

FELIPE MAURICIO DE QUADROS

**ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS COM
ÊNFASE NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DURANTE A
INTERAÇÃO DO FELJOEIRO COM *Fusarium oxysporum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração de Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik

Florianópolis, 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Quadros, Felipe Mauricio

Análises morfofisiológicas e bioquímicas com ênfase na peroxidação lipídica durante a interação do feijoeiro com *Fusarium oxysporum* / Felipe Mauricio de Quadros ; orientador, Marciel João Stadnik Stadnik, 2019.

97 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Recursos Genéticos Vegetais. 3. Fitopatologia. 4. Interação planta-patógeno. 5. Resistência Genética. I. Stadnik, Marciel João Stadnik. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

**Análises morfofisiológicas e bioquímicas com ênfase
na peroxidação lipídica durante a interação do feijoeiro
com *Fusarium oxysporum***

por

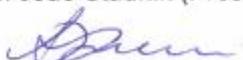
Felipe Mauricio de Quadros

Dissertação julgada e aprovada em 26/02/2019, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

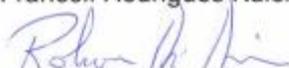
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Marciel João Stadnik (Presidente/Orientador)



Prof.ª. Dr.ª. Franceli Rodrigues Kulcheski (Externo - CCB/UFSC)



Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (Interno - CCA/UFSC)



Prof.ª. Dr.ª. Ana Carolina Maisonnave Arisi (Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Recursos Genéticos Vegetais/CCA/UFSC
Florianópolis 23/03/2019/GR

Florianópolis, fevereiro de 2019

*Aos meus queridos pais, Mauricio e Angela
pelo apoio em todos os momentos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Marciel J. Stadnik por toda a sua confiança e ensinamentos que serão levados comigo por toda a vida.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia (LABFitop-UFSC), especialmente, Mateus B. de Freitas e Marlon C. de Borba pelo apoio e parceria durante a realização do trabalho.

Um carinho especial a equipe do laboratório multiusuário de estudos em biologia (LAMEB-UFSC), especialmente a técnica Dr. Chirle Ferreira que sempre esteve ao meu lado apoiando e auxiliando nas análises microscópicas.

Também especial aos integrantes do laboratório de biologia celular vegetal (LABCEV-UFSC), em especial a Dr. Carmen Simione por permitir a utilização dos equipamentos do laboratório, assim como ter me auxiliado a realizar parte deste trabalho.

Ao professor Jorge Barcellos por ter cedido um espaço no laboratório de hidroponia (LABHIDRO-UFSC) para que eu pudesse cultivar as plantas para realizar este trabalho.

Ao professor Rubens O. Nodari, por permitir a utilização dos equipamentos do laboratório do desenvolvimento e genética vegetal (LFDG-UFSC).

Aos integrantes do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME).

Aos membros da banca examinadora por aceitarem ler meu trabalho e contribuir com suas críticas e sugestões.

Aos meus pais pela força e torcida

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

*“Não há comparação entre o que se perde
por fracassar e o que se perde por não tentar”*

Francis Bacon

RESUMO

O processo de colonização do patógeno necrotróficos *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), causador da murcha de Fusarium (MF) no feijoeiro, pode resultar na liberação de ácidos graxos. Durante a resposta de estresse, estes ácidos graxos tendem a ser peroxidados pela lipoxigenase ou espécies reativas de oxigênio dando origem a metabólitos envolvidos na defesa hospedeira. Assim, este trabalho teve como objetivo examinar a peroxidação lipídica em distintas fases de colonização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, assim como determinar o envolvimento da lipoxigenase na resistência do feijoeiro. Para isso, plântulas de feijão dos genótipos UFSC-01 (resistente) e Uirapuru (suscetível) foram inoculados com uma suspensão conidial de *Fop*. A histologia da colonização do patógeno foi determinada aos 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação (*dai*). Também foram realizadas análises ultraestruturas aos 9 *dai*. Os ensaios bioquímicos referente à peroxidação lipídica (conteúdo de hidroperóxido de lipídios e malonaldeído), conteúdo de dienos e trienos conjugados, nível de H₂O₂ e atividade da ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e lipoxigenase (LOX) foram determinados espectrofotometricamente aos 0, 1, 3, 6 e 9 *dai*. A detecção da LOX por imunofluorescência foi determinada aos 3 e 9 *dai*. Foram amostradas as raízes e no hipocótilo para realizar todas as análises. *Fop* colonizou inter- e intracelular a epiderme e o córtex de ambos os genótipos e alcançou os vasos do xilema mais cedo em plantas suscetíveis. O acúmulo de compostos inter- e intracelulares no córtex e endoderme da raiz de plantas resistentes parece ter atrasado a colonização do patógeno. Abundantes hifas do patógeno foram encontradas próximos aos plasmodesmas de células xilemáticas da raiz de plantas suscetíveis. Em contrapartida, nestas regiões foi observado a formação de aposições elétron-densas da parede celular em plantas resistentes. Com relação à peroxidação lipídica, dois picos foram observados: o primeiro a 1 *dai*, caracterizado como uma resposta independente do genótipo; e outro aos 9 *dai* que foi específico de plantas suscetíveis e parece estar associado a destruição celular. O metabolismo oxidativo foi mais intenso em plantas resistentes, com um gradual aumento de H₂O₂ ao longo do tempo nas raízes, enquanto no hipocótilo a partir dos 3 *dai*, ou seja, antes do fungo alcançar este tecido. A atividade da LOX e o conteúdo dos conjugados foram maiores em plantas resistentes. Nas raízes, a indução da LOX ocorreu principalmente na endoderme, enquanto no hipocótilo epítomos

da enzima foram localizados nos espaços inter- e intracelulares do xilema. Estes resultados demonstram que a lipoxigenase participa ativamente na resistência do feijoeiro a *Fop*.

Palavras chaves: *Phaseolus vulgaris*; *Oxilipinas*; *Imunofluorescencia*; *Histopatologia da colonização*.

ABSTRACT

The colonization process of necrotrophic pathogen *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (*Fop*), causal agent of Fusarium wilt (MF) in common bean, can lead to the release of fatty acids. During stress response, these fatty acids can be peroxidized by lipoxygenase or reactive oxygen species originating metabolites involved in host' defense. Thus, the present work aimed to examine lipid peroxidation during the colonization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), as well as to determine the involvement of lipoxygenase in the resistance of common bean. For this, bean plants of UFSC-01 (resistant) and Uirapuru (susceptible) genotypes were inoculated with conidial suspension of *Fop*. Histology of pathogen colonization was determined at 1, 3, 6 and 9 days after inoculation (*dai*). Ultrastructural observations were realized at 9 *dai*. In biochemical assays, lipid peroxidation (content of lipid hydroperoxide and monoaldehyde), H₂O₂ and conjugated diene and triene, and activity of ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and lipoxygenase (LOX) were monitored spectrophotometrically at 0, 1, 3, 6 e 9 *dai*. LOX immunofluorescence was detected at 3 and 9 *dai*. *Fop* colonized inter- and intracellularly the epidermis and cortex in both genotypes, and reached xylem xylem vessels earlier in susceptible plants. Compounds accumulation in cortex and endoderm of resistant roots seems delay the pathogen progression. Abundant hyphae were observed near to plasmodesms in xylem cells of susceptible roots. In contrast, electron-dense cell wall appositions were observed in these areas of resistant roots. Regarding lipid peroxidation, two peaks were observed: the first one at 1 *dai*, characterized as a response independent of the genotype; and another one at 9 *dai* that was specific to susceptible plants and seems to be associated to cell destruction. Oxidative metabolism was more intense in inoculated resistant plants, where H₂O₂ levels gradually increased over time in roots, while from the 3 *dai* in hypocotyl, i.e., before *Fop* reached aerial tissue. Both LOX and its conjugate content were higher in resistant plants. In roots, LOX induction occurred mainly near to endodermis, while in hypocotyl, enzyme epitopes were in inter- and intracellular spaces of xylem. These results demonstrate that lipoxygenase actively participates in bean resistance to *Fop*.

Keyword: *Phaseolus vulgaris*; *Oxylipins*; *Immunofluorescence*; *Histopathology of colonization*.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).** Fonte: (ethnopharmacologia)..... 4
- Fig. 2 Sintomas da murcha de *Fusarium* no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*).** (A) Planta com sintoma de murcha, (B) planta morta, (C) necrose vascular do xilema e (D) nanismo..... 5
- Fig. 3 Esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** (A) Microconídios; (B) Macroconídios; (C) Macroconídio em fíalide curta (indicado pela seta); (D) Clamidósporos (indicado pela seta). Ampliação: 1000x (Foto: Marlon Borba). 6
- Fig. 4 Ciclo infeccioso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.**..... 8
- Fig. 5 Via da lipoxigenase (biossíntese de Oxilipinas).** AG, ácidos graxos; LOX, lipoxigenase; AOS, aleno oxido sintase; HPL hidroperóxido liase; DES, divinil éter sintase; EAS, álcool epoxi sintase; 1) ácido linolênico; 2) ácido linoleico; 3) ácido 13-hidroperóxido linolênico; 4) ácido 9-hidroperóxido linolênico; 5) ácido 13-hidroperóxido linoleico; 6) ácido 9-hidroperóxido linoleico; 7) ácido 12-oxo-fitodinoico; 8) ácido jasmônico; 9) 3-hexanal; 10) 3-hexanol; 11) 2-hexanal; 12) traumatina; 13) ácido traumático; 14) ácido colnelico; 15) ácido colnelenico. Fonte: Savchenko et al. (2013)..... 11
- Fig. 6 Comparação dos sintomas externos da murcha de *Fusarium* entre plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 25 dias após a inoculação.** (A) Severidade e incidência da doença; (B) Altura de planta; (C) Sintomas externos da doença. ** indica diferença significativa entre os genótipos (teste t de Student, $P \leq 0.01$). Letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Tukey, $P \leq 0.05$). Barras de erro correspondem o desvio padrão da média (n=6)..... 23
- Fig. 7 Comparação dos sintomas internos da murcha de *Fusarium* entre plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 25 dias após a inoculação.** (A) Necrose vascular do hipocótilo; (B) Sintomas internos da murcha de *Fusarium*. ** indica diferença significativa entre os genótipos (teste t de

Student, $P \leq 0.01$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6). Barra de escala: 2 cm.24

Fig. 8 Estágios iniciais da colonização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) em tecidos da raiz de plantas de feijão suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) ao 1 dia após a inoculação. Secções de 6 µm foram marcadas com azul de toluidina. (A) Conídios e hifas de *Fop* nos espaços intercelulares do córtex. Observa-se grandes quantidades de micélio, conídios e clamidósporos nas lacunas do aerênquima; (B) Hifas de *Fop* colonizando células da epiderme; (C) *Fop* no interior de células do córtex; (D) Acumulação de compostos e hifas em zonas próximas a endoderme de raízes resistentes. Ar: Lacunas do aerênquima; Cx: córtex; Ed: endoderme; Ep: epiderme; SV: sistema vascular. Setas indicam *Fop*. Barras de escalas: 20µm.....25

Fig. 9 Histopatologia da colonização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) em tecidos da raiz de plantas de feijão suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 3 dias após a inoculação. Secções de 6 µm foram marcadas com azul de toluidina. (A) *Fop* no interior do sistema vascular da raiz de plantas suscetíveis; (B) Acúmulo de substâncias em células do córtex e endoderme da raiz UFSC-01; (C) Colonização intracelular do córtex da raiz do cv. Uirapuru; (D) Acúmulo de substâncias antimicrobianas nos espaços intercelulares do córtex da raiz UFSC-01. Ar: lacunas do aerênquima; Cx: córtex; Ed: endoderme; Ep: epiderme; SV: sistema vascular; Xv: vasos do xilema. Setas indicam *Fop*. Barras de escalas: 20µm26

Fig. 10 Estágios avançados da colonização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em plantas de feijão suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 6 (A, B) e 9 (C-F) dias após a inoculação (DAI). Secções de 6 µm foram marcadas com azul de toluidina. (A) Conídios e hifa no interior do vaso do xilema do hipocótilo de plantas suscetíveis; (B) Hifas e material de oclusão no sistema vascular da raiz de plantas resistentes; (C) Conídios, hifas e material de oclusão no interior do sistema vascular das raízes do cv. Uirapuru; (D) Hifas e material de oclusão no sistema vascular de raízes de UFSC-01; (E) Conídios e hifas no interior dos vasos do hipocótilo do cv. Uirapuru; (F) Hifa no interior dos vasos do xilema do hipocótilo de UFSC-01. Mo: material de oclusão; SV: sistema vascular; Xv: vasos do xilema. Setas indicam *Fop*. Barras de escalas: 20µm.....27

Fig. 11 Ultraestrutura da raiz e no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). (A) Fop (F) no citoplasma da célula parenquimática do xilema de raízes do cv. Uirapuru. Observe a aposição da parede celular (asterisco) e a degradação da parede celular primária (seta preta); (B) Aposição da parede celular eletron-densa (asterisco) em células parenquimáticas do xilema de raízes UFSC-01 inoculadas; (C) Estrutura com membranas concêntricas ligado a um corpo multivesicular próximo a Fop em células de raízes do cv Uirapuru; (D) Microvacúolos próximos à aposição da parede celular em células de raízes UFSC-01 inoculadas; (E) Material de oclusão no interior do vaso do xilema no hipocótilo de plantas suscetíveis inoculadas. (F) Corpo multivesicular e vesícula junto à aposição da parede celular e parede celular secundária do hipocótilo de plantas resistentes inoculadas. (G) Hifa adjunto à parede celular da célula parenquimática do xilema em hipocótilos do cv. Uirapuru; (H) Vesículas e mitocôndrias em células parenquimáticas ligadas ao vaso do xilema de hipocótilos de plantas resistentes inoculadas. Observe o acúmulo de mitocôndrias e microvacúolos próximos a aposição da parede celular. Ap. amiloplasto; ER. retículo endoplasmático; M. mitocôndria; ML lisossomo multilaminar; Mv, microvacuole; MVB. corpo multivesicular; O. corpo osmofílico; Om material de oclusão; Pw. parede celular primária; Sw. parede celular secundária; Xv. vaso do xilema. 29

Fig. 12 Alterações no conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na raiz (A) e no hipocótilo (B) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, P ≤ 0.05). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6). 31

Fig. 13 Conteúdo de hidroperóxido de lipídios (A, B) e malonaldeído (C, D) na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, P ≤ 0.05). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6). 32

Fig. 14 Conteúdo de dienos (A, B) e trienos (C, D) conjugados na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, $P \leq 0.05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6).33

Fig. 15 Atividade da ascorbato peroxidase (A, B) e catalase (C, D) na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, $P \leq 0.05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6).35

Fig. 16 Atividade da lipoxigenase-ácido linoleico (A, B) e lipoxigenase-ácido linolênico (C, D) na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, $P \leq 0.05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6).36

Fig. 17 Imunolocalização de epítomos da lipoxigenase na raiz (A-H) e no hipocótilo (I-L) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 3 (A-D) e 9 (E-L) dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). Cx: córtex; Ed: endoderme; Fb: fibras; Xv: vasos do xilema. Barra de escala: 20 μ m.37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise comparativa da imunofluorescência de epítomos da lipoxigenase entre plantas não-inoculada e inoculadas dos genótipos Uirapuru e UFSC-01 aos 3 e 9 dias após a inoculação (dai) com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>.	37
--	----

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1** Ultraestrutura da raiz (A, B) e do hipocótilo (C, D) de plantas suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) não inoculadas aos 9 dias após o tratamento com água. Ap. amiloplasto; M. mitocôndria; Mv, microvacuole; n. núcleo; O. corpo osmofílico; Pw. parede celular primária; Sw. parede celular secundária; Xv. vaso do xilema; Asterisco. Aposição à parede celular. 50
- Anexo 2** Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da severidade da doença, altura de planta e percentagem de necrose vascular de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. 51
- Anexo 3** Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de peróxido de hidrogênio na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. 52
- Anexo 4** Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de peróxido de hidrogênio no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. 53
- Anexo 5** Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de hidroperóxido de lipídios na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. 54
- Anexo 6** Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de hidroperóxido de lipídios no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. 55
- Anexo 7** Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de malonaldeído na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. 56

Anexo 8 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de malonaldeído no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	57
Anexo 9 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de dienos conjugado na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	58
Anexo 10 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de dienos conjugado no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	59
Anexo 11 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de trienos conjugado na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	60
Anexo 12 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de trienos conjugado no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	61
Anexo 13 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de ascorbato peroxidase na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	62
Anexo 14 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de ascorbato peroxidase no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	63
Anexo 15 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de catalase na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	64

Anexo 16 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de catalase no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	65
Anexo 17 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de lipoxigenase (ácido linolênico) na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	66
Anexo 18 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de lipoxigenase (ácido linolênico) no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	67
Anexo 19 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de lipoxigenase (ácido linoleico) na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	68
Anexo 20 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de lipoxigenase (ácido linoleico) no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS

