores seguidos da mesma letra (maiúscula), na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

Figura 6. Folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com *Fusarium* spp. e inoculadas com *Colletotrichum truncatum*, 45 dias após o plantio.



5.6.Caracterização genética de *Fusarium* spp.

É possível identificar pelas árvores filogenéticas (Figura 3, 4 e 5) que os isolados FF 3, FF 11.1, FF 12.1 e FF 12.2 são *Fusarium* spp.

Figura 3. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais região ITS dos isolados FF 3, FF 11.1, FF 12.1 e FF12.2 e estirpes tipo dos gêneros obtidas no Genbank.

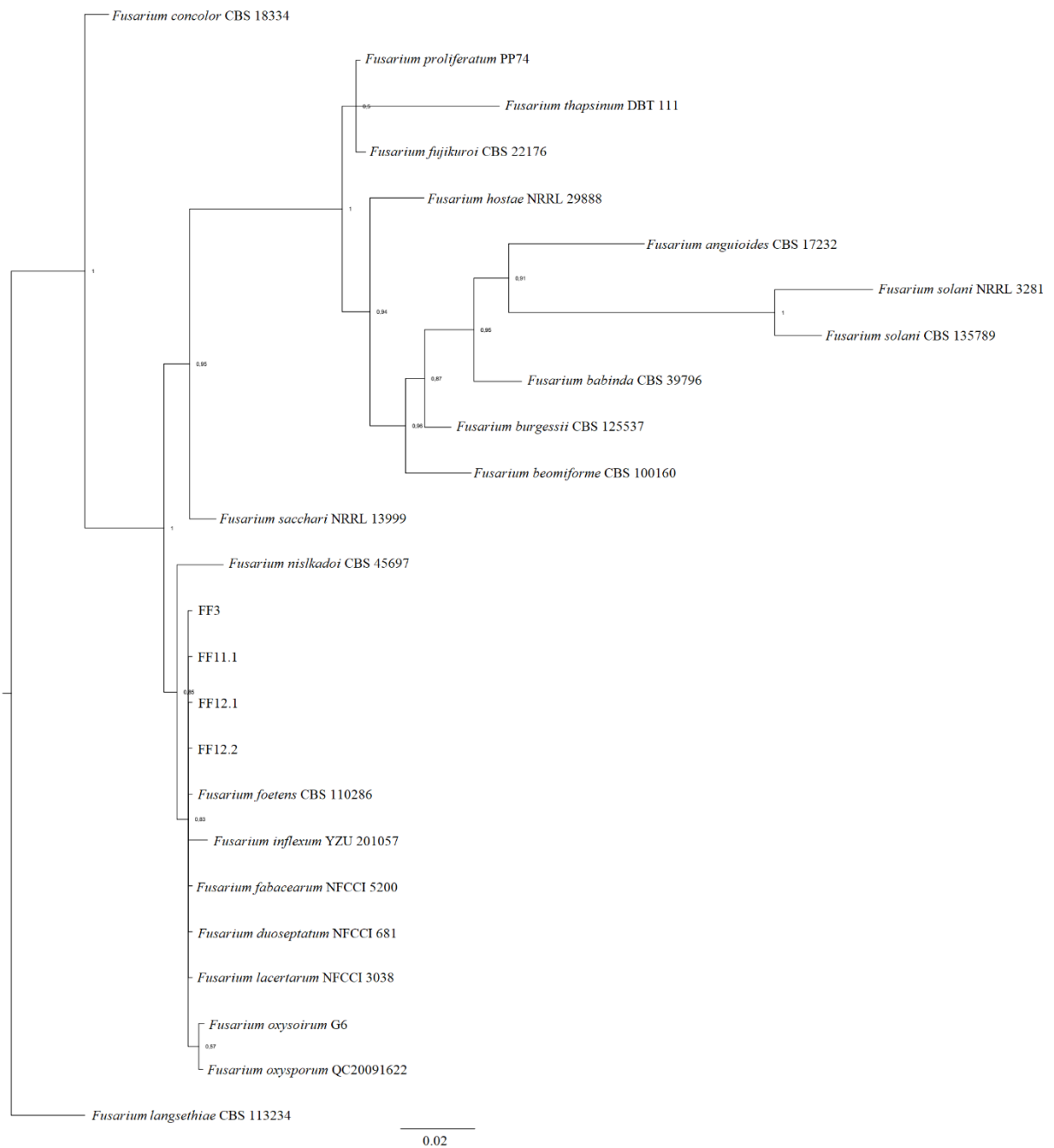


Figura 4. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit) dos isolados FF 11.1, FF 12.1 e FF12.2 e estirpes tipo dos gêneros obtidas no Genbank.

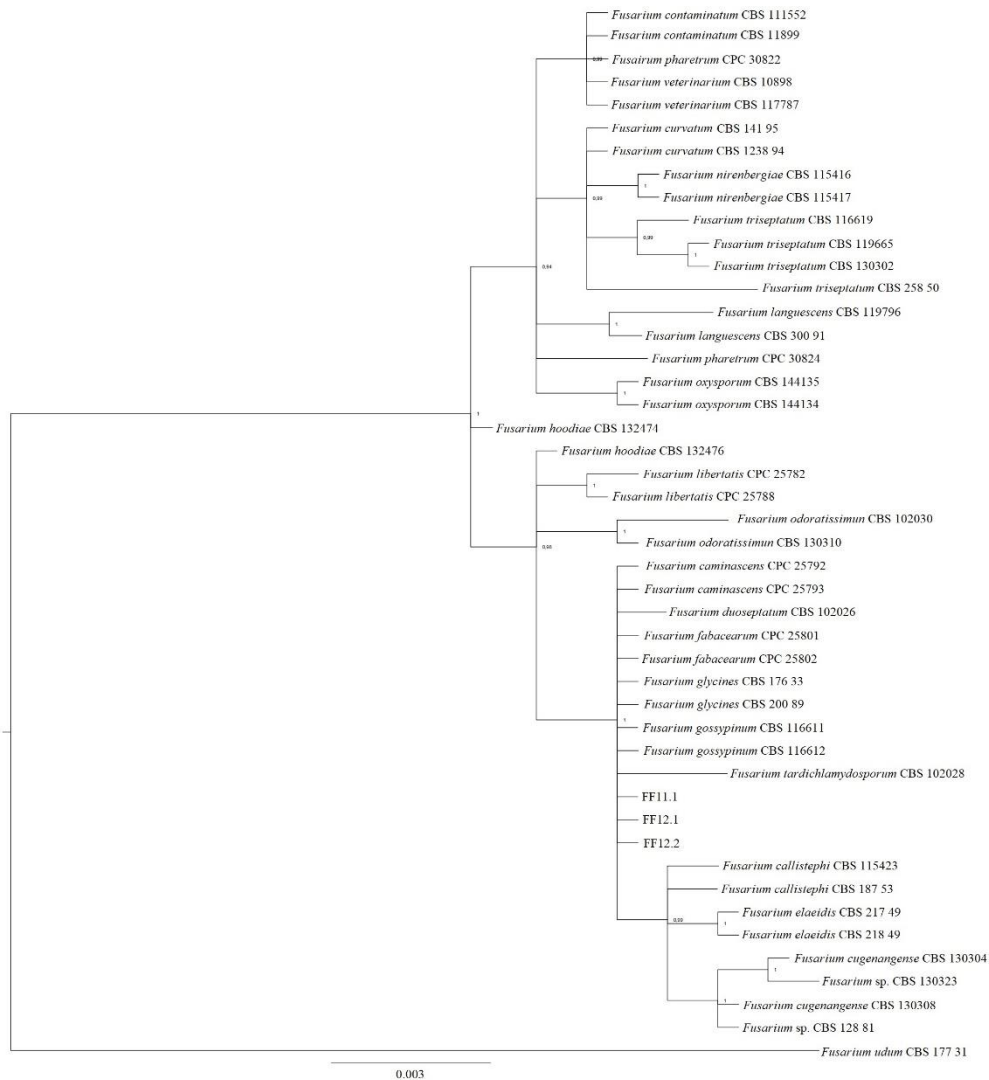
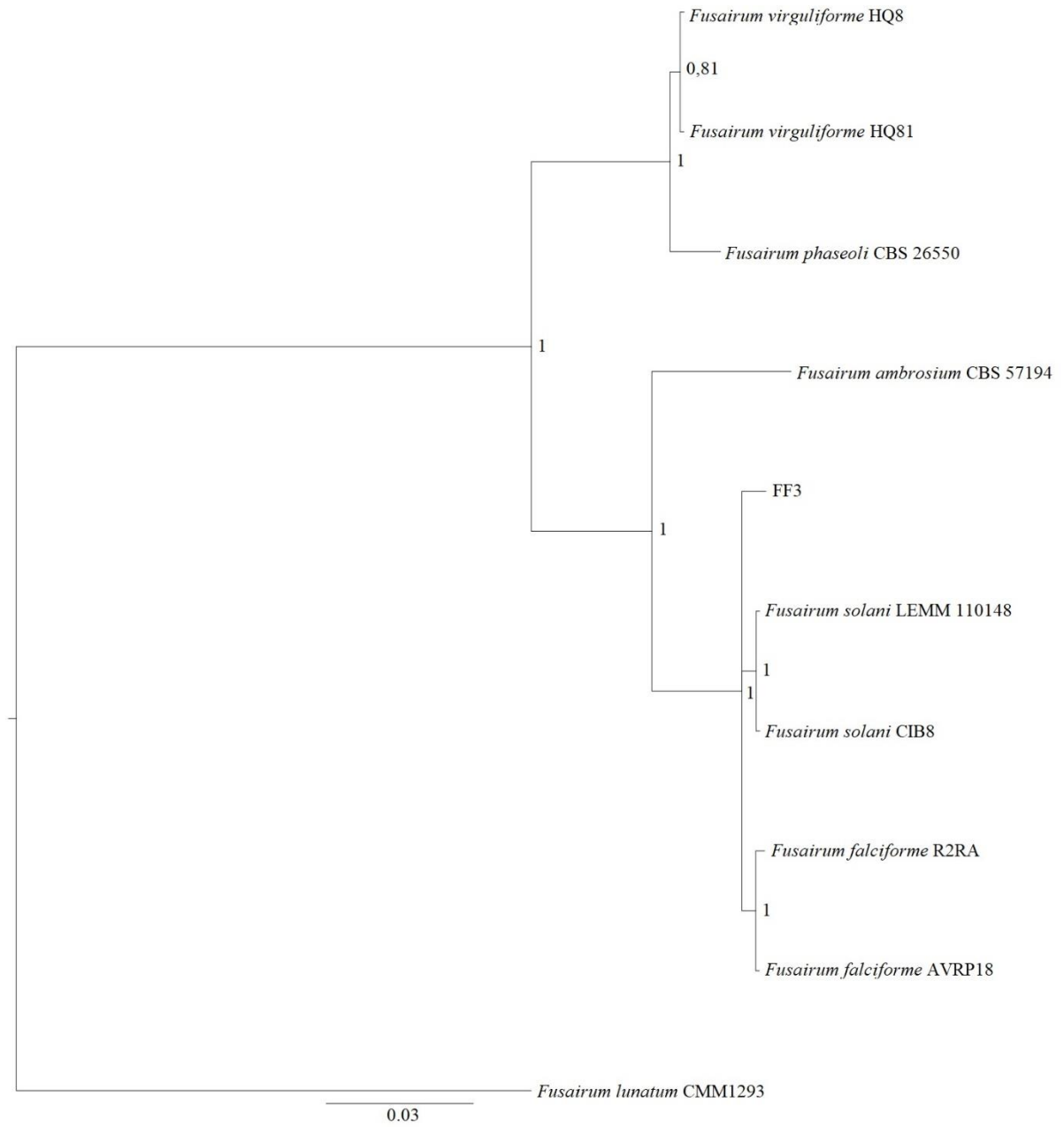


Figura 5. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit) do isolado FF 3 e estirpes tipo dos gêneros obtidas no Genbank.