- AOS**- Aleno óxido sintase
APX- Ascorbato peroxidase
BHT- Hidroxitolueno butilado (*butylated hydroxytoluene*)
ASB- Albumina de soro bovino
CAT- Catalase
CIAT- Centro internacional de agricultura tropical
dai- Dias após a inoculação
DC- Dienos conjugados
AG- Ácido graxo
Fop- *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*
HPL- Hidroperóxido liase
HPUAG- Hidroperóxido de ácidos graxos
AJ- Ácido Jasmônico
AL- Ácido linoleico
ALe- Ácido linolênico
LHPO- Hidroperóxido de lipídios
LOX- Lipoxigenase
MDA- Malonaldeído
MET- Microscopia eletrônica de transmissão
MF- Murcha de Fusarium
PAMPs- Padrões associados ao patógeno (*Pathogen-associated molecular pattern*)
PBS- Tampão fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)
mf- massa fresca
AGPU- Ácido graxo poliinsaturado
ERO- Espécies reativas de oxigênio
AS- Ácido salicílico
ATB- Ácido tiobarbitúrico
ATC- Ácido tricloroacético
TC- Trienos conjugados
TFF- Trifenilfosfina
AES - Álcool epoxi sintase
DES - Difenil éter sintase
m/v – massa/volume

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ANEXOS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxiii
1-INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2-OBJETIVOS	2
2.1-OBJETIVO GERAL	2
2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. ASPECTOS GERAIS DO FEIJOEIRO COMUM.	3
3.2. MURCHA DE FUSARIUM	4
3.3. CARACTERÍSTICAS DO FUNGO	6
3.4. INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO VASCULAR POR <i>Fusarium oxysporum</i>	7
3.5. RESISTÊNCIA GENÉTICA	7
3.6. FITO-OXILIPINAS: UMA CLASSE DE METABÓLITOS PROVENIENTE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	9
3.6.1. Biossíntese	10
3.6.2. Defesa contra fitopatógenos.....	12
3.7. ENZIMAS ANTIOXIDANTES: ASCORBATO PEROXIDASE E CATALASE	15
3.7.1 Características gerais	15
3.7.2. Sistema antioxidante na interação planta-patógeno	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	16
4.2. OBTENÇÃO DAS PLÂNTULAS.....	16
4.3. INOCULAÇÃO	17
4.4. AMOSTRAGEM	17
4.5. AVALIAÇÃO DA DOENÇA E DETERMINAÇÃO DA ALTURA DE PLANTA	18
4.6. ANÁLISES MICROSCÓPICAS	18
4.6.1. Microscopia de Luz.....	18
4.6.2. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	18
4.7. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E MALONALDEÍDO	19

4.7.1. Extração	19
4.7.2. Peróxido de hidrogênio	19
4.7.3. Malonaldeído	19
4.8. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DIENOS E TRIENOS CONJUGADOS E HIDROPERÓXIDO DE LIPÍDIOS	20
4.8.1. Extração	20
4.8.2. Dienos e trienos conjugados	20
4.8.3. Hidroperóxidos de lipídios	20
4.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	21
4.9.1. Extração	21
4.9.2. Ascorbato peroxidase	21
4.9.3. Catalase	21
4.9.4. Lipoxigenase	21
4.9.5. Proteínas totais	22
4.10. DETECÇÃO DE LOX POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	22
4.11. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5. RESULTADOS	23
5.1. AVALIAÇÃO DA DOENÇA	23
5.2. ANÁLISES MICROSCÓPICAS	24
5.2.1. Histopatologia da colonização de <i>Fop</i>	24
5.2.2. Microscopia eletrônica de transmissão	28
5.3. CONTEÚDO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	30
5.4. CONTEÚDO DE HIDROPERÓXIDO DE LIPÍDIOS E MALONALDEÍDO	30
5.5. CONTEÚDO DE DIENOS E TRIENOS CONJUGADOS	32
5.6. ENZIMAS ANTIOXIDANTE	33
5.7. LIPOXIGENASE	34
5.7.1. Atividade enzimática	34
5.7.2. Detecção da LOX por imunofluorescência	36
6. DISCUSSÃO	37
7. REFERÊNCIAS	42
8. ANEXOS	50

1-INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma das principais fontes proteicas de alimentos dos povos latino-americanos, caribenhos e africanos. O Brasil se destaca por ser o terceiro maior produtor de feijão, atrás apenas da Índia e Myamar (FAO, 2016). Apesar disso, a produtividade do feijoeiro no Brasil ainda é considerada baixa, quando comparado a outros países de primeiro mundo como a Irlanda (FAO, 2016). Um dos principais entraves no aumento da produtividade está relacionado à incidência de doenças, dentre as quais, tem se destacado nos últimos anos a murcha de Fusarium (MF; Wordell Filho et al., 2013).

A murcha de Fusarium é ocasionada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder (*Fop*), causando perdas de até 80% na produção. A doença ocorre principalmente em campos de cultivo, onde há o predomínio de monocultivos extensivos, utilizando pivôs centrais (Wordell Filho et al., 2013). Por ser uma doença altamente agressiva em materiais suscetíveis (de Borba et al., 2017), o uso de genótipos resistentes se torna a principal forma de controle. Apesar disso, atualmente existem poucos materiais tolerantes ou resistentes a MF (Buruchara; Camacho, 2000; de Borba et al., 2017).

Existem diversos mecanismos de defesa envolvidos na resistência genética. O reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro é fundamental para a ativação destes mecanismos (Agrios, 2005). Inúmeros trabalhos estudam a interação de patógenos com plantas modelos como arábido, tomate e arroz (Akram et al., 2008; Christensen; Kolomiets, 2011; Scala et al., 2013; Nair et al., 2015). Nestes hospedeiros, uma série de mecanismos de defesa têm sido elucidados com ênfase na parte morfológica, fisiológica, bioquímica e molecular. Entretanto, outras culturas como o feijão comum são menos estudadas, principalmente quando se trata da interação com patógenos vasculares como *Fop*.

O processo de colonização por patógenos necrotróficos tende a ocasionar danos aos tecidos hospedeiros. Isto porque, estes patógenos são aptos a secretar enzimas hidrolíticas que degradam a célula vegetal para a obtenção de seus nutrientes (Yadeta; Thomma, 2013). Este processo de degradação celular pode levar à peroxidação lipídica dos ácidos graxos (Garcia-Limones et al., 2002; Mandal et al., 2008). A peroxidação lipídica pode ser proveniente da oxidação dos ácidos graxos por espécies reativas de oxigênio (ERO), ou pela lipoxigenase (LOX; Mosblech et al., 2009). No primeiro caso, o acúmulo de ERO e a alta taxa de peroxidação lipídica

tende ocasionar à morte celular (Mueller; Berger, 2009). No segundo caso, a indução da lipoxigenase pode resultar na síntese das oxilipinas, uma classe de metabólitos com capacidade antimicrobiana e de sinalização (Göbel; Feussner, 2009).

Em um trabalho recente, *Fop* induziu o aumento da atividade da LOX e acúmulo de ERO em raízes de feijão resistentes (de Quadros et al., 2019). Entretanto, naquele estudo, a indução da enzima foi associada apenas como uma possível fonte de ERO durante a interação feijoeiro-*Fop*. Além do mais, embora o processo de colonização de *Fop* vem sendo bem estudado (Niño-Sanchez et al., 2015; Pereira et al., 2015; Garcés-Fiallos et al., 2017), pouco se sabe sobre seu impacto no metabolismo lipídico em plantas de feijão. Assim, o objetivo deste trabalho foi examinar com mais detalhes a peroxidação lipídica nas distintas fases da colonização de *Fop*, assim como determinar o envolvimento da lipoxigenase na resistência do feijoeiro.

2-OBJETIVOS

2.1-OBJETIVO GERAL

Examinar a peroxidação lipídica nas distintas fases da colonização de *Fop*, assim como determinar o envolvimento da lipoxigenase na resistência do feijoeiro.

2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a taxa de peroxidação lipídica das membranas e associar com a colonização de *Fop* na raiz e no hipocótilo de plantas resistentes e suscetíveis;
- Medir a atividade da lipoxigenase (LOX) e das enzimas antioxidante ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT);
- Determinar o conteúdo de peróxido de hidrogênio e dos dienos e trienos conjugados.
- Detectar a localização da LOX na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão resistentes e suscetíveis a *Fop*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ASPECTOS GERAIS DO FEIJOEIRO COMUM.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta anual originária das Américas. Ele é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae e gênero *Phaseolus*, do qual compreende mais de 200 espécies tropicais e subtropicais. As espécies mais cultivadas são: o feijão comum (*P. vulgaris* L.), o feijão de lima (*P. lunatus* L.), o feijão ayocote (*P. coccineus* L.), o feijão tepari (*P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman) e *P. polyanthus* Greenman (Santos; Gavinales, 2006).

O feijoeiro (Fig. 1) é uma planta autógama diplóide ($2n: 22$ cromossomos) com ciclo que varia de 60-120 dias. É uma planta herbácea, cujo sistema radicular pivotante atinge 20 cm de profundidade (Moreira, 2014). Suas folhas são pecioladas, trifolioladas, alternas, exceto as primeiras que são simples e opostas. Nas folhas trifolioladas, os folíolos são acuminados, onde o central ou terminal é simétrico, enquanto os laterais são assimétricos (Leon, 1968). A inflorescência é axilar, cujo fruto é um legume, popularmente denominado como vagem (Silva, 2011).

Existem dois hábitos de crescimento para o feijoeiro: determinado e indeterminado. O hábito de crescimento determinado caracteriza-se por ter o caule e os ramos laterais terminados em uma inflorescência (inflorescência terminal) e possuir um número limitado de nós; a floração inicia-se do ápice para a base da planta (Rocha, 2017; Silva 2017). Por outro lado, o hábito indeterminado caracteriza-se por possuir no caule principal um tecido embrionário (meristema) que permite um crescimento contínuo; as inflorescências desenvolvem-se nas axilas das folhas, isto é, a partir do ponto de inserção de uma folha ou ramo na haste principal ou secundária de uma planta (inflorescência axilar) e a floração inicia-se da base para o ápice da planta (Rocha, 2017; Silva 2017).

O feijão comum é a principal fonte proteica de alimento da América Latina (Singh, 1992). O feijão quando comparado à proteína de origem animal, apresenta menor custo, contribuindo com uma média de 20% das necessidades proteicas do ser humano por dia (Moreira, 2014). O Brasil está entre os três maiores produtores mundiais de feijão, junto com a Índia e Myanmar (FAO, 2016). No país, a região sul é a principal produtora de feijão, contribuindo com mais de 33,7% da produção (IBGE, 2015). Apesar disso, a produtividade da cultura no país é baixa (1.021 kg/ha) em relação a países como Irlanda (5.170kg/ha) e Barbados (6.363

kg/ha) (FAO, 2016). Esta baixa produtividade do feijoeiro se deve a fatores como a falta de tecnologia no campo, as alterações climáticas e a incidência de pragas e doenças.

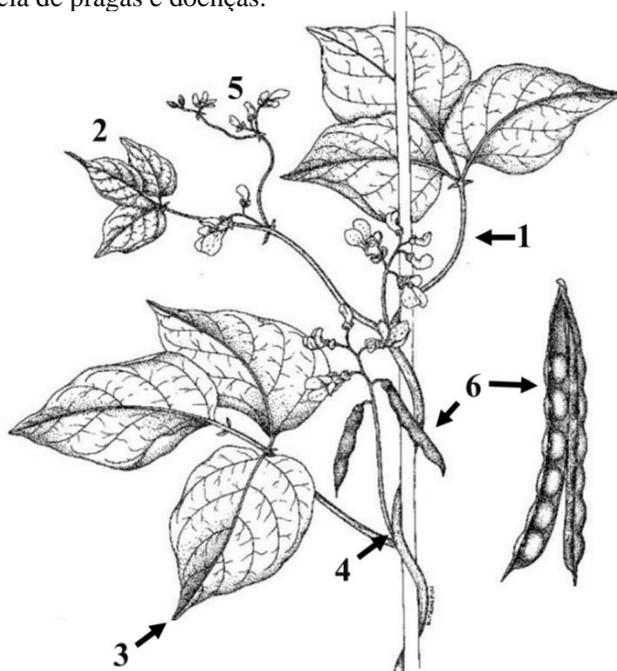


Fig. 1 Feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). 1. Pecíolo; 2. Folha trifoliolada; 3. Folha acuminada; 4. Inflorescência axilar; 5. Inflorescência do feijoeiro; 6. Fruto do feijoeiro (legume). Adaptado de Ethnopharmacologia, (2019).

3.2. MURCHA DE FUSARIUM

O amarelecimento ou murcha de Fusarium (MF) é ocasionado pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder (*Fop*), sendo uma das principais doenças na cultura do feijoeiro, por ter capacidade de reduzir drasticamente a produtividade da lavoura (Wordell Filho et al. 2013). Esta doença ocorre principalmente em locais de clima quente e seco, onde ocorre o predomínio de monocultivos de feijão (Buruchara; Camacho, 2000; Wordell Filho et al. 2013). Os principais sintomas da MF (Fig. 2) incluem a clorose foliar, desfolhação prematura,

necrose vascular, nanismo e murcha (Abawi; Pastor-Corrales, 1987; Garcés-Fiallos et al., 2017).

Fop foi descrito pela primeira vez por Harter em 1929 (Aloj et al., 1987) na Califórnia, EUA. Atualmente, o agente patogênico vem causando a doença em praticamente todas as regiões produtoras de feijão no mundo, sendo um sério problema na América Latina, África e noroeste dos Estados Unidos (Buruchara; Camacho, 2000; Xue et al., 2015). No Brasil, a MF foi descrita pela primeira vez por Cardoso et al. (1966), causando perdas em cultivos de feijão no estado de São Paulo. Atualmente, a doença está disseminada por todos os campos de cultivo do país.

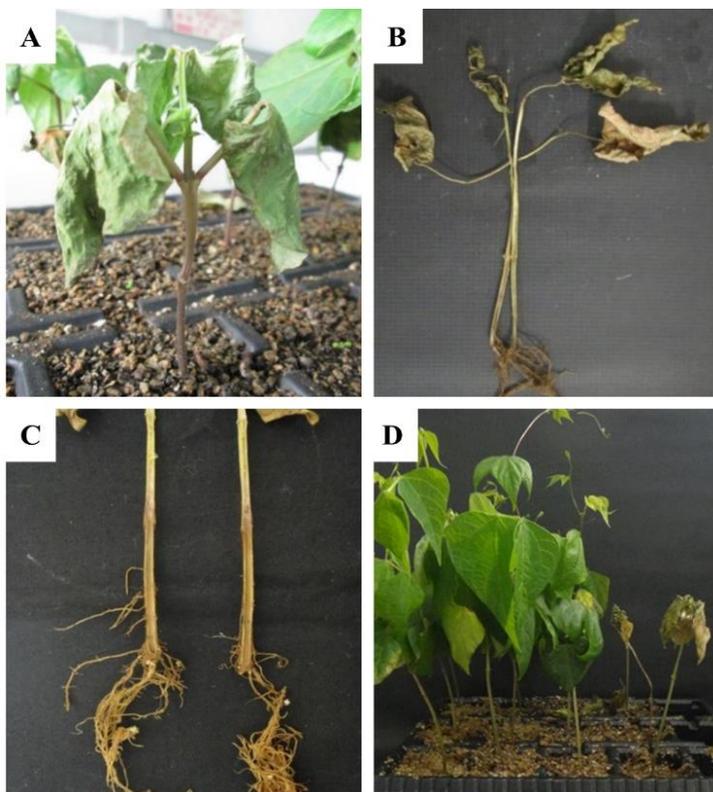


Fig. 2 Sintomas da Murcha de *Fusarium* no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). (A) Planta com sintoma de murcha, (B) planta morta, (C) necrose vascular do xilema e (D) nanismo.

3.3. CARACTERÍSTICAS DO FUNGO

Fop produz macroconídios em fiálide curtas, situadas diretamente nas hifas ou ramos finais dos conidióforos (Fig. 3C). Os macroconídios são fusiformes com extremidades pontiagudas, ligeiramente curvadas, parede delgada e presença de dois a cinco septos, medindo 3 a 6 x 25 a 30 μ m (Fig. 3B). Esse fungo também produz abundantemente microconídios elípticos (Fig. 3A) e clamidósporos (Fig. 3D), que podem ser intercalares ou terminais, medindo 2 a 4 x 6 a 15 μ m (Bianchini et al., 2005).