6. DISCUSSÃO

Com relação a caracterização morfofocultural dos isolados de *C. truncatum*, o resultado apresentado para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foram semelhantes aos encontrados por Mayonjo e Kapooria (2003) ao estudar *Colletotrichum truncatum* em plantas de soja na Zâmbia, onde a variação foi de 51 a 84 mm, similaridade foi observada também em relação a coloração de alguns isolados estudados, os quais apresentaram coloração marrom, porém divergência houve em relação ao comprimento dos conídios a variação encontrada foi 15-31 μm e largura 2-7,6 μm .

Em estudo sobre antracnose (*C. truncatum*) Carvalho (2009) em feijão-fava encontrou largura com amplitude semelhante (2,01-4,06 μm), mas o comprimento de conídios superior, com amplitude de 18,31-26,63 μm , porém o meio de cultura utilizado foi FDA (Feijão-dextrose-água).

Silva (2016) ao caracterizar isolados de *Colletotrichum* spp. em Pimenta-de-cheiro na Amazônia, encontrou resultados semelhantes em relação a coloração, ao comprimento com uma amplitude de 9,0-15,4 μm , porém divergindo na largura com amplitude de 2,9-5,5 μm . Sousa et al. (2018) encontraram resultados divergentes para os isolados de *Colletotrichum truncatum*, com comprimento variando de 16,87 a 22,6 μm e largura 2,2 a 2,5 μm .

Ao realizar a caracterização morfofocultural dos isolados de *Fusarium* spp. resultados em concordância foram encontrados por Rolim (2019), quando comparadas a colorações das colônias, índice de crescimento micelial variando de 0,572 a 4,003 mm/dia, o comprimento de 5,85 a 17,13 μm e largura de 1,02 a 2,73 μm dos macroconídios, comprimento foi de 2,29 a 5,26 μm e largura de 0,85 a 1,76 μm dos microconídios.

Em estudo de caracterização de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* (MEZZOMO, 2017), encontrou coloração e taxa de crescimento micelial, variando de 0,485 a 1,115 mm/dia, similares, entretanto o comprimento dos macroconídios divergiu, variando 24,02 a 59,90 μm .

Quanto a análise do antagonismo entre *Fusarium* spp e *Colletotrichum truncatum* Soares & Maringoni (2018) também não obtiveram sucesso no controle in vitro de murcha-de-curtobacterium com isolados de *Fusarium* spp..

Resultados divergentes foram encontrados por Thongkamngam & Jaenaksorn (2017), que obtiveram redução de 36 a 56% do crescimento micelial de *Curvularia lunata* (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactuca* (F221-R, F442-G), *Rhizoctonia solani* (R11, R12) e *Rhizoctonia* sp. (R111, R112, R113) com *Fusarium oxysporum* (F221-B) não patogênico.

Assim como relatado por Fravel et al. (2002) nos mecanismos de antagonismo de *F. oxysporum* não há evidências de parasitismo e antibiose, existindo muitos estudos que apoiam o mecanismo de competição. Nos resultados encontrados no presente estudo, isolados de *Fusarium* spp. através da competição ocuparam rapidamente a placa de Petri inibindo os isolados de *Colletotrichum truncatum*.

Em estudos de patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp. em *Phaseolus lunatus*, vários autores concordam com os resultados aqui encontrados. Pesquisando o controle da murcha de tomateiro por isolados não-patogênicos de *Fusarium* spp., Silva & Bettiol (2005), mostraram que plantas inoculadas mantiveram seu desenvolvimento normal. Silva (2003) confirmou a redução da altura da planta, a igualdade entre o peso da parte aérea e a redução do sistema radicular para alguns isolados de *Fusarium* spp..

A indução de resistência a doenças por isolados de *Fusarium* spp. foi constatada por diversos pesquisadores: Silva & Bettiol (2005) constataram uma redução na incidência da murcha de Fusarium, quando as plantas tinham sido previamente inoculadas com isolados não-patogênicos. Thongkamngam & Jaenaksorn (2017), obtiveram uma redução da incidência e severidade de 60 a 80% de *F. oxysporum* f.sp. *lactuca* com o isolado de *Fusarium oxysporum* (F221-B). Kaur & Singh (2007), também obtiveram redução na incidência da murcha causada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, quando inoculou isolados de fungos não-patogênicos de *Fusarium oxysporum*. Diaz et al. (2005) ao inocularem plantas de pimenta (*Capsicum annuum*) com o patógeno da murcha do tomate, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) não-patogênico a pimenta, protegeu parcialmente as plantas da infecção subsequente de *Phytophthora capsici*, *Verticillium dahliae* e *Botrytis cinerea* reduzindo significativamente a percentagem de plantas doentes e o aparecimento e intensidade dos sintomas.

No tocante a avaliação das enzimas peroxidase e da fenilalanina amônia liase, resultados semelhantes aos desse estudos foram observados por Leite et al (2020), ao estudar o manejo da queima do inhame, constatou que os níveis de peroxidase estão relacionados a redução da incidência e severidade da doença, mesmo tratando antes da inoculação do patógeno. Siqueira et al. (2019) contataram que o aumento de algumas enzimas, incluindo peroxidase, está relacionada a resistência das plantas de feijão caupi a antracnose. Em estudo com o controle da podridão mole em couve-chinesa, De Mello et al. (2017), constataram a resistência induzida a partir do aumento de peroxidase e polifeniloxidase aos sete dias após a indução. Alves et al. (2020) também relacionou a resistência a *Colletotrichum* sp. com o aumento de peroxidase em *Heliconia psittacorum* x *sparthocircinata* cv. Golden Torch.

Soares & Maringoni (2018) não constataram similaridade com esse estudo e os autores citados anteriormente, em seu estudo constataram aumento da peroxidase nas folhas de feijoeiro, porém não houve indução de resistência a murcha-de-Curtobacterium. Mostrando que o aumento dessa enzima, nem sempre é eficiente para determinar a indução de resistência, fazendo-se necessário a avaliação da patogenicidade.

Em concordância com os resultados aqui apresentados, Lorenzetti et al. (2018) ao estudar Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja, constatou que a atividade da fenilalanina amônia-liase, continuava a aumentar entre sete e nove dias após o tratamento. Lima et al. (2017) relacionou, em videira, o aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase com a redução na severidade da doença (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*). Campos et al. (2003) constataram aumento da atividade de fenilalanina amônia-liase, no controle de *Colletotrichum lindemuthianum* quando inoculadas com a raça delta de *Colletotrichum lindemuthianum* (fungo indutor). Garcés-Fiallos (2022) constatou aumento na atividade de varias enzimas, inclusive a fenilalanina amônia-liase, em feijoeiros resistentes, principalmente durante os estágios avançados de colonização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Assim, Mahapatra et al. (2022) concluíram que o aumento na atividade enzimática (peroxidase e fenilalanina amônia-liase) está presente nos genótipos resistentes de feijão.

É possível identificar que a presença do *Fusarium* spp. é fundamental para o aumento inicial da peroxidase e fenilalanina amônia-liase e esse aumento foi além quando inoculado o patógeno. Em concordância com os trabalhos apresentados, esse estudo constata o aumento das enzimas relacionadas a resistência com a redução dos sintomas da antracnose causada por *Colletotrichum truncatum* em feijão-fava.

7. CONCLUSÃO

Não houve antibiose entre os isolados de *Fusarium* spp. a *C. truncatum*, os isolados FF 11.1 e FF 3 conseguiram reduzir a severidade através da indução de resistência observada pelo aumento das enzimas: Peroxidase e Fenilalanina amônia-liase.

REFERÊNCIAS

- ALVES, J. V. D. S.; COELHO, M. P.; BERTAN, F. L.; SILVA, D. C.; SILVA, V. C. D.; CHIAMULERA, M. T.; CARVALHO, I. F.; SILVA, C. A.; ARAÚJO, D. V. D. Indução de resistência a *Colletotrichum* sp. em *Heliconia psittacorum* x *sparthocircinata* cv. Golden Torch cultivada em ambiente sombreado e pleno sol. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 320-326, 2021.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- BARROS, F. C.; DE CASTRO FERREIRA, L. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, 2010.
- BELMINO, C. S. Resistência do feijão-caupi a *Colletotrichum truncatum*. Universidade Federal de Viçosa, 64f. 2004. (Tese)
- BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M.; FURTADO, E. L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 2, p. 124-128, 2010.
- BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M.; FURTADO, E. L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 168-172, 2010.
- BRADER, G., COMPANT, S., VESCIO, K., MITTER, B., TROGNITZ, F., M.A, L. J., & SESSITSCH, A. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 61-83, 2017.
- BRINK, M.; BELAY, G. **Cereals and pulses**. PROTA, 2006.

CAMPOS, Â. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M.; M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CARVALHO, E. M. S. Antracnose em feijão-fava: caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum*. Jaboticabal. p. 53. 2009. (Tese)

DE MELLO, M. R. F.; SOUZA, E. B.; PINTO, K. M. S.; DA GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R. Redução da podridão mole em couve-chinesa mediada por indutores de resistência. **CIENTEC-Revista de Ciência, Tecnologia e Humanidades do IFPE**, v. 9, n. 2, p. 15-24. 2018.

DIAS, M. D.; DIAS-NETO, J. J.; SANTOS, M. D.; FORMENTO, A. N.; BIZERRA, L. V.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX L. S.; CAFÉ-FILHO, A. C. Current status of soybean anthracnose associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 459, 2019.