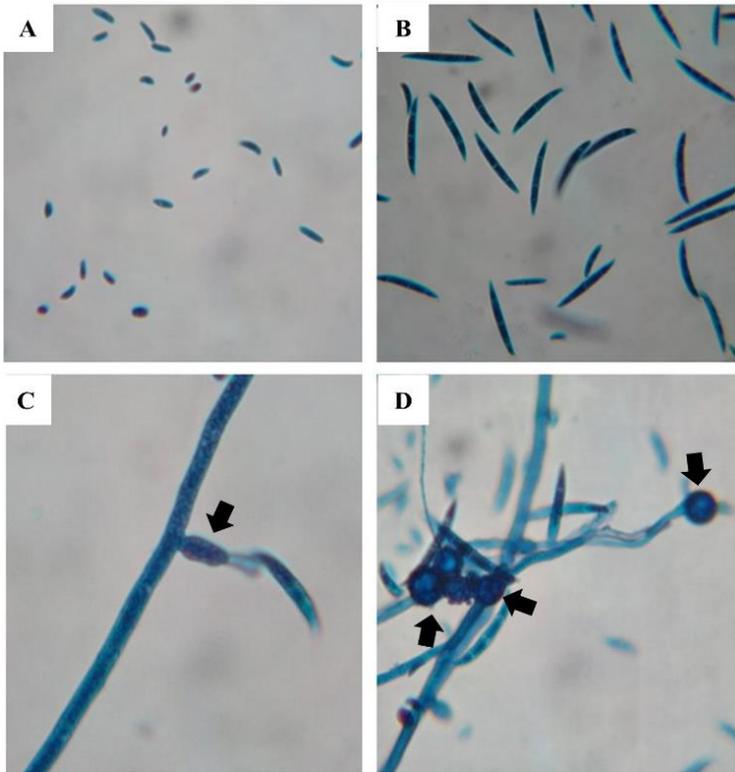


Fig. 3 Esporos de *Fusarium oxysporum* f *sp. phaseoli*. (A) Microconídios; (B) Macroconídios; (C) Macroconídio em fiálide curta (indicado pela seta); (D) Clamidósporos (indicado pela seta). Ampliação: 1000x (Foto: Marlon Borba).

O patógeno sobrevive no solo, em restos culturais ou na forma de clamidósporos, que são estruturas de resistência. *Fop* é disseminado, principalmente, através do movimento do solo, fragmentos infectados do hospedeiro, água de drenagem ou irrigação e sementes contaminadas (Wordell Filho et al. 2013).

3.4. INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO VASCULAR POR *Fusarium oxysporum*

Fop é um fungo habitante de solo que pode sobreviver durante anos na ausência do hospedeiro, na forma de clamidósporo (Abawi; Pastor-Corrales, 1987). O patógeno tende a penetrar as raízes do feijoeiro diretamente ou através de ferimentos (Fig. 4). Na ausência de ferimentos, a penetração de *Fop* ocorre, principalmente, na ligação da raiz principal com as raízes laterais (Niño-Sánchez et al., 2015).

No interior do sistema radicular, *Fop* tende a crescer pelo córtex até atingir o sistema vascular (Niño-Sánchez et al., 2015). No xilema, o patógeno coloniza o interior das células, onde é rapidamente disseminado para a parte aérea através de hifas e microconídios (Garcés-Fiallos et al., 2017). Uma vez que o tecido vascular está altamente colonizado, *Fop* tende a ocasionar o colapso dos vasos do xilema, reduzindo drasticamente o transporte de água para tecidos aéreos e provocando a morte da planta (Niño-Sánchez et al., 2015).

Sobre o caule de plantas mortas, *Fop* produz esporodóquios, onde são formados conídios e clamidósporos (Fig 4). Estes esporos do fungo do fungo permanecem sobre os restos culturais ou no solo, onde germinam e infectam raízes de plantas de feijão em cultivos futuros.

3.5. RESISTENCIA GENÉTICA

A utilização de cultivares resistentes tem sido a forma mais eficiente e prática para controlar a murcha de *Fusarium* (Buruchara; Camacho, 2000; Yadeta; Thomma, 2013; de Borba et al., 2017). Entretanto, a seleção destes cultivares tem se mostrado um grande desafio em decorrência da grande variabilidade do patógeno (Salgado; Schwartz, 1995). Atualmente, sete raças de *Fop* enumeradas de 1-7 são descritas na literatura e estão relacionadas a uma região geográfica particular (Alves-Santos et al., 2002). No Brasil, embora a raça 2 é predominante, um número crescente de raças (2, 3, 6 e 7) têm sido encontradas recentemente

(Henrique et al., 2015). Isso dificulta ainda mais os programas de melhoramento, uma vez que fontes gênicas de resistência das plantas são escassas e não estão disponíveis contra a maioria dos agentes patogênicos (Xue et al., 2015).

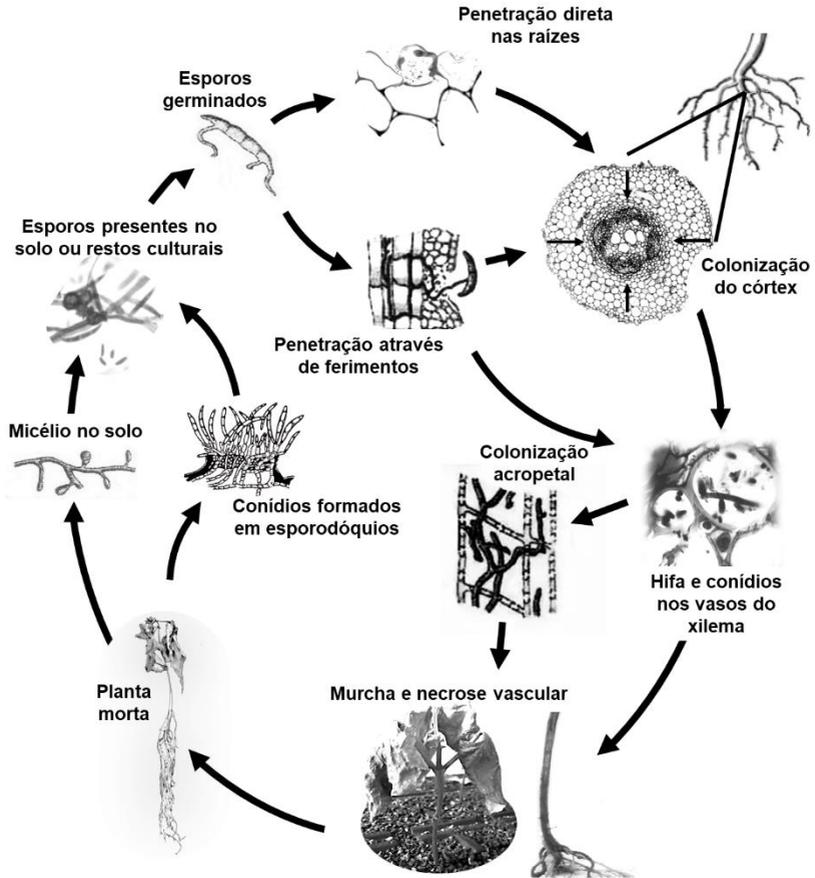


Fig. 4 Ciclo infeccioso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. (Adaptado de Agrios, 2005)

A resistência genética das plantas é caracterizada por uma resposta imediata após a invasão do patógeno. Diferentemente das suscetíveis, plantas resistentes tendem a reconhecer os patógenos rapidamente (Agrios, 2005). A percepção destes patógenos pode ocorrer por receptores

extra- e intracelulares. Enquanto os receptores extracelulares reconhecem moléculas do patógeno na superfície celular, tão bem como as moléculas hospedeiras associadas aos danos, receptores intracelulares reconhecem moléculas do patógeno que estão livres no interior da célula hospedeira (Yadeta; Thomma, 2013). Estes receptores reconhecem os PAMPs (padrões associados ao patógeno), ativando uma resposta de defesa basal na planta (Torres, 2010). Entretanto, agentes patogênicos podem bloquear este mecanismo de defesa basal, liberando efetores. Cabe as plantas resistentes reconhecerem estes efetores e ativarem uma segunda linha de defesa que é efetiva contra o agente patogênico (Torres, 2010).

A colonização de *Fop* no tecido hospedeiro varia de acordo com o grau de resistência das plantas (Garcés-Fiallos et al., 2017) e com a virulência do isolado (Niño-Sanches et al., 2015). Em plantas resistentes, o patógeno leva mais tempo para alcançar os vasos do xilema quando comparado a plantas suscetíveis (Garcés-Fiallos et al., 2017). Isto pode estar relacionado à resposta de defesa precoce, que reduzem a colonização do patógeno.

Até o momento pouco são os estudos que avaliaram os mecanismos envolvidos na resistência do feijoeiro a *Fop*. Sabe-se que o acúmulo de compostos no interior dos vasos é importante para bloquear o transporte de microconídios para a parte aérea da planta e assim reduzir os sintomas da doença (Pereira et al., 2013; Garcés-Fiallos et al., 2017). Além disso, em estudos recentes foram observadas a expressão de genes que podem estar envolvidos na rota do ácido salicílico (AS) e jasmônico (AJ) (Xue et al., 2015). Quanto a alterações logo após a inoculação de *Fop*, tem se observado a indução do metabolismo oxidativo em plantas resistentes, onde a enzima peroxidase tem se mostrado a principal fonte de ERO em plantas de feijão (Xue et al., 2017; de Quadros et al., 2019).

3.6. FITO-OXILIPINAS: UMA CLASSE DE METABÓLITOS PROVENIENTE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.

Os lipídios desempenham um papel vital em inúmeros processos morfofisiológicos e metabólicos em organismos vivos. Eles mediam a comunicação entre patógeno e hospedeiro, participam de processos fotossintéticos e de transdução de sinal (Christensen; Kolomiets, 2011). Um grupo seletivo de lipídios, denominado ácidos graxos poliinsaturados (AGPU), é oxidado enzimaticamente ou não enzimaticamente a produzir as oxilipinas (Göbel; Feussner, 2009). As oxilipinas desempenham

diversas funções no metabolismo vegetal, controlando o crescimento e desenvolvimento, a fertilidade, o envelhecimento e também atuam na resposta de defesa contra fatores bióticos ou abióticos (Scala et al., 2013).

3.6.1. Biossíntese

As fito-oxilipinas são classes de metabólitos lipídicos, formados a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Prost et al., 2005; Mosblech et al., 2009). Estes metabólitos incluem os hidroperóxidos de ácidos graxos; hidroxí-, oxo-, ou keto-ácido graxos; éteres divinílicos; aldeídos voláteis; ou ácido jasmônico (AJ) (Göbel; Feussner, 2009; Savchenko et al., 2013). A primeira etapa na síntese das oxilipinas é a formação de hidroperóxido de lipídios (LHPO), que pode ser formado a partir de processos químicos (autooxidação) ou enzimáticos (Mosblech et al., 2009).

3.6.1.1. Processo enzimático

As fito-oxilipinas são sintetizadas enzimaticamente pela α -dioxigenase (α -DOX) e, principalmente, pela lipoxigenase (LOX). Estes grupos enzimáticos são responsáveis por inserir o oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados (AGPU; Howe; Schillmiller, 2002). Os mais abundantes AGPUs são: o ácido linoleico (AL, 18:2; onde x:y é um ácido graxo contendo x carbonos e y dupla ligação) e o ácido linolênico (ALe, 18:3) (Mosblech et al., 2009). As LOXs são responsáveis por catalisar a reação de oxigenação do átomo de carbono 9 (9-LOX) ou do carbono 13 (13-LOX) dos AGPUs (Blée, 2002; Matsui, 2006). Esta diferença específica leva à formação dos hidroperóxidos correspondentes, 9-HPUAG ou 13-HPUAG (Howe; Schillmiller, 2002). Os HPUAGs podem então ser utilizados como substrato para seis vias alternativas (Fig. 5), governadas por enzimas chaves como aleno óxido sintase (AOS), hidroperóxido liase (HPL), divinil éter sintase (DES), peroxigenase (POX), álcool epoxi sintase (EAS) e LOX (Blée, 2002; Scala et al., 2013). As vias governadas pela AOS e HPL são as mais estudadas, devido a sua importância no processo fisiológico das plantas (Scala et al., 2013).

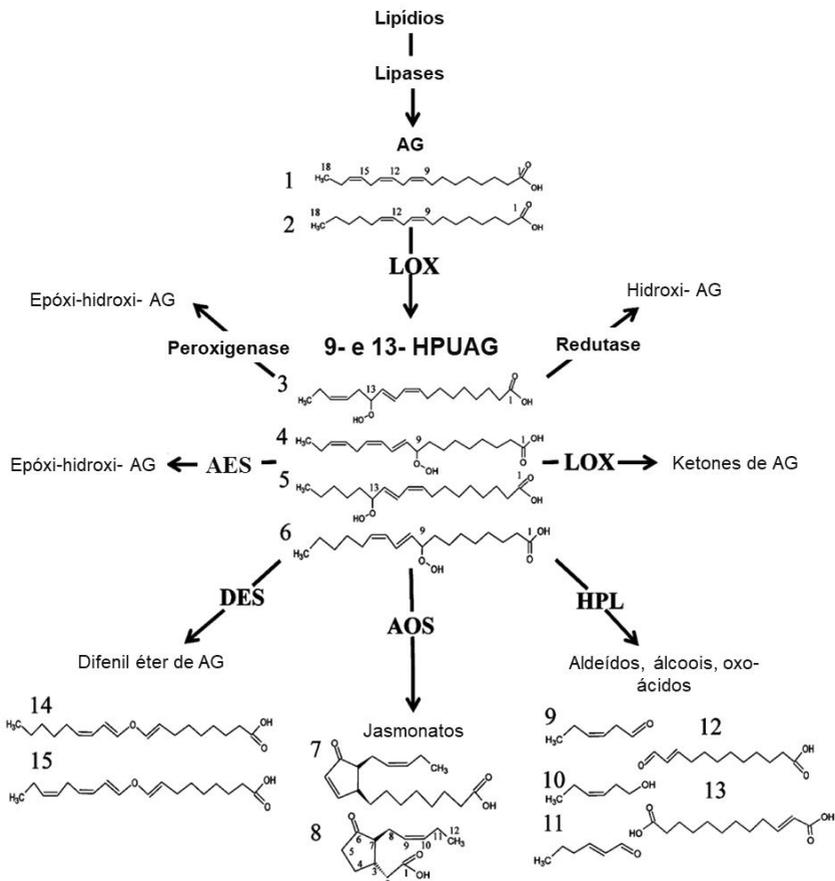


Fig. 5 Via da lipoxigenase (biosíntese de Oxilipinas). AG, ácidos graxos; LOX, lipoxigenase; AOS, aleno oxido sintase; HPL hidroperóxido liase; DES, difenil éter sintase; EAS, álcool epoxi sintase; 1) ácido linolênico; 2) ácido linoleico; 3) ácido 13-hidroperóxido linolênico; 4) ácido 9-hidroperóxido linolênico; 5) ácido 13-hidroperóxido linoleico; 6) ácido 9-hidroperóxido linoleico; 7) ácido 12-oxo-fitodinoico; 8) ácido jasmônico; 9) 3-hexanal; 10) 3-hexanol; 11) 2-hexanal; 12) traumatina; 13) ácido traumático; 14) ácido colnelico; 15) ácido colnelenico. Adaptado de Savchenko et al. (2013).

3.6.1.2. Processo químico (autoxidação)

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode levar a peroxidação das membranas formando fito-oxilipinas (Eckardt, 2008). Enquanto a LOX insere o oxigênio molecular apenas no C-9 ou C-13 de AL ou ALe, as ERO podem levar a formação de hidróxidos no C-10 e C-12 para AL e C-15 e C-16 para o ALe (Mosblech et al., 2009). Tal processo oxidativo dos AGPUs por ERO resulta no acúmulo de hidroperóxidos de ácidos graxos racêmicos livres ou esterificados (Göbel; Feussner, 2009). Estes podem iniciar um canal de reações oxidativas levando a formação dos fitoprostanos.

3.6.2. Defesa contra fitopatógenos

As plantas e os fitopatógenos têm co-evoluído intimamente ao longo de milhares de anos. Ao contrário dos mamíferos as plantas carecem de uma resposta imune adaptativa e são incapazes de produzir células de memória em estímulos específicos (Antico et al., 2012). Para contornar este problema, as plantas desenvolveram uma série de receptores que reconhecem moléculas elicitoras do patógeno ou fragmentos celulares vegetais após o dano aos seus tecidos (Torres, 2010). O reconhecimento do patógeno ativa uma série de mecanismos de defesa, dos quais estão inseridos a produção de espécies reativas de oxigênio (Xue et al., 2015; de Quadros et al., 2019) e morte celular programada (de Freitas; Stadnik, 2012); acúmulo de compostos antimicrobianos (Kishimoto et al., 2005); reforço da parede celular, através da síntese de lignina (Morkunas; Gmerek, 2005; Yadeta; Thomma, 2013) e a produção de oxilipinas pela lipoxigenase (Devi et al., 2000; Matsui et al., 2006; Kishimoto et al., 2005; Kishimoto et al., 2008).

A produção de fito-oxilipinas é caracterizada como uma resposta associada à patogênese, sendo frequentemente acompanhada pela liberação substancial de pequenos e reativos produtos da fragmentação lipídica (Farmer et al., 2003). Esta classe de metabólitos pode ter diversos papéis biológicos na defesa hospedeira, atuando principalmente, como um mensageiro secundário ou um composto antimicrobiano (Farmer et al., 2003; Göbel; Feussner, 2009). Em geral, as oxilipinas são compostos formados em resposta a injúrias mecânicas, herbivoria e ataques

patogênicos (Howe; Schillmiller, 2002; Blée, 2002). Elas podem ser sintetizadas por reações catalisadas pelas LOXs ou por ERO.