DIAZ, J.; SILVAR, C.; VARELA, M. M.; BERNAL, A.; MERINO, F. Fusarium confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. **Plant Pathology**. 54, 773–80, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.

FERNANDES, C. D. F., VIEIRA JÚNIOR, J. R., DA SILVA, D. S. G., REIS, N. D., & ANTUNES JÚNIOR, H. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

FRAVEL, D. R.; LARKIN, R. P. Reduction of fusarium wilt of hydroponically grown basil by *Fusarium oxysporum* strain CS-20. **Crop protection**, v. 21, n. 7, p. 539-543, 2002.

GARCÉS-FIALLOS, F. R., DE QUADROS, F. M., FERREIRA, C., DE BORBA, M. C., BOUZON, Z. L., BARCELOS-OLIVEIRA, J. L., & STADNIK, M. J. Changes in xylem

morphology and activity of defense-related enzymes are associated with bean resistance during *Fusarium oxysporum* colonization. **Protoplasma**, v. 259, n. 3, p. 717-729, 2022.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S. F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**, v. 62, n. 1, p. 31-35, 1978.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/panorama>. Acesso em: 01 de julho de 2022.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T. D.; SILVA, J. P. D.; MELLO, S. C. M. D. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 34-41, 2014.

ITAKO, A. T. Avaliação de produtos químicos no controle e na indução de mecanismos bioquímicos de resistência a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) do tomateiro. 2012. (Tese)

JUNQUEIRA, S. F.; OLIVEIRA, E. O.; MASCARENHAS, R. J. Caracterização físico-química da fava rajada (*Phaseolus lunatus* L.) cultivada no sertão paraibano. In: **CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO**, 5, 2010, Maceió. Anais. Maceió – AL, p. 1-7, 2010.

KAUR, R.; KAUR, J.; SINGH, S. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological Control Agent. **Plant pathology Journal**, v. 9, n. 3, p. 79-91, 2010.

KAUR, R.; SINGH, R. S. Study of induced systemic resistance in *Cicer arietinum* L. due to nonpathogenic *Fusarium oxysporum* using a modified split root technique. **Journal of phytopathology**, v. 155, n. 11-12, p. 694-698, 2007.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LEITE, R. P.; NASCIMENTO, L. C. D.; GOMES, E. C. D. S.; OLIVEIRA, M. D. D. M. Indução de resistência no manejo da queima das folhas do inhame. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 1, p. 31-35, 2020.

LEITE, B.; RONCATO, L. D. B.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 235-280, 1997.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, p. 79, 2006.

LIMA, M. A. G.; PEIXOTO, A. R.; BORGES, I. V.; SILVA, M. S.; BARBOSA, M. A. G.; CAVALCANTI, L. S. Induction of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. viticola in grapevine plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 2, p. -, 2017.

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; & PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

LYMMAN, J. M. Adaptation studies on lima bean accessions in Colombia. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 108, n. 3, p. 369-373, 1983.

MAHAPATRA, S. S., SWAIN, D., BEURA, S. K., & ROUT, G. R. Identification of mung bean germplasm for resistance against *Cercospora canescens* and to study the association of biochemical parameters with defense mechanisms. **Agronomy Journal**, v. 114, n. 2, p. 1184-1199, 2022.

MAYONJO, D.M.; KAPOORIA, R.G. Occurrence and variability of *Colletotrichum truncatum* on soybean in Zambia. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, v.33, p.339-341, 2003.

MEZZOMO, R. **Caracterização morfofisiológica, molecular, enzimática e compatibilidade vegetativa de *Fusarium oxysporum* e f. *solani* em erva-mate**. p. 97, 2017. (Tese)

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. Lavras, MG. 1991. p 111. 1991. (Dissertação)

PASTOR-CORRALES, M. A.; ABAWI, G.S. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Plant Disease**, v.71, p.990-993, 1987.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492-499, 2006.

ROLIM, J. M. **Caracterização morfofisiológica e molecular de *Fusarium* spp., agente causal da murcha em *Carya illinoensis* k.** Rio Grande do Sul. p. 74, 2019. (Dissertação)

SILVA, A. M. da. **Caracterização cultural, morfológica, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da Pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.) no Estado do Amazonas.** p. 84, 2016. (Dissertação)

SILVA, J. C. da; BETTIOL, W. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of Fusarium wilt of tomato. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 409-412, 2005.

SILVA, J. C. da. **Efeito de isolados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos na redução da severidade da Murcha-de-Fusário do tomateiro.** p. 71, 2003. (Dissertação)

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C. Eficácia de *Fusarium* spp. no controle da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 44, p. 79-82, 2018.

SOARES, V. F. **Avaliação da resistência à antracnose em etnovariedades de *Phaseolus lunatus* L.** Rio Largo. p. 132, 2019. (Dissertação)

SOUSA, E.S; SILVA, J. R. A; ASSUNÇÃO, I. P; MELO, M. P; FEIJÓ, F. M; MATOS, K. S; LIMA, G. S. A; BESERRA JR, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, and JP. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997.

THONGKAMNGAM, Titi; JAENAKSORN, Tanimnun. *Fusarium oxysporum* (F221-B) as biocontrol agent against plant pathogenic fungi in vitro and in hydroponics. **Plant Protection Science**, v. 53, n. 2, 2017.

TOKESHI, H.; GALLI, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** 23: p. 217-227, 1966.

VELOSO, J.; DIAZ, J. *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici* and induces the expression of defence genes. **Plant pathology** v. 61, p. 281-288, 2012.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.174, p.30-37, 1992.

ZAMBOLIM, L., JESUS JUNIOR, W.C., RODRIGUES, F.A. O essencial da fitopatologia controle de doenças de plantas. 1.ed. v.2. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, 576p, 2014.

ZILLI, J. É.; SILVA NETO, M. L. D.; FRANÇA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; MELO, A. R. D. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 739-742, 2011.

CAPÍTULO 2: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Colletotrichum truncatum* EM *Phaseolus lunatus* POR *Rhizobium* spp.

RESUMO

Uma alternativa para o controle de doenças de plantas é o uso de microrganismos endofíticos e simbioss, capazes de ativar os mecanismos de defesa das plantas causando a resistência sistêmica induzida (ISR). O objetivo do trabalho foi investigar a eficiência de rizobactérias para o controle da antracnose em feijão-fava. O trabalho iniciou com a obtenção e caracterização morfofocultural e identificação dos isolados de *Rhizobium*, seguido da avaliação do antagonismo de isolados de *Rhizobium* spp. sobre *Colletotrichum truncatum*, posteriormente foi realizada a inoculação de *Rhizobium* spp. em feijão-fava para avaliar a produtividade, em seguida foi realizada a avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados rizobiais e ensaios para determinação da atividade enzimática, através da determinação das enzimas de resistência peroxidase e fenilalanina amônia-liase. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância a 5% de probabilidade e ao teste de Scott-Knott ($p = 5\%$) e permitiram concluir que os isolados de *Rhizobium*, identificados como *R. pusense*, não são capazes de antagonizar *C. truncatum*, porém aumentam a produtividade de feijão-fava, sendo o isolado B. Nelita capaz de induzir resistência a *C. truncatum*.

Palavras-chave: endofíticos; Controle de doenças de plantas; Antracnose.

8. INTRODUÇÃO

A cultura do feijão-fava é explorada em diversos estados do Brasil, como Alagoas, Ceará, Maranhão, entre outros, trata-se de uma cultura importante para alimentação através dos grãos verdes e secos e as vargens verdes. Além da alimentação a cultura também pode ser utilizada como adubo verde, devido a sua capacidade de realizar Fixação Biológica do Nitrogênio (SANTOS et al., 2008).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é uma simbiose (rizóbio-leguminosa) de importante expressão econômica, por disponibilizar Nitrogênio para a absorção da planta. Entretanto, não há muitos estudos direcionados a cultura do feijão-fava, sendo o maior enfoque direcionado ao feijão comum *P. vulgaris* (ANTUNES et al., 2011).

A produção do Feijão-fava é limitada pela presença de diversas doenças entre elas, podem ser citadas: viroses, podridão radicular, a antracnose, o míldio, o crestamento bacteriano, a murcha vascular e as galhas radiculares, com a possibilidade de provocar consideráveis perdas na produção da cultura (BRINK & BELAY, 2006).

A Antracnose, causada por diversas espécies do gênero *Colletotrichum* (*Glomerellaceae*, *Sordariomycetidae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*) descrito em 1831 por Corda. Espécies de *Colletotrichum* são relatadas como fitopatógenos de grande importância para todo o mundo, pois possui uma ampla gama de hospedeiros (PAMPHILE et al 2017).

Sua identificação é realizada através das diferenças morfoculturas, tais como coloração da colônia, taxa de crescimento, tamanho e forma de conídios e apressórios e taxa de crescimento (SMITH & BLACK, 1990) e através de análises de sequências de ácidos nucleicos, cujas regiões mais estudadas são: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actina (ACT), quitina sintetase (CHS-I), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), histona (HIS3), glutamina sintetase (GS), superóxido-dismutase de manganês (SOD) e a região do espaçador interno transcrito (ITS) (CANNON et al., 2012; WEIR et al., 2012). As espécies *Colletotrichum truncatum*, *C. cliviae* e *C. fructicola* foram identificados como agentes causais da antracnose em *Phaseolus lunatus* (SOUSA et al. 2018). No Brasil existem poucos registros da doença em feijão-fava.

Os sintomas da antracnose em feijão-fava são manchas avermelhadas ao longo das nervuras, sobre hastes e pecíolos jovens e na face interior das folhas; as vagens adquirem lesões deprimidas, avermelhadas e grandes onde são formados os acérvulos do patógeno (PAULA JÚNIOR et al, 1995).

A medida de controle utilizada nas culturas é o uso de agroquímicos, a utilização de sementes livres de patógenos e a rotação de culturas (BRINK & BELAY, 2006). Entretanto, um dos métodos de controle de fitopatógenos, amplamente utilizado, com melhores resultados é a resistência genética, este tem sido utilizado como estratégia em diversas culturas.

Uma alternativa para o controle de doenças de plantas é o uso de microrganismos endofíticos, com a capacidade de indução de resistência (HALLMANN et al., 1997). Bactérias endofíticas, como espécies de *Rhizobium*, são capazes de ativar os mecanismos de defesa das plantas causando a resistência sistêmica induzida (ISR), que torna as plantas capazes de se defenderem de vários patógenos. Muitas enzimas estão relacionadas a resistência sistêmica induzida, entre elas a Peroxidase e a Fenilalanina amônia-liase (VAN-LOON et al., 1994).

Assim o objetivo do trabalho foi investigar a eficiência de rizobactérias para o controle da antracnose do feijão-fava.

9. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Clínica de Diagnose Vegetal do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA – UFAL), localizado no município de Rio Largo – AL. Inicialmente buscou caracterizar os isolados rizobiais obtidos de *P. lunatus* como indutores de crescimento. Os isolados contrastantes para a indução do número de nódulos e produção de matéria seca foram escolhidos para os ensaios de indução de resistência. As plantas inoculadas com os dois isolados rizobiais foram avaliados para os sintomas da antracnose. A avaliação dos sintomas foi associada com a atividade das enzimas associadas a patogênese.

9.1. Material vegetal

A variedade crioula denominada de STL (Sura Lúcio) de *P. lunatus* foi obtida em Alagoas, município de Taquarana. A variedade é suscetível aos isolados ICT 12 e ICT 16 de *Colletotrichum truncatum* (SOARES, 2019). A variedade apresenta crescimento determinado. As plantas foram mantidas em vasos (2 L) contendo solo para produção de sementes que foram utilizadas nos experimentos.

9.2. Obtenção dos microrganismos

Os isolados de bactérias (Rama, B. Nelita, Olho de Peixe e Marinete) e *C. truncatum* (ICT 16 e ICT 12) foram obtidos da coleção de microrganismos da Clínica Fitossanitária do Campus de Engenharias e Ciências Agrária. Os isolados rizobiais foram obtidos de plantas cultivadas em solo coletado da camada arável do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias e não possuíam identificação.

Os dois isolados de *Colletotrichum truncatum* compõem a coleção de microrganismos da Clínica Fitossanitária e foram obtidos de plantas de *P. lunatus* com sintomas de antracnose cultivadas no estado de Alagoas nos municípios de Murici (ICT 16) e Messias (ICT 12). Os isolados diferenciam na agressividade em variedades crioulas cultivadas em Alagoas (SOARES, 2019).

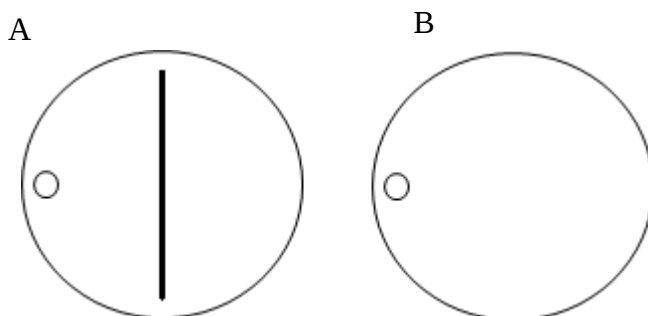
9.3. Caracterização fenotípica dos isolados rizobiais

A caracterização dos isolados rizobiais iniciou com a retirada da preservação e riscados em placa de Petri contendo o meio YMA (Yeast, Manitol, Ágar). A colônia isolada foi obtida após o cultivo de quatro dias de crescimento. A caracterização morfológica foi realizada em meio YMA, através do tipo de crescimento (rápido, lento, intermediário e muito lento), alteração do pH em meio YMA com indicador azul de bromotimol (ácido, neutro ou alcalino), tamanho (diâmetro das colônias), forma das colônias (circular, irregular ou puntiforme), elevação da colônia (plana, lenticular, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada), borda (inteira, ondulada, lobada, denteada ou filamentosa), superfície (lisa, rugosa ou papilada), produção de muco (escassa, pouca, moderada ou abundante), consistência (seca, aquosa, gomosa, viscosa ou butírica), detalhes ópticos (transparente, translúcida ou opaca) e cromogênese em vermelho Congo e em azul de bromotimol (HUNGRIA & SILVA, 2011). As placas foram colocadas em BOD a uma temperatura de 28°C sem fotoperíodo até aparecer as colônias isoladas, entre 5 e 10 dias. Foram avaliados quatro isolados em 5 repetições. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, para a característica tamanho a comparação de médias foi realizada com o auxílio do programa Sisvar pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

9.4. Antagonismo dos isolados rizobiais sobre *C. truncatum*.

Os experimentos de antagonismo de isolados de rizóbio contra o dois isolados de *C. truncatum* (ICT12 e ICT16) foi realizado separadamente (ARFAOUI et al., 2006). Foi utilizado um discos de 5 mm dos isolados de *C. truncatum* extraídos de cultivos em meio BDA com sete dias. O disco foi depositado em uma das extremidades da placa de Petri. As bactérias foram inoculadas no meio da placa fazendo uma risca com inóculo no sentido do diâmetro da placa (Figura 7). As testemunhas foram placas contendo apenas o cultivo do isolado de *Colletotrichum truncatum* (ICT 12 ou ICT 16). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, mais testemunha e quatro repetições para cada experimento. As medições do IVCm (índice de velocidade de crescimento micelial) foram realizadas durante sete dias, em duas direções perpendiculares, após as testemunhas atingirem o centro da placa. A comparação de médias foi realizada com o auxílio do programa Sisvar pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Ao final dos sete dias, foi feita a avaliação da coloração e da presença ou ausência da zona de inibição entre os dois microrganismos.

Figura 7. Esquema exemplificando a avaliação do antagonismo em culturas pareadas com disco fúngico e risca bacteriana. A – Confronto; B – Testemunha



9.5. Promoção de crescimento pelos isolados rizobiais em *P. lunatus*.

Os isolados rizobiais foram avaliados com a inoculação da suspensão de células no colo da planta cultivadas em solo estéril. A contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placa contendo o meio YMA (Yeast, Manitol, Ágar), foi realizada de acordo com Mariano & Silveira, 2005. Diluições da suspensão de células obtidas do cultivo em meio sólido foi determinado através da densidade óptica (DO) em comprimento de onda de 540 nm (URENHA et al., 1994). O valor de densidade ótica de 0,157 estima na suspensão de células a concentração 10^8 células mL^{-1} (ARFAOUI et al., 2006).

O solo foi coletado no Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da camada arável, esterilizado por 1 hora, a 120°C em autoclave por duas vezes. O experimento foi conduzido em ambiente protegido, telado, sendo utilizados 15 vasos (2 L). Nos vasos foram semeadas 3 sementes e após uma semana da germinação foi feito o desbaste deixando apenas as plantas mais vigorosas e com crescimentos uniformes nos vasos. No decimo dia após a semeadura foi preparada a suspensão com 10^8 células/mL e 1 mL da suspensão foi inoculada no colo das plantas. O delineamento estatístico com inteiramente casualizado e contava com quatro tratamentos (isolados Rama, Olho de Peixe, B. Nelita e Marinete) mais a testemunha e três repetições, o mesmo ocorreu para o experimento com solo não esterilizado. A avaliação foi aos 45 dias após a emergência (DAE). A coleta foi realizada por meio da separação da parte aérea e parte radicular da planta. Após separação a parte aérea foi avaliada através da matéria seca. Os sistemas radiculares foram lavados, foram retirados todos os nódulos presentes e determinada a massa seca dos nódulos e do sistema radicular. Para a determinação da matéria seca, as amostras foram colocadas em estufa de circulação forçada a 60°C , por 24 horas. Os

resultados obtidos foram submetidos a análise de variância a 5% de probabilidade e ao teste de Scott-Knott.

9.6. Avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados rizobiais

O ensaio foi conduzido com plantas colonizadas pelos quatro isolados rizobiais. Após 45 dias do plantio, as plantas foram inoculadas nas folhas com uma aspersão de conídios dos isolados ICT 12 e ICT 16 e mantidas em casa de vegetação (Temperatura e umidade médias: 28°C e 85%, respectivamente).

As folhas trifolioladas completamente expandidas foram destacadas, duas folhas por planta com 45 dias. Foi inoculada uma suspensão de 10^5 conídios mL⁻¹ de ICT 12 e ICT 16 pulverizando-se ambas as faces da folha. As folhas tratadas foram mantidas em placa de Petri, com papel filtro e algodão umedecidos com água destilada esterilizada para manter a umidade. As placas foram deixadas em BOD a 25°C sem fotoperíodo. As folhas foram avaliadas no sétimo e decimo dias após a inoculação (DAI), através de escala de notas, que varia de 0 a 5 de acordo com a porcentagem da área foliar afetada proposta por Carvalho (2009), onde 0 – ausência de sintomas, 1 – até 10% da área afetada, 2 – 11 a 25%, 3 – 26 a 50%, 4 – 51 a 75% e 5 – 76 a 100% da área afetada. As plantas foram classificadas em imune (I), nota 0, altamente resistente (AR), nota 0,1 a 1,4, moderadamente resistente (MR), nota 1,5 a 2,4, moderadamente suscetível (MS), nota 2,5 a 3,0, e altamente suscetível (AS), notas acima de 3,0 (BELMINO, 2004). O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos mais a testemunha nos dois experimentos, a comparação das médias das notas foi realizada com o auxílio do programa Sisvar pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A partir dos resultados dessa etapa, foi selecionado o isolado de *C. truncatum* menos agressivo e foram selecionados os isolados de rizobiais mais contrastantes, ou seja, os com a maior e menor inibição dos sintomas causados por *C. truncatum*.

9.7. Extração de DNA de isolados contrastantes de rizóbio

A extração do DNA genômico das bactérias rizobiais foi realizada de acordo com o protocolo de Mariano & Silveira (2005), com modificações. Cultivou-se as bactérias em meio YMA por 36 horas. Após o crescimento foram adicionadas 3 alças de Drigalski do crescimento bacteriano a microtubos contendo 567 µl de TE 1X e agitado em vórtex. Foi adicionado 30 µl de SDS a 10% e agitado em vórtex. Foi adicionado 3 µl de proteinase K seguido por agitação

em vórtex. Após incubação por 1 hora e 30 minutos a 37 °C, foi adicionado 100 µl de NaCl 5 M, agitado em vórtex, adicionou-se 80 µl de CTAB/NaCl (bromuro de cetiltrimetilamonio/cloreto de sódio), agitou em vórtex e incubou em banho-maria a 65 °C por 10 minutos. A desproteinização foi realizada adicionado 780 µl de Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitando por 10 minutos (manualmente) e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 360 µl de isopropanol (gelado) e mantido por 4 horas nesta condição. O microtubo foi invertido até que o DNA se tornar visível e centrifugado a 14.000 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) obtido no fundo do microtubo foi lavado com 1 mL de etanol 70% (gelado) e centrifugado por 3 minutos a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o DNA colocado para secar por 20 minutos em câmara de fluxo laminar. O DNA das amostras foi ressuscitado em 50 µL de TE 0,1X acrescido de ribonuclease (10 mg/mL) e incubados a temperatura de laboratório por 12 horas.