3.6.2.1. *Lipoxygenase*

A maioria das oxilipinas sintetizadas por enzimas são derivadas da LOX. Apesar disso, pouco se sabe sobre o papel fisiológico destas oxilipinas (Christensen; Kolomiets, 2011). Em estudos anteriores, o aumento da LOX tem sido relacionado com uma resposta de defesa em plantas de grão de bico (García-Limones et al., 2009) e soja (Jain; Choudhary, 2014) contra *F. oxysporum* e feijão-guandu contra *F. undum* (Devi et al., 2000). No mesmo sentido, a indução da LOX mostrou-se fundamental na resistência do tabaco à infecção por *Phytophthora parasítica* (Rancé et al., 1998). Neste caso, a supressão da enzima transformou o fenótipo resistente em suscetível.

As plantas expressam inúmeras isoformas da LOX, que podem ser distintas em seu padrão de expressão, localização sub celular e substrato utilizado (Howe; Schillmiller, 2002). Cada isoforma é responsável por regular funções fisiológicas distintas na planta. Isso se deve à produção de diferentes *pools* de HPUAG provenientes de cada isoformas, que poderão ser utilizados como substrato para vias alternativas (Matsui, 2006; Scala et al., 2013) no desenvolvimento vegetal e na defesa contra estresses bióticos e abióticos. Por exemplo, evidências recentes têm demonstrado que o 13-HPUAG, produzido pelo grupo de enzimas da 13-LOX, está relacionado à biossíntese do ácido jasmônico (Farmer et al., 2003) e C₆ aldeídos voláteis (Howe; Schillmiller, 2002). Por outro lado, apesar de haver poucos estudados, os subprodutos do grupo 9-LOX podem controlar a germinação, crescimento radicular e senescência das plantas (Christensen; Kolomiets, 2011).

Os metabólitos da LOX podem ser utilizados por pelo menos seis vias distintas, como citadas anteriormente. As vias governadas pelas enzimas AOS e HPL são as mais estudadas na interação planta-patógeno (Christensen; Kolomiets, 2011). Os metabólitos da AOS são, literalmente, os maiores reguladores da expressão gênica em resposta aos danos mecânicos (Savchenko et al., 2014). O AJ, produto final da via dos octadecanoides, vem sendo associado principalmente como uma resposta de defesa contra patógenos necrotróficos (Christensen; Kolomiets, 2011; Antico et al., 2012). Neste contexto, estudos anteriores demonstram que a deficiência da produção de jasmonatos aumenta a suscetibilidade de

plantas de tomate a *F. oxysporum*, *Phytophthora infestans* e *Verticillium dahliae* (Thaler et al., 2004). O aumento de jasmonatos tem sido observado na indução de resistência por micorrizas contra *F. oxysporum* f sp. *lycopersicum* (Nair et al., 2015). Os jasmonatos também podem suprir o desenvolvimento reprodutivo e o metabolismo secundário de microrganismos, como o que ocorre com algumas espécies de *Apergillus* (Christensen; Kolomiets, 2011).

A via da HPL também tem se mostrado importante na defesa contra patógenos (Matsui et al., 2006; Chehab et al., 2008; Kishimoto et al., 2008). A produção de compostos C_6 (*Green Leaf Volatiles*) possuem atividade antimicrobiana sobre microrganismos, dos quais acredita-se que atuam como “fitoalexinas voláteis” (Akram et al., 2008). Além disso, estes compostos podem atuar como uma molécula sinalizadora (Scala et al., 2013), desencadeando a resposta de defesa, tais como a síntese de fitoalexinas (Kishimoto et al., 2005). Em plantas de arábido que super-expressam HPL, observou-se o aumento da concentração da fitoalexina camalexina (Kishimoto et al., 2008). Neste mesmo estudo, foi atribuído a atividade fungicida dos compostos C_6 a defesa contra *B. cinerea*. Para *F. oxysporum*, os metabólitos da HPL podem reduzir a germinação de esporos (Matsui et al., 2006).

3.6.2.2 Espécies Reativas de Oxigênio

A explosão oxidativa é uma das primeiras respostas de defesa que ocorrem na interação patógeno-hospedeiro, resultando na formação de ERO, tais como O_2^- e H_2O_2 (Torres, 2010; Sharma et al., 2012; de Freitas; Stadnik, 2015; de Quadros et al., 2019). Em baixas concentrações, as ERO estão associadas a processos bioquímicos essenciais para a planta como o transporte de elétrons dos cloroplastos e mitocôndrias e como um mensageiro secundário, ativando diversos hormônios vegetais (Garcia-Limones et al., 2002; Sharma et al., 2012). Por outro lado, em altas concentrações, elas são tóxicas as células vegetais, causando danos oxidativos que incluem inativação de proteínas e mutações no DNA (Garcia-Limones et al., 2002), a peroxidação de lipídios e destruição das membranas.

A peroxidação lipídica causada por ERO, geralmente, está associada a alguma forma de estresse biótico ou abiótico. O resultado pode ser a formação de compostos fitoprostanos, que são potentes reguladores de diversos processos fisiológicos, incluindo a defesa contra

patógenos (Eckardt, 2008; Christensen; Kolomiets, 2011). Por outro lado, o aumento do conteúdo de ERO pode resultar num alto nível de peroxidação lipídica (Muller; Berger, 2009), ocasionando o dano oxidativo ao tecido hospedeiro. Um dos produtos mais bem conhecidos desta peroxidação é a formação de compostos de cadeia curta denominados malonaldeído (MDA). Assim como outras oxilipinas reativas, altos níveis de MDA são tóxicos à célula, devido a sua reatividade (Farmer et al., 2003; Mueller; Berger, 2009). A toxicidade para as células hospedeiras tanto das ERO, quanto das oxilipinas reativas podem ser benéficas à colonização de patógenos necrotróficos.

3.7. ENZIMAS ANTIOXIDANTES: ASCORBATO PEROXIDASE E CATALASE

3.7.1 Características gerais

A célula vegetal e suas organelas (mitocôndrias, peroxissomo e cloroplasto) contém múltiplas enzimas ou sistemas para remoção de ERO (Moller et al., 2007). Dentre estes sistemas antioxidantes, ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) são as principais enzimas removedoras de ERO em plantas (Torres, 2010). Enquanto APX é responsável pela fina modulação de ERO para sinalização, CAT remove grandes quantidades de ERO durante a resposta de estresse (Mittler, 2002).

A APX é uma enzima componente chave no ciclo ascorbato-glutationa, controlando os níveis intracelulares de ERO. APX utiliza duas moléculas de ácido ascórbico para reduzir H_2O_2 em água, gerando também duas moléculas do radical monodesidroascorbato (Sharma et al., 2012). A APX é membro da Classe I da família de heme peroxidases, estando presente nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias, apoplasto e peroxissomas (Mittler, 2002).

A CAT foi uma das primeiras enzimas antioxidantes a ser descoberta e caracterizada. Ela catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 e água e oxigênio (de Gara et al., 2003). A CAT está presente, principalmente nos peroxissomos (Mittler, 2002). Outros locais como o citosol, cloroplasto e mitocôndria também podem conter significativa quantidade da enzima (Sharma et al., 2012).

3.7.2. Sistema antioxidante na interação planta-patógeno

Durante a interação planta-patógeno, a acumulação incontrolável de ERO pode ocasionar a morte celular, beneficiando o agente patogênico, principalmente aqueles com hábitos necrotróficos (de Gara et al., 2003). Para isso, a indução do sistema antioxidante é um importante mecanismo de defesa, controlando os níveis de ERO no tecido vegetal. APX e CAT têm sido demonstradas participar da defesa hospedeira contra patógenos necrotróficos, regulando os níveis de ERO (Garcia-Limones et al., 2002; de Freitas et al., 2014; de Quadros et al., 2019). A redução da atividade destas enzimas pode elevar a taxa de peroxidação lipídica por ERO, beneficiando a colonização do patógeno (Mandal et al., 2008).

Para patógenos vasculares como *F. oxysporum*, em estudos recentes têm sido demonstrados que elevação da taxa de peroxidação lipídica promove a colonização do fungo (Gupta et al., 2012). Por outro lado, a indução do sistema antioxidante (APX e CAT) reduz o dano oxidativo e pode atuar na manutenção da homeostase redox e induzir um apropriado processo de aclimatação em hospedeiros resistentes (Garcia-Limones et al., 2009; de Quadros et al., 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes (linhagem UFSC-01) e suscetíveis (cv. Uirapuru) à MF (de Borba et al., 2017) foram utilizadas nos experimentos.

O isolado patogênico MANE 174 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi mantido em batata dextrose ágar à 25°C (± 2 °C) e 12 h de fotoperíodo. Este isolado foi identificado como raça 6 conforme Alves-Santos et al. (2002).

4.2. OBTENÇÃO DAS PLÂNTULAS

Plântulas de feijão foram cultivadas conforme de Quadros et al., (2019). As sementes foram semeadas em bandejas de isopor (45 cm³ por célula), contendo vermiculita como substrato e mantidas sob as condições da casa de vegetação (25 \pm 7 °C, 13 h de luz) para a emergência das plântulas. Cada célula foi irrigada diariamente com uma solução nutritiva

(condutividade elétrica $0,9 \text{ dS m}^{-1}$) composta de nitrato de cálcio (750 ppm), nitrato de potássio (500 ppm), fosfato monoamônio (150 ppm), sulfato de magnésio (400 ppm), sulfato de cobre (0,15 ppm), sulfato de zinco (0,50 ppm), ácido bórico (1,5 ppm), molibdato de sódio (0,15 ppm) e quelato de ferro (1,8 ppm).

Com idade entre 5-6 dias, as plântulas foram transferidas para um sistema hidropônico NFT (*Nutrient Film Technique*) contendo a solução nutritiva descrita anteriormente, onde permaneceram por mais 2 dias.

4.3. INOCULAÇÃO

Culturas puras do fungo foram cultivadas em placas de Petri, contendo meio de cultura ágar de folhas de cravo, por 21 dias à 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) e 12h de fotoperíodo sob luz fluorescente (Garcés-Fiallos et al., 2017). Então, 5 mL de água destilada foram adicionadas em cada placa e a suspensão conidial foi filtrado com auxílio de uma dupla camada de gaze, para remoção dos fragmentos miceliais. A concentração de conídios foi determinada com auxílio de câmara de Neubauer e ajustada para 1×10^6 macroconídios mL^{-1} .

Para a inoculação, as plântulas em estágio fenológico V2 (folhas primárias totalmente expandidas; Fernandez et al., 1986) foram cuidadosamente removidas do sistema hidropônicos. Então, suas raízes foram imediatamente imersas na suspensão conidial de *Fop* por 20 minutos. Plântulas cuja raízes foram imersas em água destilada serviram como testemunhas.

Após a inoculação as plântulas foram transplantadas para bandejas de polietileno de 15 células (200 cm^3 por célula) contendo vermiculita como substrato e incubadas a 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) e 12h de fotoperíodo.

4.4. AMOSTRAGEM

Para a avaliação da doença, sete plântulas foram amostradas aos 25 *dai*.

Secções da raiz primária, secundária e do hipocótilo foram amostrados aos 1, 3, 6 e 9 *dai* para microscopia de luz transmitida, aos 3 e 9 *dai* para a imunofluorescência e aos 9 *dai* para microscopia eletrônica.

Para o ensaio bioquímico, seis plântulas de cada tratamento foram amostradas aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação (*dai*). Para isso, as plântulas foram removidas individualmente do substrato, suas raízes

foram lavadas com água da torneira e enxaguadas em água destilada. Após este procedimento, as raízes e o hipocótilo foram desmembrados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até as análises.

4.5. AVALIAÇÃO DA DOENÇA E DETERMINAÇÃO DA ALTURA DE PLANTA

A severidade da murcha de Fusarium (MF) foi classificada de acordo com a escala de notas do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), variando de 1 (sem sintomas visíveis) a 9 (aproximadamente 75% ou mais dos ramos e folhas exibem murcha, clorose e desfolhação e eventualmente, morte da planta; van Schoonhoven; Pastor-Corrales, 1987). A incidência da doença foi determinada sobre plantas que apresentaram algum sintoma de MF.

A altura de planta foi determinada medindo-se a distância entre a superfície do substrato ao ponto máximo de crescimento. Finalmente, a porcentagem de necrose vascular do hipocótilo foi estimada.

4.6. ANÁLISES MICROSCÓPICAS

4.6.1. Microscopia de Luz

Secções da raiz central, lateral e do hipocótilo foram fixados utilizando paraformaldeído (2,5%) em tampão fosfato de sódio (0.1 M ; pH 7.2) por 48h. Então, as amostras foram desidratadas em etanol, infiltradas com historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas em micrótomo (Leica RM 2135; Heidelberg, Alemanha). Secções de 6 µm foram marcadas utilizando azul de toluidina (ATO; 0,5%) e examinadas com um microscópio de luz (Olympus BX 41) (Garcés-Fiallos et al., 2017). ATO cora carboidratos de azul escuro à violeta, enquanto fenólicos (incluindo lignina) de azul claro à verde (Bani et al., 2018).

4.6.2. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

TEM foi realizada de acordo com Simioni et al. (2014). As amostras foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M ; pH 7,2), contendo sacarose (0,2 M) por 4 h. Em seguida,

as amostras fixadas foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio (0,1 M ; pH 7,2; 10 min cada) e pós-fixadas com OsO₄ por 3 h. Amostras fixadas foram desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e infiltradas com resina de Spurr. A resina foi polimerizada a 70 °C durante 24 h. As seções ultrafinas foram obtidas utilizando um ultramicrotomo (Power Tone XL / RMC) com uma faca de diamante, e posteriormente coradas com acetato de uranila (1%) por 20 min e citrato de chumbo (1%) por 10 min. As seções foram observadas e fotografadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1011; Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME / UFSC) sob aceleração de 80 kV.

4.7. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E MALONALDEÍDO

4.7.1. Extração

Para a extração de H₂O₂ e MDA, as raízes e hipocótilos de feijão foram homogeneizados (1:8 m/v) com ácido tricloroacético (0,1%; ATC) em Precellys® (Bertin Technologies, Yvelines Cedex) a 6,000 rpm por 30 s. O homogeneizado foi centrifugado a 14000 rpm por 15 min a 4°C, e o sobrenadante foi coletado para a reação (Mandal et al., 2008).

4.7.2. Peróxido de hidrogênio

50 µL do extrato vegetal foram homogeneizados com 10 µL de tampão fosfato de potássio (10 mM; pH 7.0) e 50 µL de iodeto de potássio (1M). A absorbância da reação foi registrada a 350 nm e a concentração de H₂O₂ foi baseado numa curva padrão e expressa em µM de H₂O₂ g⁻¹ de massa fresca (mf; de Quadros et al., 2019).

4.7.3. Malonaldeído

50 µL do extrato vegetal foram incubados com 100 µL de ácido tricloroacético (ATC; 20%) e 50 µL de ácido tiobarbitúrico (ATB; 0,5%) por 30 min à 85°C. A reação foi interrompida em banho de gelo por 15 min e então centrifugada a 8000 rpm for 8 min. A absorbância das amostras foi lida a 532 nm e ajustada para absorbância não específica a 600 nm. O conteúdo de MDA foi determinado utilizando o coeficiente de

extinção $155 \text{ mM}^1 \text{ cm}^1$ e expressa como $\text{mmol g}^{-1} \text{ mf}$ (Mandal et al., 2008).

4.8. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DIENOS E TRIENOS CONJUGADOS E HIDROPERÓXIDO DE LIPÍDIOS

4.8.1. Extração

Os lipídios totais foram extraídos das raízes e do hipocótilo de acordo com Griffiths et al. (2000), com modificações. Amostras com 300 mg do tecido vegetal foram moídas com um almofariz e pilão em nitrogênio líquido e então homogeneizados com 5 mL de clorofórmio/metanol (1:2; v:v) contendo hidroxitolueno butilado (BHT; 0,001%). O homogeneizado foi depositado em tubos falcon e foram adicionados 2 mL de água MILI-Q e 1 mL de ácido acético (0,15M). Após este processo, 2 mL de clorofórmio foram adicionados sobre o almofariz e pilão para remover os lipídios remanescentes e combinados ao extrato contendo os lipídios. Os tubos foram agitados por 5 min e então, o extrato foi centrifugado a 3,500 rpm por 15 min. 1 mL da fase clorofórmio, contendo os lipídios, foi evaporado sobre vácuo.

O resíduo foi ressuscendido em metanol grade HPLC e então submetido às análises.

4.8.2. Dienos e trienos conjugados

Os dienos e trienos conjugados foram quantificados espectrofotometricamente de acordo com Elkahoui et al., (2005). Para isso, a absorbância das amostras contendo os lipídios foi registrada a 234 e 272 nm para os dienos e trienos conjugados, respectivamente.

4.8.3. Hidroperóxidos de lipídios

O conteúdo de hidroperóxido de lipídios (LHPO) foi determinado espectrofotometricamente baseado na sua reatividade com o excesso de Fe^{2+} em pH baixo na presença de corante xilenol laranja (Griffiths et al., 2000). Amostras duplicadas contendo o extrato lipídico (60 μL cada) foram homogeneizados com 15 μL de trifetilfosfina (TFF; 25 mM em metanol) ou metanol e incubadas no escuro a 25°C. Após 30 min, 400 μL do reagente FOX (*ferrous oxidation-xylene orange*) foram adicionados

em cada amostra e novamente incubado por 30 min. O reagente FOX foi preparado de acordo Griffiths et al. (2000) utilizando 900 mL de metanol grade HPLC, 100 mL de H₂SO₄ (250 mM), BHT (4 mM), sulfato de amônio ferroso hexa-hidratado (SFH; 250 µM) e xilenol laranja (100 µM). A absorvância das amostras com e sem TFF foi determinado a 560 nm. O conteúdo de LHPO foi determinado utilizando o coeficiente de absorção molar ($6.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.9.1. Extração

Tecidos da raiz e do hipocótilo foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0) na proporção de 1:5 (mf/v). O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até as análises (de Quadros et al., 2019).

4.9.2. Ascorbato peroxidase

Ascorbato peroxidase (APX EC 1.11.1.11) foi determinada conforme de Quadros et al. (2019), com pequenas modificações. Para isto, 10 µL do extrato enzimático foram homogeneizados com 140 µL de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0) contendo ácido ascórbico (2 mM) e peróxido de hidrogênio (2mM). A atividade da enzima foi monitorada por 4 min a 25°C a A₂₉₀ ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.9.3. Catalase

Catalase (CAT EC 1.11.1.6) foi determinado de acordo com de Quadros et al. (2019). Para tal, 15 µL de extrato enzimático foram homogeneizados com 140 µL de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0) contendo peróxido de hidrogênio (20 mM). A atividade da enzima foi monitorada por 4 min a 25°C a A₂₄₀ ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.9.4. Lipoxigenase

A atividade da lipoxigenase (LOX EC 1.13.11) foi determinada conforme de Quadros et al., (2019). Para tal, 20 µL de extrato enzimático

foram homogeneizados com 145 μL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,0) e 35 μL de ácido linolé(n)ico (10 mM). A atividade enzimática foi monitorada por 5 min a 25°C a A_{234} ($\epsilon = 25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.9.5. Proteínas totais

A quantidade das proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (ASB) como curva padrão. A atividade das enzimas foi expressa em katal mg de proteína⁻¹, onde 1 kat representa a quantidade de enzima que converte 1M de substrato s⁻¹.

4.10. DETECÇÃO DE LOX POR IMUNOFLORESCÊNCIA

As amostras fixadas em paraformaldeído foram embebidas em sacarose (10, 20 e 30%), congeladas a -14°C e seccionadas (20 μm) usando um crio-micrótomo (Cryostat Thermo Scientific HM525 NX).

Secções das raízes e do hipocótilo foram lavadas em tampão PBS (10 mM; pH 7,2) e bloqueadas por 1 h em TBT (PBS com ASB (1%) e Triton X-100 (1%)). Em seguida as secções foram incubadas com o anticorpo anti-LOX (1:500; AS06 128, Agrisera, Suécia) ‘*overnight*’ a 4°C. As amostras foram lavadas 3 vezes em tampão PBS (5 min cada) e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho FITC (1:25; fluoresceína isotiocianato, Sigma Aldrich) por 2h no escuro. A etapa de lavagem descrita anteriormente foi repetida e as secções foram imediatamente observadas no microscópio de fluorescência (filtro U-MWB2: Excitação = 460 a 490 nm e Emissão = 520 nm), marca Olympus, modelo BX41.

4.11. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Para avaliação dos sintomas da doença foram utilizadas 7 repetições por tratamento. Para os ensaios bioquímicos foram utilizadas 3 repetições, cada uma contendo duas plantas. Para as análises de microscopia de luz (transmitida e fluorescência) e eletrônica três e duas plantas foram casualmente amostradas em cada tempo, respectivamente.

Após a verificação da homogeneidade da variância, os dados foram submetidos a análise de variância. O teste de Tukey ($p \leq 0.05$) foi usado

para separação das médias. O teste T de Student ($p \leq 0.05$) foi utilizado para fazer comparações em pares. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SASM-Agri (versão 8.2).

Os resultados expressos são a combinação de dois experimentos com resultados semelhantes.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DA DOENÇA

Os sintomas da murcha de Fusarium (MF) foram observados mais intensamente em plantas do cv. Uirapuru (Fig. 6). De acordo com a escala do CIAT, os genótipos Uirapuru (8,7) e UFSC-01 (1,6) foram classificados como suscetível e resistente a MF, respectivamente (Fig. 6A). A MF incidiu em 100% das plantas do cv. Uirapuru, enquanto em 23% das plantas UFSC-01 (Fig. 6A). *Fop* reduziu a altura de planta apenas no cv. Uirapuru (Fig 6B).

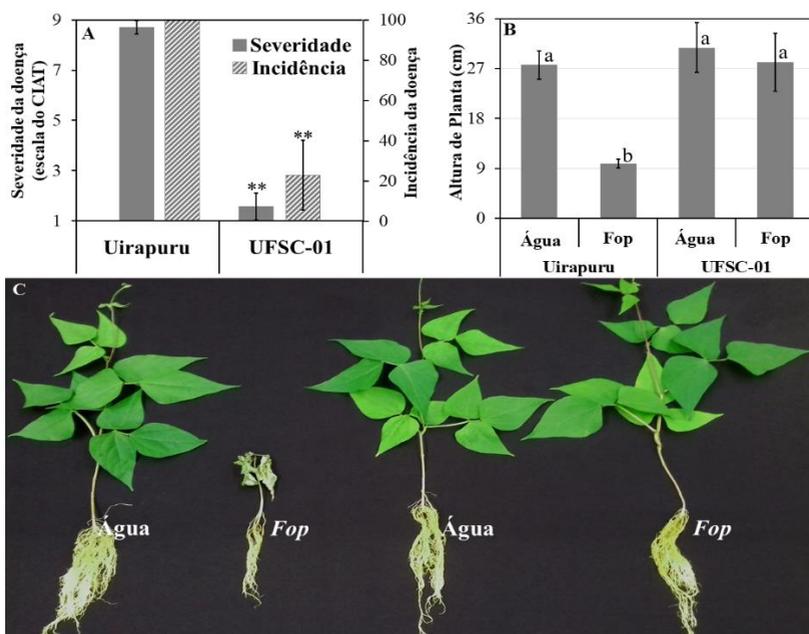


Fig. 6 Comparação dos sintomas externos da murcha de Fusarium entre plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e

resistentes (UFSC-01) aos 25 dias após a inoculação. (A) Severidade e incidência da doença; (B) Altura de planta; (C) Sintomas externos da doença. ** indica diferença significativa entre os genótipos (teste t de Student, $P \leq 0.01$). Letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Tukey, $P \leq 0.05$). Barras de erro correspondem o desvio padrão da média ($n=7$).

A percentagem de necrose vascular do hipocótilo no cv. Uirapuru foi de 97,8%, ou seja, 22 vezes maior que na linhagem UFSC-01 (Fig. 7A). Em plantas resistentes, a necrose vascular se restringiu à coroa da raiz e à região basal do hipocótilo (Fig. 7B).

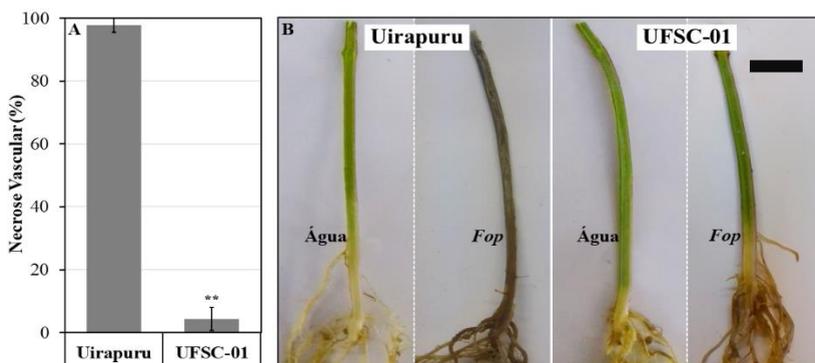


Fig. 7 Comparação dos sintomas internos da murcha de *Fusarium* entre plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 25 dias após a inoculação. (A) Necrose vascular do hipocótilo; (B) Sintomas internos da murcha de *Fusarium* ** indica diferença significativa entre os genótipos (teste t de Student, $P \leq 0.01$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=7$). Barra de escala: 2 cm.

5.2 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

5.2.1. Histopatologia da colonização de *Fop*

O padrão de colonização de *Fop* durante os estágios iniciais foi semelhante entre os genótipos, porém variou em estágios avançados (Fig.8-10). *Fop* penetrou as raízes (Fig. 8B) e progrediu pelo córtex em direção ao cilindro vascular (Fig. 8A). O patógeno formou conídios e clamidósporos nos espaços intercelulares do córtex das raízes em ambos os genótipos, principalmente nas lacunas do aerênquima (Fig. 8A).

Durante a progressão de *Fop* pelo córtex, algumas células foram colonizadas intracelularmente (Fig. 8C-D).

Aos 3 *dai*, o patógeno alcançou o xilema das raízes apenas no material suscetível (Fig. 9A). Enquanto isso, raízes de plantas infectadas do genótipo UFSC-01 acumularam compostos similarmente a carboidratos e fenólicos nos espaços inter- e intracelulares das células do córtex e endoderme (Fig. 9F, H).

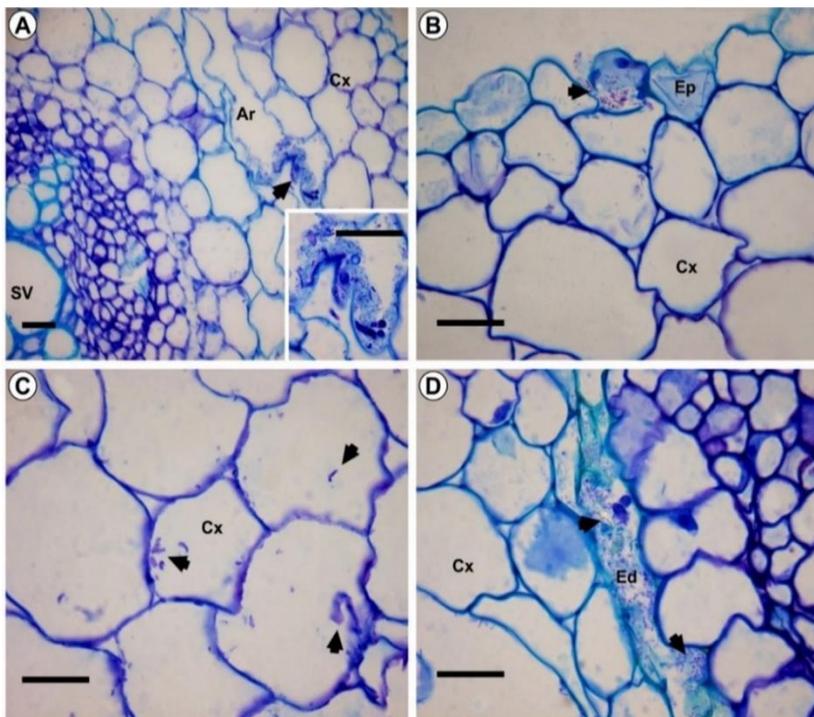


Fig. 8 Estágios iniciais da colonização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) em tecidos da raiz de plantas de feijão suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) ao 1 dia após a inoculação. Secções de 6 μm foram marcadas com azul de toluidina. (A) Conídios e hifas de *Fop* nos espaços intercelulares do córtex. Observa-se grandes quantidades de micélio, conídios e clamidósporos nas lacunas do aerênquima; (B) Hifas de *Fop* colonizando células da epiderme; (C) *Fop* no interior de células do córtex; (D) Acumulação de compostos e hifas em zonas próximas a endoderme de raízes resistentes. Ar: Lacunas do aerênquima; Cx: córtex; Ed: endoderme; Ep: epiderme; SV: sistema vascular. Setas indicam *Fop*. Barras de escalas: 20 μm

Aos 6 *dai*, *Fop* colonizou o interior dos vasos do xilema do hipocótilo de plantas suscetíveis (Fig. 10A), enquanto as células xilemáticas de raízes UFSC-01 (Fig. 10B). Aos 9 *dai*, células xilema da raiz de plantas suscetíveis foram mais colonizadas que o das plantas resistentes (Fig. 10C-D). A destruição celular do xilema foi observada apenas em raízes do cv. Uirapuru (Fig. 10C). Na raiz de ambos os genótipos, houve acúmulo de carboidratos e fenólicos em células parenquimáticas e nos elementos de vasos. Neste momento, *Fop* foi observado no interior do xilema do hipocótilo em ambos os genótipos (Fig. 10E-F), porém com maior intensidade no cv. Uirapuru.

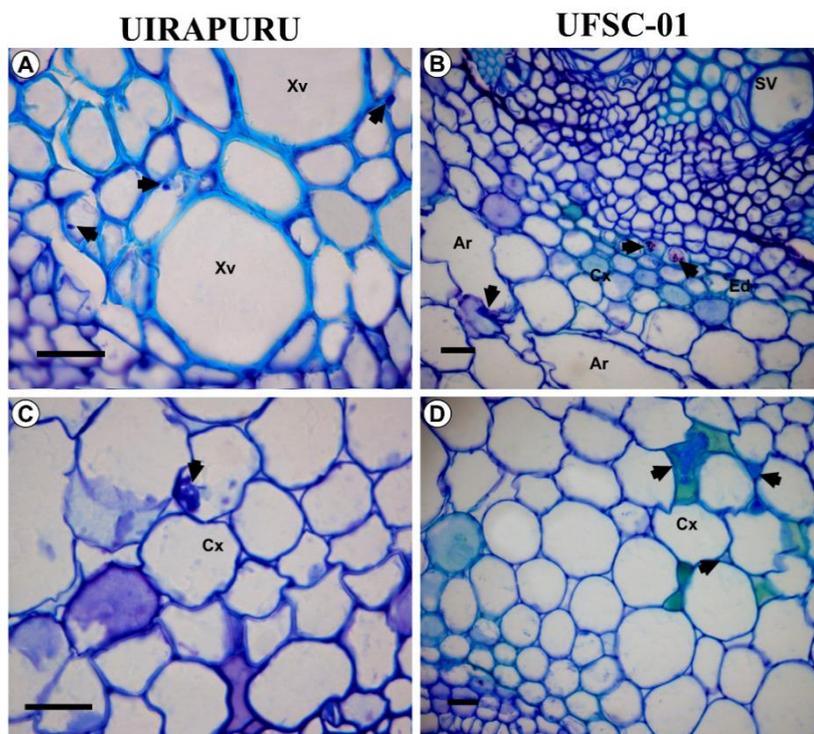


Fig. 9 Histopatologia da colonização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) em tecidos da raiz de plantas de feijão suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 3 dias após a inoculação. Secções de 6 µm foram marcadas com azul de toluidina. (A) *Fop* no interior do sistema vascular da raiz de plantas suscetíveis; (B) Acúmulo de substâncias em células do córtex e endoderme da raiz UFSC-01; (C) Colonização intracelular do córtex da raiz do

cv. Uirapuru; (D) Acúmulo de substâncias antimicrobianas nos espaços intercelulares do córtex da raiz UFSC-01. Ar: lacunas do aerênquima; Cx: córtex; Ed: endoderme; Ep: epiderme; SV: sistema vascular; Xv: vasos do xilema. Setas indicam *Fop.* Barras de escalas: 20µm