Após o término da extração de DNA, foi confirmado em eletroforese e gel de agarose a 1,0% por 60 min a 90 V. O DNA foi corado com Sybr Safe® (Invitrogen, Eugene, Oregon, Estados Unidos) e revelação sob luz ultravioleta em transiluminador L.PIX (Loccus biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). O registro foi armazenado na forma de fotografia digital.

Os isolados de rizóbios foram caracterizados pela região que codifica o 16S rRNA, considerado conservado entre as bactérias e capaz de revelar as relações filogenéticas entre as espécies (WEISBURG et al., 1991). Utilizando a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), com o auxílio do termociclador (2720 Thermal Cycler). A amplificação da região 16s ribossomal foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores 16S rRNA (27F, 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'; 1492R, 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3') onde as condições de amplificação foram: temperatura de desnaturação de 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de: 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, e 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 10 min para obtenção de fragmentos com tamanho variando de 1400 a 1500 pb, estimado com o auxílio do ladder 1kb (Ludwing Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil). A presença do fragmento de DNA amplificado foi observada após eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Syber Safe® em cuba de eletroforese durante 120 min a 90 V. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador L.PIX (Locus Biotecnologia, Cotia São Paulo, Brasil) e os dados foram registrados em formato fotográfico. O sequenciamento foi realizado pelo laboratório ACTgene. Após o recebimento das sequencias foi feita a conferência com o banco de dados GenBank.

As sequências dos isolados e as sequências das estirpes tipos mais similares foram alinhadas utilizando o ClustalW do MEGA e as árvores filogenéticas inferidas pelo método de Inferência Bayseana com uso do site Cipres.

9.8. Ensaio de indução de resistência com 2 isolados de *Rhizobium* spp. selecionados

O experimento iniciou com a desinfestação de sementes da variedade suscetível de *P. lunatus* por 3 minutos em etanol 70%, 10 minutos em hipoclorito de sódio 5% e 10 lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada (ZILLI et al. 2011), em seguida foi realizado o plantio em casa de vegetação em vasos de 2 L. Após sete dias da germinação foram inoculados 1 mL de suspensão com 10^8 células rizobiais /mL no colo das plantas. Os tratamentos foram as espécies de *Rhizobium* selecionadas, contando com dois tratamentos, B. Nelita e Olho de peixe e plantas sem as bactérias rizobiais e oito repetições. Aos 45 dias após a germinação, as plantas foram inoculadas com a suspensão de conídios de *C. truncatum* (ICT 12). A avaliação de resistência pela resposta das plantas a inoculação ao patógeno e avaliação da alteração da atividade de enzimas associadas a reposta de defesa. Um dia antes da inoculação, sete e dez dias após a inoculação com *C. truncatum* foram realizadas as análises enzimáticas. Foram coletadas 6 folhas por planta (duas a cada avaliação, para avaliação da análise da Peroxidase e fenilalanina amônia-liase). As folhas coletadas foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento da realização dos ensaios para determinação da atividade enzimática. A reposta das plantas a inoculação do *C. truncatum* foi avaliada no sétimo e décimo dia após a inoculação (DAI). A quantificação da doença foi determinada por uma escala de notas, que varia de 0 a 5 de acordo com a porcentagem da área foliar (CARVALHO, 2009).

9.9. Atividade enzimática

9.9.1. Peroxidase

O extrato enzimático para análise da Peroxidase foi preparado com 0,5 g de folha, 1 ml do tampão acetato de sódio, pH 5,0 (0,25 ml de ácido acético puro, 1,296 g de acetato de sódio anidro, completar volume para 1000 ml), 2,56 g de Polivinilpirrolidona (PVP), macerado com auxílio de nitrogênio líquido, cadinho e pistilo até a obtenção de massa homogênea, posteriormente foi centrifugada a 15.000 x por 25 min a 4°C (BOAVA et al, 2010; BOAVA et al, 2010), o sobrenadante foi armazenado em freezer até a análise em espectrofotômetro. A

atividade enzimática foi analisada através do espectrofotômetro Biochrom WPA Lightwave II, observando-se a variação na absorbância em comprimento de onda de 470 nm, para o branco foi usado 3 mL da solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), para a amostra 0,10 mL do extrato protéico e 2,9 mL de solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) (BOAVA et al, 2010; BOAVA et al, 2010). A atividade da peroxidase foi quantificada a cada 15 s por 3 minutos, expressa como atividade específica (unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹). As análises estatísticas foram realizadas com os valores calculados de atividade enzimática que foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

9.9.2. Fenilalanina amônia-liase

O extrato enzimático para Fenilalanina amônia-liase foi preparado, segundo Rodrigues, Neto & Coelho (2006) com 1 g de folha e 6 ml, a 4°C, de tampão de extração (22,2 g de tris, 0,37 g de EDTA, 85,5 g de sacarose, 10 g de PVP, completar para 1000 ml e ajustando o pH para 8,0 com ácido clorídrico), macerada com nitrogênio líquido e auxílio de cadinho e pistilo até a obtenção de massa homogênea, posteriormente foi centrifugada a 6.000 x por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi diluído, com 200 µl para 5 ml do tampão de extração, a mistura foi encubada em banho-maria a 40°C por uma hora, interrompendo a reação com banho de gelo e realizando as leituras, em cubeta de quartzo. A determinação da atividade enzimática foi constatada a partir da diferença de absorbância na conversão de fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO et al., 1978), por meio de variação na absorbância em comprimento de onda de 290 nm, com o auxílio do espectrofotômetro Biochrom WPA Lightwave II, a amostra foi preparada com 1,5 ml de extrato enzimático, 1,0 ml do tampão de extração e 0,5 ml de Fenilalanina amônia-liase (49,6 mg/mL) ou água destilada na amostra “branco”, expressa em U.A./min./mg de proteína. As análises estatísticas foram realizadas com os valores calculados de atividade enzimática que foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

10. RESULTADOS

10.1. Caracterização fenotípica dos isolados rizobiais

Os quatro isolados rizobiais pertencem ao grupo das bactérias gram-negativas, que apresentaram colônia com elevação convexa, superfície lisa, detalhe ótico translúcido e borda inteira. A reação de cromogêneas para vermelho congo e azul de bromotimol foi rosa e amarelo, respectivamente. Três isolados rizobiais apresentaram crescimento rápido, com produção de muco moderada e gomoso (Tabela 13). As três bactérias com crescimento rápido diferenciaram no tamanho das colônias e a colônia de crescimento lento apresentou o menor tamanho.

Tabela 13. Caracterização morfológica das colônias dos isolados de rizóbio em meio YMA

Isolado	Crescimento	Produção de muco	Consistência	Tamanho (mm)
B. Nelita	Rápido	Moderada	Gomoso	1,88 c
Olho de Peixe	Rápido	Moderada	Gomoso	1,12 b
Rama	Rápido	Moderada	Gomoso	2,21 d
Marinete	Lenta	Escassa	Seca	0,66 a
C.V. (%)	-	-	-	12,38

Médias de cinco repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

10.2. Antagonismo entre os isolados rizobiais e *C. truncatum*.

No confronto dos rizobios (Nelita, Rama, Olho de Peixe e Marinete) para a avaliação do antagonismo contra os isolados de *C. truncatum* (ICT 12 e ICT 16), verificou-se que os isolados rizobiais reduziram a taxa de crescimento diário do fungo. Os isolados com crescimento rápido (B. Nelita, Olho de Peixe e Rama) causaram maiores reduções da taxa de crescimento de *C. truncatum* (Tabela 14).

Tabela 14. Taxa de crescimento diário dos isolados *Colletotrichum truncatum* (ICT 12 e ICT 16) e em cultivos pareados com isolados rizobiais. A avaliação aconteceu durante sete dias e em meio BDA.

Tratamento	Taxa de crescimento diário (cm/dia)	
	ICT 12	ICT 16
Cultivo isolado	0,62 c	0,56 c
B. Nelita	0,43 a	0,36 a
Olho de peixe	0,44 a	0,42 a
Rama	0,39 a	0,38 a
Marinete	0,54 b	0,49 b
C.V. (%)	8,52	8,89

Médias de quatro repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

10.3. Promoção de crescimento pelo isolados rizobiais em *P. lunatus*

A inoculação de *P. lunatus* com os quatro isolados rizobiais em solo autoclavado indicaram duas bactérias rizobiais indutoras de crescimento da parte aérea e sistema radicular. O isolado rizobial B. Nelita induziu um maior número de nódulos nas raízes e a planta produziu mais massa seca da parte aérea (Tabela 15). O isolado rizobial olho de peixe apresentou valores superiores para número de nódulos e produção de massa seca da parte aérea. O isolados B. Nelita e Olho de Peixe tiveram maior produção de massa seca da raiz. O isolado Rama apresentou nódulo, mas sem promover ganho para matéria seca da parte aérea. O isolado Marinete não induziu nodulação e sem promover crescimento.

Tabela 15. Avaliação de matéria seca da parte aérea, raiz e nódulos e quantidade de nódulos para a inoculação de isolado de rizóbio em solo autoclavado, por 45 dias.

Tratamentos	Nº nódulos	Nódulos	Parte aérea	Raiz
		Peso seco	Peso seco	Peso seco
B. Nelita	30 d	0,0040 c	2,0 c	0,4 b
Olho de peixe	15 c	0,0019 b	1,6 b	0,5 b
Rama	10 b	0,0015 b	0,6 a	0,2 a
Marinete	0 a	0,0000 a	0,3 a	0,2 a
Testemunha	0 a	0,0000 a	0,3 a	0,1 a
C.V. (%)	4,98	28,90	15,39	37,47

Médias de três repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

10.4. Avaliação da indução de resistência a antracnose por isolados rizobiais

As plantas inoculadas com as bactérias rizobiais tiveram a severidade da doença reduzida causada pelo isolado ICT 12 de *C. truncatum*. Aos sete dias após a inoculação, os tratamentos com os isolados Rama, Olho de peixe e B. Nelita mostraram médias inferiores para os sintomas da doença. As notas caracterizam a reposta da plantas ao patógeno aos sete e dez dias após a inoculação, todos os tratamentos foram estatisticamente equivalentes (Tabela 16).

No experimento com ICT 16, resultados similares foram encontrados. Na avaliação aos sete dias, observou-se redução dos sintomas nas plantas inoculadas como os isolados B. Nelita, Rama e Olho de peixe. A severidade apresentada pelas plantas inoculadas com o isolado B. Nelita apesar do valor na nota não diferenciar das demais, a nota foi menor sendo considerada uma reação moderadamente resistente. As notas atribuídas as plantas inoculadas com os isolados Rama e Olho de peixe classifica a resposta como moderadamente suscetível. Os demais tratamentos (Testemunha e Marinete) foram classificados como altamente suscetíveis. Na segunda avaliação todos os tratamentos foram iguais estatisticamente, recebendo a classificação de altamente suscetíveis. O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 17).