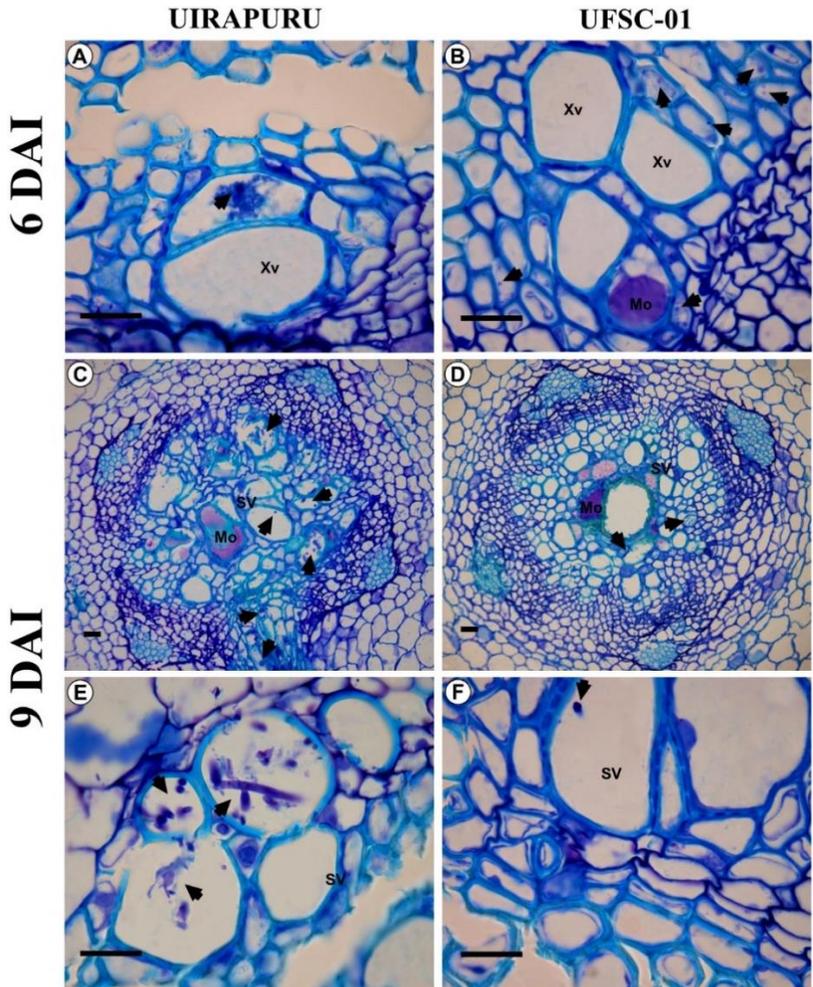


Fig. 10 Estágios avançados da colonização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em plantas de feijão suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 6 (A, B) e 9 (C-F) dias após a inoculação (DAI). Secções de 6 µm foram marcadas com azul de toluidina. (A) Conídios e hifa no interior do vaso do xilema

do hipocótilo de plantas suscetíveis; (B) Hifas e material de oclusão no sistema vascular da raiz de plantas resistentes; (C) Conídios, hifas e material de oclusão no interior do sistema vascular das raízes do cv. Uirapuru; (D) Hifas e material de oclusão no sistema vascular de raízes de UFSC-01; (E) Conídios e hifas no interior dos vasos do hipocótilo do cv. Uirapuru; (F) Hifa no interior dos vasos do xilema do hipocótilo de UFSC-01. Mo: material de oclusão; SV: sistema vascular; Xv: vasos do xilema. Setas indicam *Fop*. Barras de escalas: 20µm

5.2.2. Microscopia eletrônica de transmissão

MET confirmou que o xilema do Uirapuru foi mais colonizado por *Fop* do que o do UFSC-01. A inoculação de *Fop* induziu o aumento de organelas em células parenquimáticas do xilema de ambos os genótipos. O fungo foi encontrado principalmente em células parenquimáticas próximas aos elementos do vaso em raízes suscetíveis (Fig. 11A). Nestas células, as hifas foram mais pronunciadas nas áreas periplásmicas de regiões sem parede celular secundária. Vesículas e compartimentos multivesiculares próximos à parede celular e plasmodesmas foram observados nas raízes de ambos os genótipos. Algumas células colonizadas por *Fop* formaram estruturas com membranas concêntricas (Fig. 11C). Aposição a parede celular ocorreu em regiões sem parede celular secundária. Esses reforços de parede celular primária foram mais frequentes e elétrons densos nas raízes resistentes (Fig. 11B, D). Os microvacúolos também foram mais frequentes na célula vasculares das raízes resistente (Fig. 11D).

No hipocótilo de plantas inoculadas, as principais alterações ocorreram no cv. Uirapuru. No parênquima vascular do cv. Uirapuru, as organelas, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, foram mais frequentes em relação ao seu controle. Houve a formação de material de oclusão dentro de alguns elementos do vaso (Fig. 11E). A hifa de *Fop* foi observado adjacente à parede celular dos vasos do xilema (dados não mostrados) e células do parênquima do xilema (Fig. 11G). Aposição da parede celular elétron-densa foi observada no hipocótilo de plantas inoculadas em ambos os genótipos (Fig. 11E-F, H). No hipocótilo resistente, compartimentos multivesiculares e abundantes microvesículas foram observadas próximos a aposição da parede celular e da parede celular secundária (Fig. 11F). Microvacúolos e mitocôndrias também foram observados em células adjuntas aos elementos de vasos de hipocótilos resistentes (Fig. 11H).

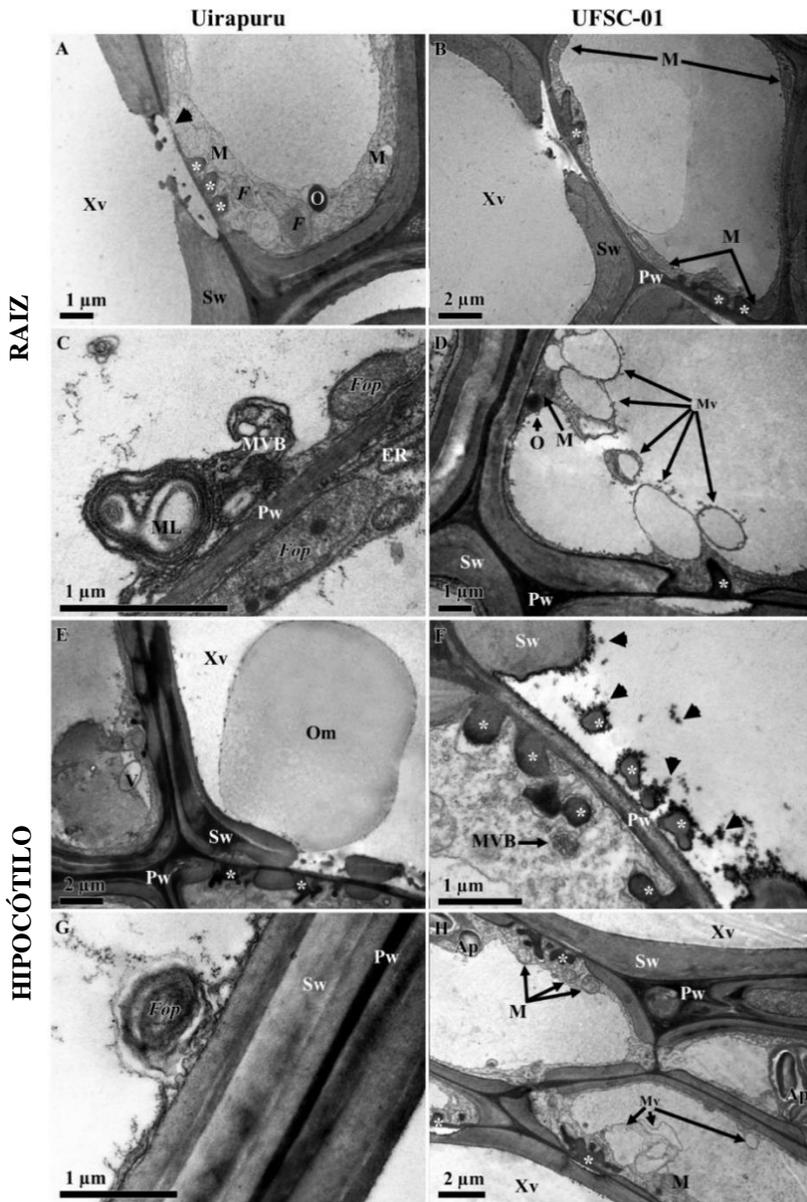


Fig. 11 Ultraestrutura da raiz e do hipocótilo de plantas suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 9 dias após a inoculação com

Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli (Fop). (A) *Fop* (*F*) no citoplasma da célula parenquimática do xilema de raízes do cv. Uirapuru. Observe a aposição da parede celular (asterisco) e a degradação da parede celular primária (seta preta); (B) Aposição da parede celular eletrônica-densa (asterisco) em células parenquimáticas do xilema de raízes UFSC-01 inoculadas; (C) Estrutura com membranas concêntricas ligado a um corpo multivesicular próximo a *Fop* em células de raízes do cv Uirapuru; (D) Microvacúolos próximos à aposição da parede celular em células de raízes UFSC-01 inoculadas; (E) Material de oclusão no interior do vaso do xilema no hipocótilo de plantas suscetíveis inoculadas. (F) Corpo multivesicular e vesícula junto à aposição da parede celular e parede celular secundária do hipocótilo de plantas resistentes inoculadas. (G) Hifa adjunto à parede celular da célula parenquimática do xilema em hipocótilos do cv. Uirapuru; (H) Vesículas e mitocôndrias em células parenquimáticas ligadas ao vaso do xilema de hipocótilos de plantas resistentes inoculadas. Observe o acúmulo de mitocôndrias e microvacúolos próximos a aposição da parede celular. Ap. amiloplasto; ER. retículo endoplasmático; M. mitocôndria; ML membranas concêntricas; Mv, microvacuole; MVB. corpo multivesicular; O. corpo osmofílico; Om material de oclusão; Pw. parede celular primária; Sw. parede celular secundária; Xv. vaso do xilema.

5.3. CONTEÚDO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.

O conteúdo de H_2O_2 na raiz e no hipocótilo de plantas não inoculadas não diferiu significativamente entre os genótipos (Student's t-test, $P \leq 0.05$) e permaneceu entre 4,3- 6,0 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ massa fresca (mf) na raiz, enquanto que no hipocótilo ocorreu um leve aumento de 26% ao longo do tempo (Fig. 12). A inoculação de *Fop* aumentou continuamente o conteúdo de H_2O_2 em raízes de plantas resistentes a partir de 1 *dai* em relação as não inoculadas, enquanto nas suscetíveis apenas aos 9 *dai* (Fig. 12A). As principais diferenças no conteúdo de H_2O_2 entre o hipocótilo de plantas não inoculadas e inoculadas ocorreram aos 6 *dai*, quando a inoculação com o patógeno induziu um pico em ambos os genótipos (Fig. 12B).

5.4. CONTEÚDO DE HIDROPERÓXIDO DE LIPÍDIOS E MALONALDEÍDO

O conteúdo de hidroperóxido de lipídios (LHPO) em plantas não inoculadas não diferiu significativamente entre os genótipos (Student's t-test, $P \leq 0.05$) ao longo do tempo, e tendeu a um aumento de 35% e 45% na raiz (Fig. 13A) e no hipocótilo (Fig. 13B), respectivamente. A

inoculação com *Fop* aumentou o conteúdo de LHPO apenas em plantas suscetíveis (Fig. 13A-B). Este aumento foi observado aos 1 e 9 *dai* na raiz (Fig. 13A), enquanto ao 6 *dai* no hipocótilo (Fig. 13B). Por outro lado, *Fop* reduziu pontualmente o conteúdo de LHPO em plantas resistentes inoculadas em relação as não inoculadas aos 6 e 3 *dai* na raiz e no hipocótilo, respectivamente (Fig. 13A-B).

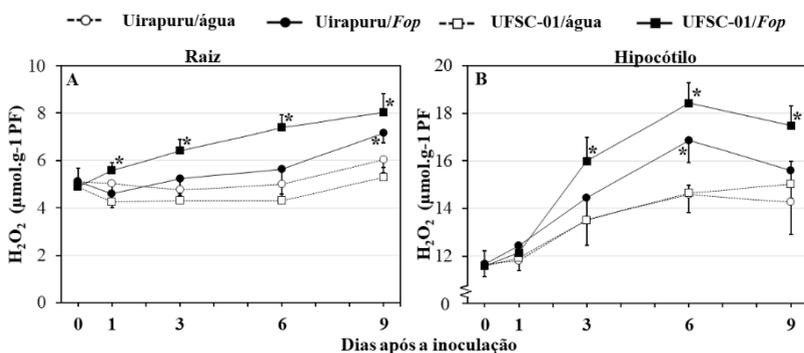


Fig. 12 Alterações no conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na raiz (A) e hipocótilo (B) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, $P \leq 0.05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6).

O conteúdo de MDA em plantas não inoculadas não diferiu significativamente entre os genótipos (Student's t-test, $P \leq 0.05$) e permaneceu entre 1,30-1,60 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ mf nas raízes (Fig. 13C), enquanto decresceu em 29% ao longo do tempo no hipocótilo (Fig. 13D). A inoculação com *Fop* aumentou o conteúdo de MDA ao 1 *dai* em raízes resistentes, enquanto apenas aos 9 *dai* nas suscetíveis (Fig. 13C). No hipocótilo, *Fop* causou um pico no conteúdo de MDA ao 1 *dai* em plantas resistentes, quando o conteúdo foi 26% maior que em plantas não inoculadas (Fig. 13D). Por outro lado, o conteúdo de MDA foi maior apenas aos 6 *dai* no hipocótilo suscetível inoculado em relação ao não inoculado.

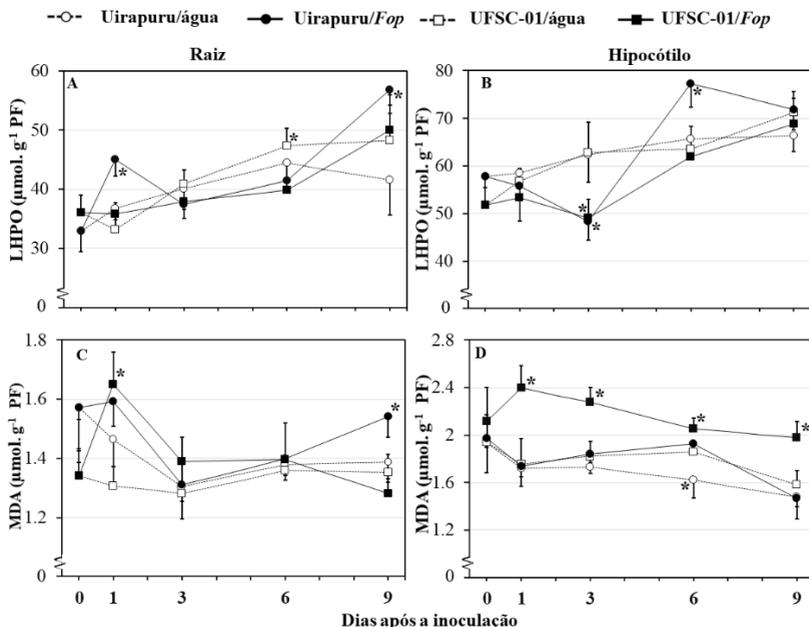


Fig. 13 Conteúdo de hidroperóxido de lipídios (A, B) e malonaldeído (C, D) na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, $P \leq 0.05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6).

5.5. CONTEÚDO DE DIENOS E TRIENOS CONJUGADOS

O conteúdo de dienos conjugados (DC) permaneceu entre 16,3-16,9 e 13,8-14,7 $\text{A}_{234} \text{nm g}^{-1} \text{mf}$ em raízes não inoculadas do cv. Uirapuru e UFSC-01, respectivamente (Fig. 14A). No hipocótilo de plantas não inoculadas, o conteúdo de DC foi semelhante entre os genótipos, decrescendo em 9% ao longo do tempo (Fig. 14B). *Fop* aumentou o conteúdo de DC em raízes resistentes ao longo do tempo, enquanto apenas aos 9 *dai* em suscetíveis (Fig. 14A). No hipocótilo, *Fop* aumentou o conteúdo de DC a partir dos 6 *dai* apenas na linhagem UFSC-01 (Fig. 14B).

O conteúdo de trienos conjugados (TC) em plantas não inoculadas não diferiu significativamente entre os genótipos (Student's t-test,

$P \leq 0.05$) ao longo do tempo e permaneceu entre 6,9-8,8 $A_{273} \text{ nm g}^{-1} \text{ mf}$ nas raízes, enquanto no hipocótilo houve um decréscimo de 35% ao longo do tempo (Fig. 14C-D). Nas raízes, *Fop* elevou o conteúdo de TC a partir dos 3 *dai* no genótipo resistente, enquanto apenas aos 6 *dai* no suscetível (Fig. 14C). No hipocótilo, a inoculação com *Fop* alterou o conteúdo de TC apenas em UFSC-01, causando um decréscimo a 1 *dai*, seguido pelo aumento aos 6 *dai* (Fig. 14D).

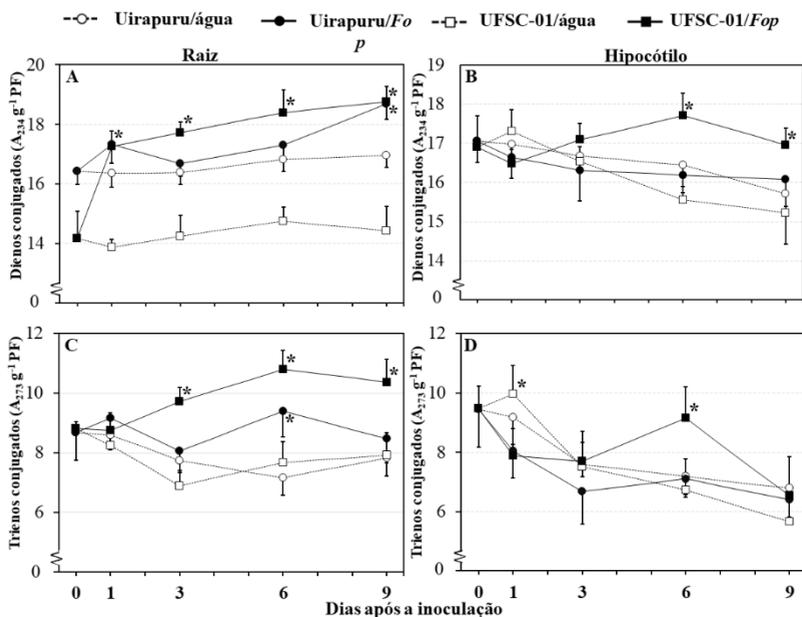


Fig. 14 Conteúdo de dienos (A, B) e trienos (C, D) conjugados na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, $P \leq 0.05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6).