Tabela 16. Avaliação de plantas de *Phaseolus lunatus* inoculadas com *Colletotrichum truncatum* (ICT 12 e ICT 16) em solo autoclavado.

Tratamentos	ICT12		ICT16	
	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias
B. Nelita	3,2 a	3,2 a	2,3 a	3,7 a
Olho de peixe	3,0 a	4,7 a	3,0 a	5,0 a
Rama	3,0 a	4,3 a	3,0 a	4,7 a
Marinete	4,0 b	5,0 a	4,0 b	5,0 a
Testemunha	4,0 b	5,0 a	4,0 b	5,0 a
C.V. (%)	7,45	14,42	14,25	14,16

Médias de três repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 17. Repetição do experimento. Avaliação de plantas de *Phaseolus lunatus* inoculadas com *Colletotrichum truncatum* (ICT 12 e ICT 16) em solo autoclavado.

Tratamentos	ICT12		ICT16	
	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias
B. Nelita	3,0 a	3,3 a	1,0 a	3,0 a
Olho de peixe	3,3 a	3,7 a	1,7 a	3,2 a
Rama	4,3 b	4,3 a	2,8 b	3,7 a
Marinete	4,5 b	4,5 a	3,3 b	4,0 a
Testemunha	4,8 b	5,0 a	3,7 b	4,0 a
C.V. (%)	10,90	20,13	11,64	16,88

Médias de três repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

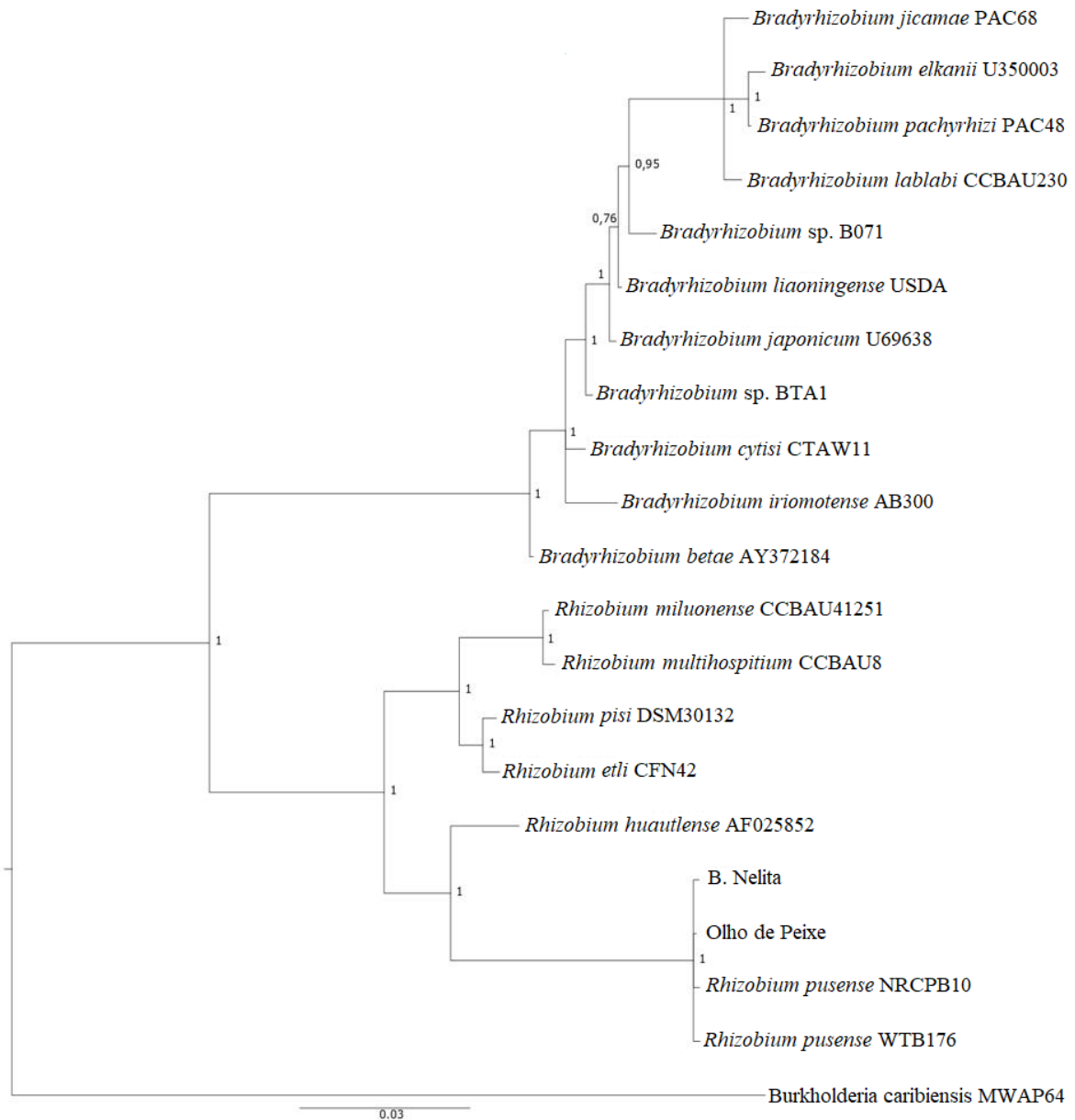
Com os resultados avaliados, foram selecionados os isolados B. Nelita com o resultado mais promissor e Olho de peixe para seguir com os estudos das enzimas. Para o *C. truncatum* foi selecionado o ICT 12 por obter resultados mais consistentes.

10.5. Caracterização molecular dos isolados contrastantes de rizóbio

Por ser um gene altamente conservado o 16S rRNA é uma ferramenta importante para uma primeira identificação de bactérias (WILLIEMS et al., 2003), tornando possível a

confirmação do gênero *Rhizobium* para os isolados B. Nelita e Olho de peixe sendo possivelmente ambas pertencentes a espécie *Rhizobium pusense* (Figura 8)

Figura 8. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados B. Nelita e Olho de peixe e estirpes tipo dos gêneros obtidas no Genbank.



10.6. Ensaio de indução de resistência com 2 isolados de *Rhizobium* spp. selecionados

Na avaliação da patogenicidade (Tabela 18), na primeira avaliação as plantas inoculadas com o isolado rizobiais B. Nelita e Olho de peixe apresentaram redução na severidade da doença. As notas atribuídas na avaliação, classificam a resposta das plantas inoculadas com o isolados B. Nelita e Olho de peixe como altamente resistente e Olho de peixe e testemunha como moderadamente suscetível. Na segunda avaliação, observou-se evolução dos sintomas. A planta inoculadas com o isolado B. Nelita apresentou severidade reduzida e reposta foi classificada como moderadamente resistente. A reposta das plantas inoculadas com o isolado olho de peixe foi classificada como moderadamente suscetível e a testemunha como altamente suscetível (BELMINO, 2004). O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 19).

Tabela 18. Avaliação de plantas de *Phaseolus lunatus* inoculadas com *Colletotrichum truncatum* (ICT 12).

Tratamentos	ICT 12	
	7 dias	10 dias
B. Nelita	1,40 a	2,40 a
Olho de Peixe	1,50 a	3,00 b
Testemunha	2,00 b	3,50 b
C.V. (%)	7,18	16,68

Médias de oito repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 19. Repetição do experimento. Avaliação de plantas de *Phaseolus lunatus* inoculadas com *Colletotrichum truncatum* (ICT 12).

Tratamentos	ICT 12	
	7 dias	10 dias
B. Nelita	0,60 a	1,80 a
Olho de Peixe	2,00 b	2,40 a
Testemunha	2,60 b	3,00 a
C.V. (%)	15,41	16,68

Médias de oito repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

10.7. Atividade enzimática

10.7.1. Peroxidase

A inoculação das bactérias não ativou na planta a atividade da enzima peroxidase. Avaliação conduzida um dia antes na inoculação mostram a mesma atividade para todos os tratamentos. No entanto, as inoculações das plantas com as bactérias potencializaram respostas das mesmas quando desafiadas com o patógeno, sendo a maior resposta da atividade enzimática atribuídas as plantas inoculadas com o isolado B. Nelita (Tabela 20). O aumento da atividade persiste aos 10 dias após o desafio com o patógeno nas plantas inoculadas com o isolado B. Nelita. Em relação a primeira avaliação, sem a inoculação do patógeno, os tratamentos foram estatisticamente equivalentes variando de 0,664 a 1,385 absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹. Para a segunda avaliação, as folhas das plantas que haviam sido tratadas com B. Nelita apresentaram uma maior atividade 28,461 absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, seguida por Olho de peixe (7,730 absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹), divergindo da primeira avaliação, e por último da testemunha (1,331 absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹). Já na terceira avaliação a maior atividade foi encontrada no tratamento com B. Nelita (6,941 absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹), os demais tratamentos não tiveram diferença entre si. O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 21).

Tabela 20. Atividade da Peroxidase em folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com espécies de *Rizobium* e inoculadas com *Colletotrichum truncatum* nos tempos de coleta de 1 dia antes da

inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹

Tratamento	Primeira avaliação	Segunda avaliação	Terceira avaliação
B. Nelita	1,385 aA	28,461 cB	6,941 bA
Olho de peixe	1,012 aA	7,730 bB	2,896 aA
Testemunha	0,664 aA	1,331 aA	0,912 aA
C.V. (%)	17,34	10,07	22,48

Médias de oito repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 21. Repetição do experimento. Atividade da Peroxidase em folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com espécies de *Rizobium* e inoculadas com *Colletotrichum truncatum* nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹

Tratamento	Primeira avaliação	Segunda avaliação	Terceira avaliação
B. Nelita	1,294 a	12,048 c	4,066 a
Olho de peixe	1,216 a	7,644 b	3,614 a
Testemunha	1,142 a	6,282 a	3,194 a
C.V. (%)	12,90	15,16	25,32

Médias de oito repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

10.7.2. Fenilalanina amônia-liase

A inoculação das bactérias ativou nas plantas a atividade da enzima fenilalanina amônia liase. Avaliação conduzida um dia antes do desafio com o patógeno, *C. truncatum*, mostra aumento da atividade da enzima para as plantas inoculadas com os isolados rizobiais. A inoculação com bactérias também potencializou repostas das plantas após o desafio com o patógeno, sendo a maior resposta da atividade enzimática atribuídas as plantas inoculadas com o isolado B. Nelita (Tabela 22). A atividade da enzima aumentou aos 10 dias após o desafio

com o patógeno nas plantas inoculadas e maior atividade foram nas plantas inoculadas com o isolado B. Nelita. As plantas inoculadas com o patógeno apresentaram o aumento da resposta da enzima com 10 dias em relação aos dias anteriores.