5.6. ENZIMAS ANTIOXIDANTE

A atividade de APX em plantas não inoculadas não diferiu significativamente entre os genótipos (Student's t-test, $P \leq 0.05$) e permaneceu entre 18,6-27,8 e 17,6-23,1 nKat mg^{-1} proteína nas raízes e

no hipocótilo, respectivamente (Fig. 15A-B). A inoculação com *Fop* aumentou a atividade da APX, alcançando um pico aos 3 *dai* que foi 76% e 35% maior nas raízes resistentes e suscetíveis, respectivamente, em relação ao controle (Fig. 15A). Em seguida, a atividade da enzima decresceu levemente ao longo do tempo em raízes de plantas resistentes, enquanto nas raízes de plantas suscetíveis foi significativamente menor que seu controle aos 6 *dai*. No hipocótilo do genótipo UFSC-01, a inoculação de *Fop* induziu um aumento enzimático significativo ao longo do tempo, enquanto apenas aos 3 *dai* nos suscetíveis (Fig. 15B).

A atividade de CAT em raízes não inoculadas variou de 1,1-1,5 $\mu\text{Kat mg}^{-1}$ proteína em ambos os genótipos (Fig. 15C). No hipocótilo de plantas não inoculadas, a atividade da enzima aumentou em 60% ao longo do tempo (Fig. 15D). A atividade de CAT atingiu um pico aos 6 *dai* em raízes de plantas resistentes inoculadas, que foi 40% maior que seu controle. Por outro lado, a inoculação do patógeno reduziu a atividade da enzima em 32% nas raízes de plantas suscetíveis no mesmo período (Fig. 15C). No hipocótilo, a enzima foi alterada por *Fop* apenas no genótipo resistente, principalmente a partir dos 6 *dai*, quando foi 60% maior do que o respectivo controle (Fig. 15D).

5.7. LIPOXIGENASE

5.7.1. Atividade enzimática

A atividade da LOX^{18:2} (ácido linoleico) em raízes não inoculadas variou de 1,6-1,7 e 1,1-1,2 pKat mg^{-1} proteínas nos genótipos Uirapuru e UFSC-01, respectivamente (Fig. 16A). No hipocótilo de plantas não inoculadas, a atividade da enzima decresceu em ambos os genótipos, porém 22% e 16% em Uirapuru e UFSC-01, respectivamente (Fig. 16B). A inoculação com *Fop* induziu o aumento da atividade da LOX^{18:2} em raízes de plantas resistentes, com um pico aos 3 *dai*, que foi 45% maior ao respectivo controle (Fig. 16A). Em contraste, a atividade enzimática da LOX^{18:2} em raízes de plantas suscetíveis foi reduzida por *Fop* em 32% aos 6 *dai* (Fig. 16A). No hipocótilo, as principais alterações ocorreram aos 9 *dai*, quando *Fop* reduziu pela metade a atividade da LOX^{18:2} no genótipo Uirapuru, enquanto no material resistente ele aumentou 54% em relação ao controle (Fig. 16B).

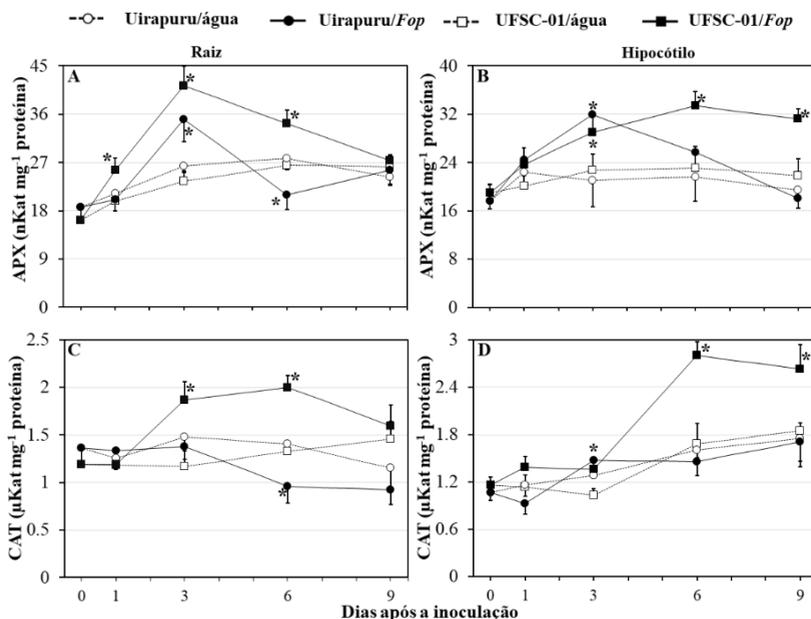


Fig. 15 Atividade da ascorbato peroxidase (A, B) e catalase (C, D) na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, $P \leq 0.05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6).

A atividade da LOX^{18:3} (ácido linolênico) em raízes não inoculadas permaneceu entre 2,5-2,8 pKat mg⁻¹ proteína na linhagem UFSC-01, enquanto decresceu de 3,3 para 2,5 pKat mg⁻¹ proteína no cv. Uirapuru (Fig. 16C). No hipocótilo de plantas não inoculadas, a atividade da enzima não diferiu significativamente entre os genótipos, decrescendo 25% ao longo do tempo. Enquanto Fop reduziu a atividade da LOX^{18:3} nas raízes de plantas suscetíveis em 20% entre 1 e 3 *dai*, nas raízes de plantas resistentes ele aumentou em 25% em relação ao controle (Fig. 16C). No hipocótilo o mesmo comportamento foi observado, porém aos 9 *dai* (Fig. 16D).

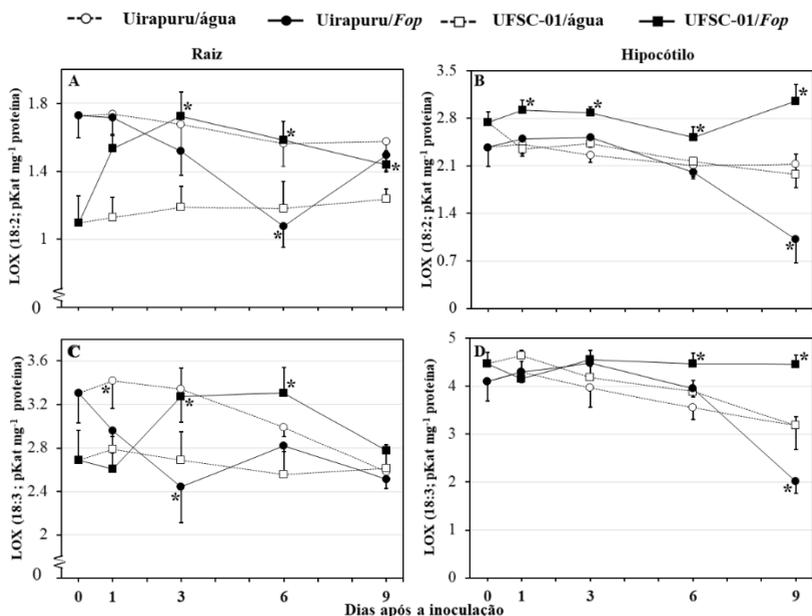


Fig. 16 Atividade da lipoxigenase-ácido linoleico (A, B) e lipoxigenase-ácido linolênico (C, D) na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). * indica diferença significativa entre plantas não inoculadas e inoculadas do mesmo genótipo (teste t de Student, $P \leq 0.05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=6).

5.7.2. Detecção da LOX por imunofluorescência

A análise comparativa entre plantas não inoculadas e inoculadas revelou um aumento na intensidade dos epítomos da LOX (reconhecido pelo anticorpo primário) aos 3 *dai* apenas em plantas resistentes (Tabela 1). Em contraste, Fop reduziu a fluorescência em raízes de plantas suscetíveis. Os epítomos foram detectados principalmente no sistema vascular (Fig 17A-B) e na endoderme (Fig 17D) da raiz de plantas suscetíveis e resistentes, respectivamente.

Aos 9 *dai*, o patógeno reduziu a intensidade dos epítomos no hipocótilo de plantas suscetíveis, enquanto na raiz não houve diferença (tabela 1). Em plantas resistentes, epítomos da LOX foram detectados

mais intensamente nas raízes e no hipocótilo de plantas inoculadas em relação as não inoculadas (tabela 1; Fig. 17G-H, K-L). Estes epítomos foram detectados, principalmente, no apoplasto e regiões intracelulares próximas a parede celular do xilema (Fig. 17H, L).

Tabela 1 Análise comparativa da imunofluorescência de epítomos da lipoxigenase entre plantas não-inoculada e inoculadas dos genótipos Uirapuru e UFSC-01 aos 3 e 9 dias após a inoculação (dai) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

	3 dai		9 dai	
	Uirapuru	UFSC-01	Uirapuru	UFSC-01
Raiz	-	+	=	++
Hipocótilo	=	=	-	+

Legenda: (-) menor, (=) igual, (+) maior e (++) muito maior que plantas não inoculadas do mesmo genótipo.

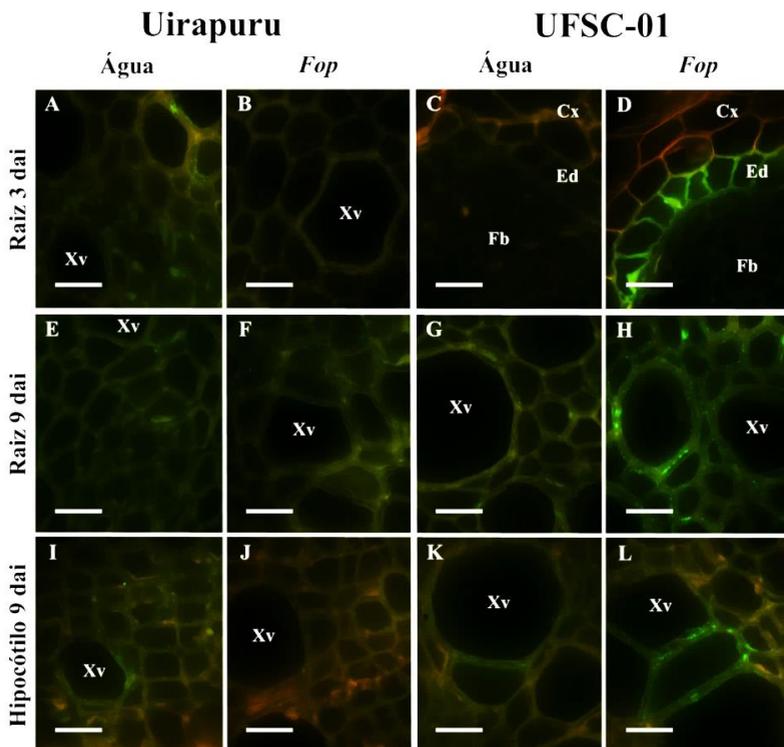


Fig. 17 Imunolocalização de epítomos da lipoxigenase na raiz (A-H) e no hipocótilo (I-L) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetíveis (cv.

Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) aos 3 (A-D) e 9 (E-L) dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). Cx: córtex; Ed: endoderme; Fb: fibras; Xv: vasos do xilema. Barra de escala: 20µm.

6. DISCUSSÃO

Durante o processo de colonização, patógenos necrotróficos tendem a causar a destruição do tecido hospedeiro (de Freitas; Stadnik, 2015; Xue et al., 2015; Garcés-Fiallos et al., 2017). Isto pode levar à degradação dos ácidos graxos, em um processo denominado peroxidação lipídica (Mandal et al., 2008). Neste trabalho, nós examinamos com mais detalhes a peroxidação lipídica em cada fase da colonização de *Fop* e associamos a LOX na resistência do feijoeiro.

Os sintomas da murcha de *Fusarium* foram observados em ambos os genótipos, porém com maior intensidade no cv. Uirapuru. Embora o genótipo UFSC-01 é uma segregação do cv. Uirapuru (de Freitas; Stadnik, 2012), mecanismos de defesa específicos parecem bloquear a progressão de *Fop*, tornando-o resistente. Neste genótipo, a necrose vascular se restringiu a coroa da raiz e a região basal do hipocótilo, sendo um fator preponderante para reduzir os sintomas da doença. Isto porque, a ampla destruição do tecido vascular por patógenos vasculares resultam num estado de deficiência hídrica e nutricional, intensificando os sintomas de murcha (Beckman, 1987).

Embora os eventos microscópicos da interação *Fop*-feijoeiro venham sendo estudados ao longo dos anos (Niño-Sanchez et al., 2014; Xue et al., 2015; Garcés Fiallos et al., 2017), muitas fases do processo de colonização do patógeno ainda permanecem inconclusivas. *Fop* é um patógeno de solo que infecta as raízes e coloniza o córtex até alcançar os vasos do xilema. Até então, trabalhos anteriores demonstravam um hábito de crescimento exclusivamente intercelular do patógeno até o xilema (Niño-Sanchez et al., 2014; Garcés-Fiallos et al., 2017). Entretanto, em nossas observações, *Fop* também pode colonizar intracelularmente a epiderme e o córtex. Este padrão de colonização é semelhante a outras *formae speciales* de *F. oxysporum*, como aquelas que infectam a ervilha (Bani et al., 2018) e o melão (Zvrin et al., 2010), porém com menor intensidade.

Ainda olhando para a fase inicial, a colonização inter- e intracelular de *Fop* ocorreu similarmente em ambos os genótipos. Porém, foi decrescendo gradativamente ao longo do tempo em plantas resistentes

devido a reações de defesa. Estas reações possivelmente foram induzidas por receptores localizados no interior das células ou no apoplasto (Yadeta and Thomma, 2012). Como resultado, *Fop* alcançou o xilema mais lentamente e em menor número em raízes resistentes do que as suscetíveis. Portanto, nossos resultados sugerem que uma rápida resposta de defesa extravascular é importante para a resistência a *Fop*.

Reações de defesa precoce resultaram no acúmulo de compostos inter- e intracelulares no córtex e, principalmente, na endoderme. Ao nosso ver, esta é o primeiro relato de uma resposta de defesa do feijoeiro durante a “fase determinativa I” (Rodríguez-Galvez et al., 1995), ou seja, antes do fungo alcançar o xilema. Diferentemente de outros mecanismos que dificultam a colonização acrópeta do fungo, como o adensamento celular do xilema (Pereira et al., 2013) e a oclusão dos vasos (Garcés-Fiallos et al., 2017), o acúmulo destes compostos, parecem atrasar e reduzir a invasão do xilema por *Fop*. Isto porque, estes compostos característicos como carboidratos e fenólicos são metabólitos com uma potencial atividade antifúngica (Bani et al., 2018). Assim, esta resposta formaria uma das primeiras linhas de defesa, criando uma barreira físico-química que impediria a progressão do patógeno em direção ao tecido vascular.

Embora o envolvimento do metabolismo oxidativo durante a interação *Fop*-feijoeiro tem sido documentada em trabalhos anteriores (Xue et al., 2015; de Quadros et al., 2019), muitas lacunas acerca da real importância das ERO na resistência do feijoeiro a *Fop* ainda permanecem desconhecidas. Nosso estudo revelou dois resultados interessantes sobre o H_2O_2 na interação *Fop*-feijoeiro que foram: a)- o conteúdo de H_2O_2 aumentou gradualmente de acordo com a progressão de *Fop* nas raízes, enquanto no hipocótilo os níveis foram maiores a partir dos 3 *dai*, ou seja, antes do fungo coloniza-lo; e b)- o pico nos níveis de H_2O_2 ocorreu após *Fop* alcançar o xilema. Estes resultados sugerem que H_2O_2 age como um mecanismo de defesa local, ao mesmo tempo que induz uma resposta de defesa sistêmica no feijoeiro contra *Fop*. Além do mais, devido a habilidade de produzir metabólitos durante a infecção do xilema (Yadeta; Thomma, 2013) e o acúmulo de H_2O_2 ocorrer especificamente no xilema (de Quadros et al., 2019), é plausível apoiar que as células parenquimáticas do xilema são as principais fontes de H_2O_2 . Realmente, a proliferação de mitocôndrias e vesículas nestas células poderiam estar relacionadas, respectivamente, a produção e transporte de ERO para sinalização (Torres, 2010)

Os danos às membranas mediante a peroxidação lipídica foram detectados utilizando dois métodos. O primeiro método foi baseado na quantidade de hidroperóxido de lipídios (LHPO), enquanto o segundo baseou-se no conteúdo de malonaldeído (MDA), um subproduto da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Griffiths et al., 2000). Considerando os dois métodos analisados, o grau da peroxidação lipídica variou de acordo com a progressão do patógeno. No sítio primário de infecção, foram observados dois picos, um ao 1 *dai* e outro aos 9 *dai*. O primeiro pico foi independente do grau de resistência e ocorreu durante a penetração e colonização da endoderme e córtex. Assim, como em trabalhos anteriores, a indução da peroxidação lipídica logo após a penetração pode estar relacionado ao reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro (Hammond-Kosack; Jones, 1996).