A primeira avaliação da atividade da Fenilalanina amônia-liase (Tabela 22) já mostrou uma superioridade dos tratamentos em relação a testemunha, plantas tratadas com B. Nelita e Olho de peixe, não diferiam entre si e apresentaram atividade de 1,309 e 1,202 absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, respectivamente. Na segunda avaliação plantas tratadas com B. Nelita apresentaram média superior 4,386 absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, seguida por Olho de peixe (2,103 absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹) e por último a testemunha com 1,053 absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹. Na terceira avaliação, 10 dias após a inoculação, plantas tratadas com B. Nelita apresentaram média superior 10,634 absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, seguida por Olho de peixe e testemunha, que não diferiram entre si (5,656 e 5,512 absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, respectivamente). O experimento foi repetido e os resultados confirmados (Tabela 23).

Tabela 22. Atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com espécies de *Rizobium* e inoculadas com *Colletotrichum truncatum* nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

Tratamentos	Primeira avaliação	Segunda avaliação	Terceira avaliação
B. Nelita	1,309 bA	4,386 cA	10,634 bB
Olho de peixe	1,202 bA	2,103 bA	5,656 aB
Testemunha	0,512 aA	1,053 aA	5,512 aB
C.V. (%)	11,7	9,08	12,08

Médias de oito repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

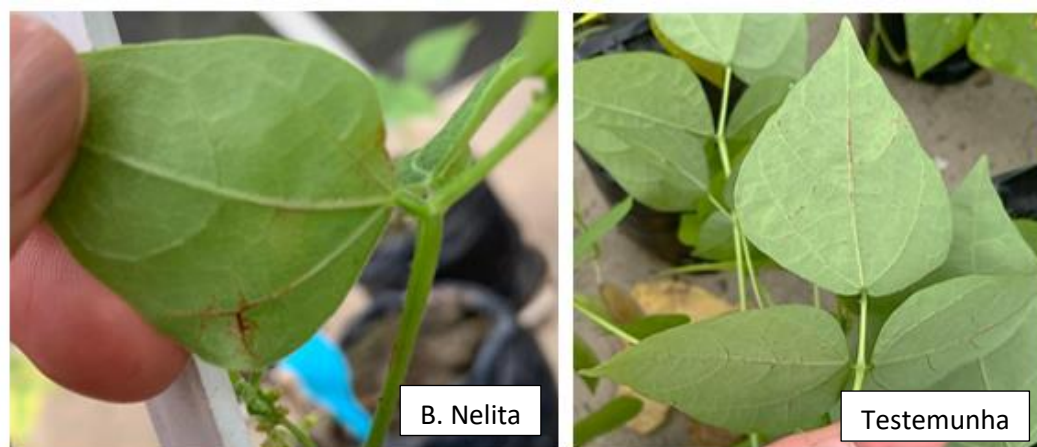
Tabela 23. Repetição do experimento. Atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de *Phaseolus lunatus* tratadas com espécies de *Rizobium* e inoculadas com *Colletotrichum truncatum* nos tempos de coleta de 1 dia antes da inoculação, sete e 10 dias após a inoculação. Atividade expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

Tratamentos	Primeira avaliação	Segunda avaliação	Terceira avaliação
B. Nelita	3,645 b	4,796 b	7,420 b
Olho de peixe	2,574 a	3,342 a	6,836 b
Testemunha	2,562 a	3,022 a	3,876 a
C.V. (%)	10,69	22,17	33,27

Médias de oito repetições. Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

C.V. = Coeficiente de variação.

Figura 9. Resposta de indução de resistência conferida por espécies de *Rhizobium* em plantas de feijão fava inoculadas com *C. truncatum*.



11. DISCUSSÃO

Para o estudo da caracterização fenotípica dos isolados de *Rhizobium* spp. foi encontrada semelhanças com os isolados estudados por Do Amorim et al. (2019), onde foram encontradas colônias circulares, convexas, com bordas inteiras e de superfície lisa, crescimento rápido, a maioria apresentou reação ácida, muco com consistência gomosa e colônias com coloração creme, mostrando características similares àquelas encontradas nos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium* e *Mesorhizobium*.

Ao avaliar o Antagonismo entre os isolados *Rhizobium* spp. e *C. truncatum*, o *Rhizobium* spp. estudados como um produtor de antibióticos por EHTESHAMUL-HAQUE & GHAFAR, 1993, não houve esse efeito, tendo o patógeno crescido da mesma maneira na presença e na ausência da bactéria, confirmando e concordando com os resultados obtidos nesse estudo onde não houve efeito inibitório.

Para a seleção de isolados de *Rhizobium* spp. para indução de resistência a antracnose, resultados apresentados, mostram a eficiência dos isolados de *Rhizobium* sp. B. Nelita, Olho de peixe e Rama na nodulação e consequentemente na produção de matéria seca em feijão-fava, o isolado Marinete perdeu sua capacidade de nodulação.

Plantas tratadas com os isolados de bactéria Olho de peixe e Rama são classificadas, segundo Belmino (2004), como moderadamente suscetíveis, enquanto os demais tratamentos são classificados como altamente suscetíveis.

Resultado promissor foi encontrado por Volpiano (2017) demonstrando a grande potencialidade de *Rhizobium* spp. no controle biológico de *Sclerotium rolfsii* (sin. *Athelia rolfsii*) mediante inoculação de sementes de feijão, eficiência, também foi comprovada no controle de *Fusarium solani* (DAR et al. 1997). Estudos comprovam que *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* é eficaz no controle de *Pythium* de ervilha e lentilha (HUANG & ERICKSON, 2007).

Aumento na atividade de peroxidase, foi encontrado ao aplicar extratos vegetais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro (DEMARTELAERE et al. 2015) e em feijão (CAMPOS et al. 2004), resultado confirmado por esse estudo. Ao estudar fosfitos no manejo da antracnose no jiló, Alexandre et al. (2014) observaram correlação na redução da incidência da doença e o aumento da atividade de algumas enzimas incluindo a peroxidase, correlação aqui constatada. Em estudo mais recente, Omara et al. (2022), constatou o aumento da atividade da peroxidase em genótipos resistentes de feijão a *Uromyces appendiculatus*.

Resultados similares aos aqui relatados foram encontrados por: Siqueira et al. (2019), ligando o aumento da atividade de diversas enzimas, incluindo a Fenilalanina amônia-liase, com a maior resistência a antracnose das plantas de feijão caupi. Em estudo de pós-colheita de antracnose em *Mangifera indica* (MAIA et al. 2020) houve redução da severidade da antracnose ligadas as altas atividades enzimáticas de Fenilalanina amônia-liase. Mazaro et al. (2009) constataram que a quitosana induziu a resistência das plântulas de beterraba e tomate e reduziu a incidência de tombamento confirmado pelo aumento na atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase. Monteón-Ojeda et al. (2022) sugere que o aumento da atividade enzimática contribui para o aumento da resistência à infecção por *Colletotrichum* spp. em Manga.

É possível identificar que a presença do *Rhizobium* spp. é fundamental para o aumento inicial da Fenilalanina amônia-liase, mas não houve a alteração nos níveis da peroxidase, o aumento da peroxidase veio após a inoculação do patógeno. Ao avaliar os estudos similares já realizados na área é possível confirmar o aumento das enzimas relacionadas a resistência com a redução dos sintomas da antracnose causada por *Colletotrichum truncatum* em feijão-fava.

12. CONCLUSÃO

O isolado de *Rhizobium*, identificado como *R. pusense*, não são capazes de antagonizar *C. truncatum*, sendo o isolado B. Nelita capaz de induzir resistência a *C. truncatum*, confirmada através do aumento das enzimas Peroxidase e Fenilalanina amônia-liase.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, E. R.; HERCULANO, L. M.; SILVA, J. M. D.; OLIVEIRA, S. M. A. D. Fosfitos no manejo da antracnose do jiló. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 930-938, 2014.
- ANDRUS, C. F.; MOORE, W. D. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), n. comb., on garden and lima beans. **Phytopathology**, v. 25, p. 121-125, 1935.
- ANTUNES, J. E. L.; GOMES, E. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, p. 751-757, 2011.
- ARFAOUI, A., SIFI, B., BOUDABOUS, A., HADRAMI, I. E., & CHERIF, M. Identification of Rhizobium isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 67-75, 2006.
- BELMINO, C. S. Resistência do feijão-caupi a *Colletotrichum truncatum*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Curso de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 64f. 2004.
- BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M.; FURTADO, E. L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 2, p. 124-128, 2010.
- BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M.; FURTADO, E. L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 168-172, 2010.

BRINK, M.; BELAY, G. **Cereals and pulses**. PROTA, 2006.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

CAMPOS, Â. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M.; M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CARVALHO, E. M. S. Antracnose em feijão-fava: caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum*. Jaboticabal. 2009. (Tese)

DAR, G. H.; ZARGAR, M. Y.; BEIGH, G. M. Biocontrol of Fusarium root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. **Microbial Ecology**, v. 34, n. 1, p. 74-80, 1997.

DEMARTELAERE, A. C. F.; GUIMARÃES, G.; SILVA, J. A.; LUNA, R. G.; NASCIMENTO, L. Extratos vegetais no controle da antracnose e na conservação da qualidade em frutos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1041-1048, 2015.

DO AMORIM, M. R.; SILVA, A. V. C. R.; ANTUNES, J. E. L.; DE SOUZA OLIVEIRA, L. M.; ARAÚJO, A. S. F. Caracterização de rizóbios noduladores de feijão-fava em solos de três estados do nordeste brasileiro. In: **Colloquium Agrariae. ISSN: 1809-8215**. p. 11-20. 2019.

EHTESHAMUL-HAQUE, S.; GHAFAR, A. Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. **Journal of phytopathology**, v. 138, n. 2, p. 157-163, 1993.

ESSALMANI, H.; LAHLOU, H. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, n. 12, p. 1163-1173, 2003.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian journal of microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S. Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on Pythium damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 1, p. 31-37, 2007.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. da. Manual de curadores de germoplasma-microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. Colletotrichum—names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S. F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**, v. 62, n. 1, p. 31-35, 1978.

MAIA, L. D. M.; DEMARTELAERE, A. C. F.; DA SILVA, H. F.; DA SILVA, E. C.; PORCINO, M. M.; DO NASCIMENTO, L. C. *Mangifera indica* postharvest: evaluation of the potential of alternative treatments to control anthracnose. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 53977-53993, 2020.

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da. Manual de práticas em fitobacteriologia.

Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

MAZARO, S. M.; WAGNER JÚNIOR, A.; SANTOS, I. D.; CITADIN, I.; POSSENTI, J. C.; GOUVÊA, A. D. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1424-1430, 2009.

MONTEÓN-OJEDA, A., MORA-AGUILERA, J. A., HERNÁNDEZ-CASTRO, E., SANDOVAL-ISLAS, J. S., AZUARA-DOMÍNGUEZ, A., & DAMIÁN-NAVA, A. Induction of systemic acquired resistance associated with the enzyme activity of phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase, and polyphenoloxidase and its effect on the severity of anthracnose on nursery mango plants. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, p. 1-15, 2022.

OMARA, R. I., KAMEL, S. M., EL-GANAINY, S. M., ARAFA, R. A., MOSTAFA, Y. S., ALAMRI, S. A., ALRUMMAN, S. A., HASHEM, M. & ELSHARKAWY, M. M. Host Resistance to *Uromyces appendiculatus* in Common Bean Genotypes. **Plants**, v. 11, n. 5, p. 628, 2022.

PAMPHILE, J. A., COSTA, A. T., ROSSETO, P., POLONIO, J. C., PEREIRA, J. O., & AZEVEDO, J. L. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Uningá Journal**, v. 53, n. 1, 2017.

PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; VIEIRA, R. F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, v.17, n.182, p.63-71, 1995.

RODRIGUES, A. A. C; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

SANTOS, J. O.; ARAÚJO, A. S.; GOMES, R. L.; LOPES, A. C. A.; FIGUEIREDO, M. V. Rhizobia *Phaseolus lunatus* symbiosis: Importance and diversity and tropical soils-a review. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v. 2, n. 2, p. 56-60, 2008.

SIQUEIRA, I. T. D. D.; CRUZ, L. R.; SOUZA-MOTTA, C. M. D.; MEDEIROS, E. V. D.; MOREIRA, K. A. Indução de resistência por acibenzolar-S-metil em feijão caupi no controle da antracnose. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 76-82, 2019.

SMITH, B. J.; BLACK, L. L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, v. 74, n. 1, p. 69-76, 1990.

SOARES, V. F. Avaliação da resistência à antracnose em etnovarietades de *Phaseolus lunatus* L. Rio Largo. 2019. (Dissertação)

SOUSA, E.S; SILVA, J. R. A; ASSUNÇÃO, I. P; MELO, M. P; FEIJÓ, F. M; MATOS, K. S; LIMA, G. S. A; BESERRA JR, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

SPOLTI, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; CAMPOS, Â. D.; DEL PONTE, E. M. Modo de ação de fosfitos de potássio no controle da podridão olho de boi em maçã. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 1, p. 42-48, 2015.

URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; BONOMI, A. Produção de massa celular de rizóbio. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R.S., eds. Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola. Brasília, Embrapa. p. 95-137. 1994

VAN-LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T. H.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 3, p. 245-264, 1994.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.174, p.30-37, 1992.

VOLPIANO, C. G. *Rhizobium* spp. para o controle biológico do fungo fitopatogênico *Sclerotium* (Athelia) *rolfsii* no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). 2017. (Dissertação)

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WILLEMS, A.; MUNIVE, A.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. In most Bradyrhizobium groups sequence comparison of 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA–DNA hybridizations. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 203–210, 2003.

ZILLI, J. É.; SILVA NETO, M. L. D.; FRANÇA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; MELO, A. R. D. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 739-742, 2011.

APÊNDICE

Tabela 24. Isolados submetidos à análise de DNA neste estudo com número de acessos ao GenBank.

Espécie	Número de acesso à cultura	Número de acesso ao GenBank (ITS)
<i>Fusarium concolor culture</i>	CBS 18334	MH855479.1
<i>Fusarium foetens</i>	CBS 110286	NR_159865.1
<i>Fusarium proliferatum</i>	PP74	FJ884099.1
<i>usarium hostae</i>	NRRL 29888	NR_171109.1
<i>Fusarium anguioides</i>	CBS 17232	MH855263.1
<i>Fusarium thapsinum</i>	DBT 111	HF566402.1
<i>Fusarium fujikuroi</i>	CBS 22176	NR_111889.1
<i>Fusarium nisikadoi</i>	CBS 45697	NR_137623.1
<i>Fusarium inflexum</i>	YZU 201057	MW855849.1
<i>Fusarium nisikadoi</i>	CBS 45697	NR_137623.1
<i>Fusarium beomiforme</i>	CBS 100160	MH862691.1
<i>Fusarium burgessii</i>	CBS 125537	MH863590.1
<i>Fusarium babinda</i>	CBS 39796	NR_159861.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	G6	ON310827.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	QC20091622	MZ668437.1
<i>Fusarium solani</i>	NRRL 32810	DQ094577.1
<i>Fusarium solani</i>	CBS 135789	KR071699.1
<i>Fusarium sacchari</i>	NRRL 13999	NR_174875.1
<i>Fusarium fabacearum</i>	NFCCI 5200	ON003544.1
<i>Fusarium duoseptatum</i>	NFCCI 681	ON003538.1
<i>Fusarium lacertarum</i>	NFCCI 3038	ON003535.1
<i>Fusarium langsethiae</i>	CBS 113234	NR_121214.1

Tabela 25. Isolados submetidos à análise de DNA neste estudo com número de acessos ao GenBank.

Espécie	Número de acesso à cultura	Número de acesso ao GenBank (RPB2)
<i>Fusarium solani</i>	CIB 8	LN828067.1
<i>Fusarium solani</i>	LEMM 110148	LN828050.1
<i>Fusarium falciforme</i>	R2R(A)	MK752447.1
<i>Fusarium falciforme</i>	AVRP-18	MK968890.1
<i>Fusarium virguliforme</i>	HQ-8	MZ997368.1
<i>Fusarium virguliforme</i>	HQ-8-1	MZ997369.1
<i>usarium phaseoli</i>	CBS 265.50	KM232375.1
<i>Fusarium ambrosium</i>	CBS 571.94	KM232368.1
<i>Fusarium lunatum</i>	CMM1293	KY549628.1

Tabela 26. Isolados submetidos à análise de DNA neste estudo com número de acessos ao GenBank.

Espécie	Número de acesso à cultura	Número de acesso ao GenBank (RPB2)
<i>Fusarium contaminatum</i>	CBS 111552	MH484900.1
<i>Fusarium contaminatum</i>	CBS 114899	MH484901.1
<i>Fusarium pharetrum</i>	CPC 30822	MH484951.1
<i>Fusarium veterinarianum</i>	CBS 109898	MH484899.1
<i>Fusarium veterinarianum</i>	CBS 117787	MH484912.1
<i>Fusarium curvatum</i>	CBS 141 95	MH484894.1
<i>Fusarium curvatum</i>	CBS 238 94	MH484893.1
<i>Fusarium nirenbergiae</i>	CBS 115416	MH484902.1
<i>Fusarium nirenbergiae</i>	CBS 115417	MH484903.1
<i>Fusarium triseptatum</i>	CBS 116619	MH484910.1
<i>Fusarium triseptatum</i>	CBS 119665	MH484916.1
<i>Fusarium triseptatum</i>	CBS 130302	MH484924.1
<i>Fusarium triseptatum</i>	CBS 258 50	MH484873.1
<i>Fusarium languescens</i>	CBS 119796	MH484917.1
<i>Fusarium languescens</i>	CBS 300 91	MH484891.1
<i>Fusarium pharetrum</i>	CPC 30824	MH484952.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	CBS 144135	MH484954.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	CBS 144134	MH484953.1
<i>Fusarium hoodiae</i>	CBS 132474	MH484929.1
<i>Fusarium hoodiae</i>	CBS 132476	MH484930.1
<i>Fusarium libertatis</i>	CPC 25782	MH484932.1
<i>Fusarium libertatis</i>	CPC 25788	MH484933.1
<i>Fusarium odoratissimum</i>	CBS 102030	MH484898.1
<i>Fusarium odoratissimum</i>	CBS 130310	MH484922.1
<i>Fusarium caminascens</i>	CPC 25792	MH484934.1
<i>Fusarium caminascens</i>	CPC 25793	MH484935.1
<i>Fusarium duoseptatum</i>	CBS 102026	MH484896.1
<i>Fusarium fabacearum</i>	CPC 25801	MH484938.1
<i>Fusarium fabacearum</i>	CPC 25802	MH484938.1
<i>Fusarium glycines</i>	CBS 176 33	MH484868.1
<i>Fusarium glycines</i>	CBS 200 89	MH484888.1
<i>Fusarium gossypinum</i>	CBS 116611	MH484907.1
<i>Fusarium gossypinum</i>	CBS 116612	MH484908.1
<i>Fusarium tardichlamyosporum</i>	CBS 102028	MH484897.1
<i>Fusarium callistephi</i>	CBS 115423	MH484905.1
<i>Fusarium callistephi</i>	CBS 187 53	MH484875.1
<i>Fusarium elaeidis</i>	CBS 217 49	MH484870.1
<i>Fusarium elaeidis</i>	CBS 218 49	MH484871.1
<i>Fusarium cugenangense</i>	CBS 130304	MH484921.1
<i>Fusarium</i> sp.	CBS 130323	MH484927.1
<i>Fusarium cugenangense</i>	CBS 130308	MH484920.1

<i>Fusarium</i> sp.	CBS 128 81	MH484884.1
<i>Fusarium udum</i>	CBS 177 31	MH484866.1

Tabela 27. Isolados submetidos à análise de DNA neste estudo com número de acessos ao GenBank.

Espécie	Número de acesso à cultura	Número de acesso ao GenBank (16S)
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	PAC68	AY624134.1
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	-	U35000.3
<i>Bradyrhizobium pachyrrhizi</i>	PAC48	AY624135.1
<i>Bradyrhizobium betae</i>	-	AY372184.1
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	BTA-1	AJ558025.1
<i>Bradyrhizobium lablabi</i>	CCBAU 23086	GU433448.1
<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	CTAW11	EU561065.2
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	-	AB300992.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-	U69638.3
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	USDA 3622	AF208513.1
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	B071	AF193818.1
<i>Rhizobium pusense</i>	NRCPB10	FJ969841.2
<i>Rhizobium huautlense</i>	-	AF025852.1
<i>Rhizobium miluonense</i>	CCBAU 41251	EF061096.1
<i>Rhizobium multihospitium</i>	CCBAU 83401	EF035074.2
<i>Rhizobium pisi</i>	DSM 30132	AY509899.1
<i>Rhizobium etli</i>	CFN 42	U28916.1
<i>Rhizobium pusense</i>	WTB176	MK734334.1
<i>Burkholderia caribensis</i>	MWAP64	Y17009.1