Com relação ao segundo pico na peroxidação lipídica, esta resposta foi específica da interação compatível. O aumento da taxa de peroxidação lipídica em estágios tardios de colonização tem sido associado à suscetibilidade do hospedeiro a patógenos vasculares (Garcia-Limones et al., 2002; Mandal et al., 2008). Em nosso estudo, esta resposta foi acompanhada pelo aumento do conteúdo de H₂O₂, formação de estruturas com membranas concêntricas e células colapsadas. Estruturas membranosas semelhantes a estas foram observadas por An et al. (2006) durante o estágio inicial de degradação celular, o qual foram descritas como estruturas multilamelares semelhantes a lisossomos. Estes autores também descreveram que durante a ruptura do tonoplasto, estas estruturas tendem a se decompor, ocorrendo simultaneamente, o acúmulo de H₂O₂ no apoplasto. Assim, é plausível assumir que o segundo pico da peroxidação lipídica está relacionado a destruição celular do xilema por *Fop*.

O aumento da atividade das enzimas antioxidantes coincidiu com o acúmulo de ERO em plantas resistentes. Sabe-se que a APX e CAT são as principais enzimas removedoras de H₂O₂ (Torres, 2010). A indução destas enzimas pode estar associada à regulação dos níveis de H₂O₂, evitando o dano oxidativo e conseqüentemente uma intensa peroxidação lipídica. Assim, estes resultados suportam uma hipótese previamente estabelecida (de Quadros et al., 2019), que o sistema antioxidante atua no controle da oxido-redutase celular sobre o estresse oxidativo na resistência do feijoeiro a *Fop*.

A atividade da LOX, assim como o acúmulo de dienos e trienos conjugados foram maiores no genótipo resistente do que no suscetível.

Esta resposta pode ser fundamental para resistência do feijoeiro contra *Fop*, uma vez que indução da enzima está diretamente associada à defesa do hospedeiro contra o patógeno (Devi et al., 2000; Jain; Choudhary, 2014). Sabe-se que a LOX catalisa a oxidação de ácidos graxos, tais como ácido linoleico ou linolênico, formando os conjugados de hidroperóxidos (Elkahoui et al., 2005). Em nosso estudo, o aumento da atividade da LOX em plantas resistentes inoculadas coincidiu com o acúmulo dos conjugados, que são os primeiros produtos da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados. Estes conjugados podem ser metabolizados por inúmeras vias, onde as duas principais levam a formação de compostos como traumatina e do ácido jasmônico, que são importantes moléculas sinalizadoras (Farmer et al., 2003).

A indução da LOX em plantas resistentes ocorreu conforme a progressão do patógeno, ou seja, primeiramente na raiz e depois no hipocótilo. Este padrão levanta duas hipóteses: a)- a enzima foi induzida como uma resposta de defesa local contra o patógeno; e b)- os danos ao tecido hospedeiro decorrente da alta intensidade de colonização foram responsáveis por induzir a enzima. Com respeito a primeira possibilidade, sabe-se que a LOX está envolvida na síntese de moléculas com atividade antimicrobiana (Devi et al., 2000). Assim, a indução da enzima na endoderme da raiz e posteriormente nos vasos do xilema, poderia estar associada a incorporação de substâncias antimicrobianas com efeito sobre *Fop*. Em relação à outra possibilidade, a fragmentação lipídica nestas regiões causadas pela alta atividade fúngica, poderiam liberar ácidos graxos poliinsaturados (Farmer et al., 2003), induzindo ao aumento da atividade da LOX. Embora estas duas hipóteses são plausíveis e possam ocorrer simultaneamente, mais estudos devem ser realizados.

Em suma, este trabalho revelou pela primeira vez que *Fop* é capaz de colonizar intracelularmente as células da epiderme e córtex da raiz do feijoeiro, independentemente do genótipo. Além disso, o acúmulo de compostos nestas regiões parece formar uma das primeiras linhas de defesa contra a progressão do patógeno. Outro resultado não menos importante revelou que a peroxidação lipídica está associada a susceptibilidade do feijoeiro em estágios avançados de infecção, possivelmente decorrente da destruição celular causada pelo patógeno. Por fim, nossas descobertas evidenciam que a lipoxigenase participa ativamente da resistência do feijoeiro a *Fop*.

7. REFERÊNCIAS

- Abawi, G. S. & Pastor-Corrales, M. A. (1987). Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease*, 71(11), 990-993.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Burlington.
- Akram, A., O., M., Duby, F., Dommes, J., & Thonart, P. (2008). Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC plant biology*, 8(1), 113.
- Aloj, B., Marziano, F., Zoina, A., & Noviello, C. (1987). Osservazione su una nuova razza fisiologica del *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Annali Facoltà Scienze Agrarie Università Studi Napoli Portici*, 4, 51-4.
- An, Q., Ehlers, K., Kogel, K. H., Van Bel, A. J., & Hüchelhoven, R. (2006). Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytologist*, 172(3), 563-576.
- Antico, C. J., Colon, C., Banks, T., & Ramonell, K. M. (2012). Insights into the role of jasmonic acid-mediated defenses against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. *Frontiers in Biology*, 7(1), 48-56.
- Alves-Santos, F. M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J. M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M. C., ... & Eslava, A. P. (2002). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology* 51(5), 605-611.
- Bani, M., Pérez-De-Luque, A., Rubiales, D., & Rispaill, N. (2018). Physical and Chemical Barriers in Root Tissues Contribute to Quantitative Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* in Pea. *Frontiers in plant science*, 9, 199.
- Beckman, C. H. (1987). *The nature of wilt diseases of plants*. APS press..
- Bianchini, A.; Maringoni, A.C.; Carneiro, S.M.P.G. *Doenças do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)*. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M. Bergamin Filho, A. et al. (Eds) Manual de Fitopatologia. v.2, 4.ed. São Paulo: Ceres. 2005. P.333-349.

- Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in plant science*, 7(7), 315-322.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buruchara, R. A., & Camacho, L. (2000). Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. *Journal of Phytopathology*, 148(1), 39-45.
- Cardoso, C. O., Kimate, H., & Fernandes, N. G. (1966). Nota sobre a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Schlecht) Kendrick e Snyder causando murcha vascular em feijoeiro. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 23, 273-276.
- Chehab, E. W., Kaspi, R., Savchenko, T., Rowe, H., Negre-Zakharov, F., Kliebenstein, D., & Dehesh, K. (2008). Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PLoS one*, 3(4), e1904.
- Christensen, S. A., & Kolomiets, M. V. (2011). The lipid language of plant–fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 4-14.
- Croft, K. P. C., Voisey, C. R., & Slusarenko, A. J. (1990). Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36(1), 49-62.
- de Borba, M. C., Garcés-Fiallos, F. R., & Stadnik, M. J. (2017). Reactions of black bean seedlings and adult plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Crop protection*, 96, 221-227.
- de Freitas, M. B., & Stadnik, M. J. (2012). Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and molecular plant pathology*, 78, 8-13.
- de Freitas, M. B., & Stadnik, M. J. (2015). Ulvan-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Alternaria brassicicola* requires reactive oxygen species derived from NADPH oxidase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 90, 49-56.

De Gara, L., de Pinto, M. C., & Tommasi, F (2003). The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(10), 863-870.

de Quadros, F. M., Garcés-Fiallos, F. R., de Borba, M. C., de Freitas, M. B., & Stadnik, M. J. (2019). *Fusarium oxysporum* affects differently the hydrogen peroxide levels and oxidative metabolism in susceptible and resistant bean roots. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106, 1-6.

Devi, P. U. M., Reddy, P. S., Rani, N. U., Reddy, K. J., Reddy, M. N., & Reddanna, P. (2000). Lipoxxygenase metabolites of α -linolenic acid in the development of resistance in pigeonpea, *Cajanus cajan* (L.) Millsp, seedlings against *Fusarium udum* infection. *European Journal of Plant Pathology*, 106(9), 857-865.

Echandi, E. (1967). Amarillamiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Turrialba*, 17(4).

Eckardt, N. A. (2008). Oxylipin signaling in plant stress responses.

Elkahoui, S., Hernández, J. A., Abdelly, C., Ghrrir, R., & Limam, F. (2005). Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science*, 168(3), 607-613.

Ethnopharmacologia. Disponível em
<http://www.ethnopharmacologia.org/recherche-dans-prelude/?plant_id=4544>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2019.

FAO. FAOSTAT. Disponível em:
<<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 20 junho 2017.

Farmaki, T., Sanmartín, M., Jiménez, P., Paneque, M., Sanz, C., Vancanneyt, G., ... & Sánchez-Serrano, J. J. (2007). Differential distribution of the lipoxxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of experimental botany*, 58(3), 555-568.

Farmer, E. E., Alméras, E., & Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 372-378.

Garcés-Fiallos, F. R., de Borba, M. C., Schmidt, É. C., Bouzon, Z. L., & Stadnik, M. J. (2017). Delayed upward colonization of xylem vessels is

- associated with resistance of common bean to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2), 477-489.
- García-Limones, C., Dorado, G., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M., & Tena, M. (2009). Changes in the redox status of chickpea roots in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: apoplastic antioxidant enzyme activities and expression of oxidative stress-related genes. *Plant Biology*, 11(2), 194-203.
- García-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M., & Tena, M. (2002). Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and molecular plant pathology*, 61(6), 325-337.
- Göbel, C., & Feussner, I. (2009). Methods for the analysis of oxylipins in plants. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1485-1503.
- Griffiths, G., Leverentz, M., Silkowski, H., Gill, N., & Sánchez-Serrano, J. J. (2000). Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of Experimental Botany*, 51(349), 1363-1370.
- Gupta, S., Bhar, A., Chatterjee, M., & Das, S. (2013). *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 1 induced redox state alterations are coupled to downstream defense signaling in root tissues of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PLoS One*, 8(9), e73163.
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773.
- He, C., Hsiang, T., & Wolyn, D. J. (2001). Activation of defense responses to *Fusarium* infection in *Asparagus densiflorus*. *European Journal of Plant Pathology*, 107(5), 473-483.
- Henrique, F. H., Carbonell, S. A. M., Ito, M. F., Gonçalves, J. G. R., Sasserón, G. R., & Chiorato, A. F. (2015). Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. *Bragantia*, 74(1), 84-92.
- Howe, G. A., & Schillmiller, A. L. (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 230-236.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, 2015. 83p.

Jain, S., & Choudhary, D. K. (2014). Induced defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants by *Carnobacterium* sp. SJ-5 upon challenge inoculation of *Fusarium oxysporum*. *Planta*, 239(5), 1027-1040.

Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2008). Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 69(11), 2127-2132.

Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2005). Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46(7), 1093-1102.

León, J. (1968). *Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales* (No. IICA-LME 18). IICA, San José (Costa Rica).

Mandal, S., Mitra, A., & Mallick, N. (2008). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), 56-61.

Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., ... & Feussner, I. (2006). Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, 67(7), 649-657.

Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 274-280.

Mittler, R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410

Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58: 459-481.

Moreira, S. S. (2014). Aspectos do desenvolvimento em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados com *Trichoderma* spp.

- Morkunas, I., & Gmerek, J. (2007). The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *Journal of plant physiology*, 164(2), 185-194.
- Mosblech, A., Feussner, I., & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 511-517.
- Mueller, M. J., & Berger, S. (2009). Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1511-1521.
- Nair, A., Kolet, S. P., Thulasiram, H. V., & Bhargava, S. (2015). Role of methyl jasmonate in the expression of mycorrhizal induced resistance against *Fusarium oxysporum* in tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 92, 139-145.
- Niño-Sánchez, J., Tello, V., Casado-del Castillo, V., Thon, M. R., Benito, E. P., & Díaz-Mínguez, J. M. (2015). Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in microbiology*, 6, 234.
- de OLIVEIRA, S. H. F. (1999). *Doenças do feijoeiro: guia de identificação, fenologia e controle*. Instituto Biológico.
- Pereira, A. C., Cruz, M. F. A., Paula Júnior, T. J., Rodrigues, F. A., Carneiro, J. E. S., Vieira, R. F., & Carneiro, P. C. S. (2013). Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. *Tropical Plant Pathology*, 38(4), 323-328.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M. J., Kift, N., ... & Castresana, C. (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant physiology*, 139(4), 1902-1913.
- Rancé, I., Fournier, J., & Esquerré-Tugayé, M. T. (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6554-6559.

Rocha, M. M. Hábito de crescimento. <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijaoaupi/arvore/CONTAG01_2_510200683535.html> acessado 21 de junho de 2017.

Rodriguez-Galvez, E., & Mendgen, K. (1995). The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma*, 189(1-2), 61-72.

Salgado, M. O., Schwartz, H. F., & Brick, M. A. (1995). Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease*, 79(3), 279-281.

Santos, J. D., & GAVILANES, M. L. (2006). Botânica. *Feijão*, 2, 41-65.

Savchenko, T. V., Zastrijnaja, O. M., & Klimov, V. V. (2014). Oxylipins and plant abiotic stress resistance. *Biochemistry (Moscow)*, 79(4), 362-375.

Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M., & Schuurink, R. (2013). Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 17781-17811.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

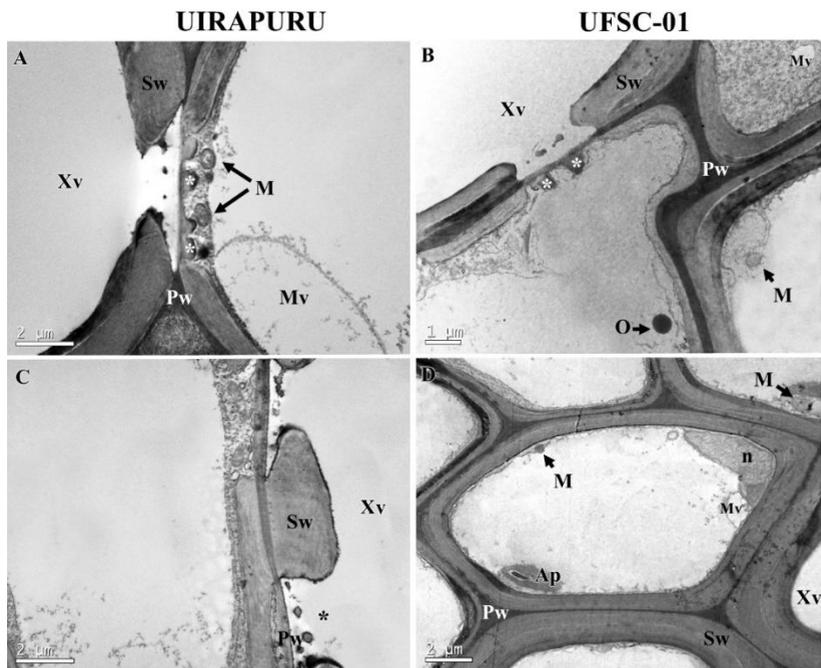
Silva, H. T, da; Morfologia. <
https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/A01_9_1311200215101.html> acessado em 21 de junho de 2017.

da Silva, V. N., Guzzo, S. D., Lucon, C. M. M., & Harakava, R. (2012). Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(12), 1609-1617.

Simioni, C., C. Schmidt, É., Felix, M. R. D. L., Polo, L. K., Rover, T., Kreuzsch, M., ... & Bouzon, Z. L. (2014). Effects of Ultraviolet Radiation (UVA+UVB) on Young Gametophytes of *Gelidium floridanum*: Growth Rate, Photosynthetic Pigments, Carotenoids, Photosynthetic Performance, and Ultrastructure. *Photochemistry and photobiology*, 90(5), 1050-1060.

- Singh, U., & Singh, B. (1992). Tropical grain legumes as important human foods. *Economic Botany*, 46(3), 310-321.
- Thaler, J. S., Owen, B., & Higgins, V. J. (2004). The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology*, 135(1), 530-538.
- Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 414-429.
- van Schoonhoven, A. (1987). *Standard system for the evaluation of bean germplasm*. CIAT.
- Wordell Filho, J. A., de Freitas, M. B., Stadnik, M. J., & Theodoro, G. F. (2013). Manejo de doenças na cultura do feijão. *Manejo fitossanitário na cultura do feijão*, 9-47.
- Xue, R., Wu, J., Zhu, Z., Wang, L., Wang, X., Wang, S., & Blair, M. W. (2015). Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *PLoS One*, 10(6), e0127698.
- Xue, R., Wu, X., Wang, Y., Zhuang, Y., Chen, J., Wu, J., ... & Blair, M. W. (2017). Hairy root transgene expression analysis of a secretory peroxidase (PvPOX1) from common bean infected by *Fusarium wilt*. *Plant Science*, 260, 1-7.
- Yadeta, K., & Thomma, B. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in plant science*, 4, 97.
- Zvirin, T., Herman, R., Brotman, Y., Denisov, Y., Belausov, E., Freeman, S., & Perl-Treves, R. (2010). Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1· 2. *Plant Pathology*, 59(3), 576-585.

8. ANEXOS



Anexo 1 Ultraestrutura da raiz (A, B) e no hipocótilo (C, D) de plantas suscetíveis (Uirapuru) e resistentes (UFSC-01) não inoculadas aos 9 dias após o tratamento com água. Ap. amiloplasto; M. mitocôndria; Mv, microvacuole; n. núcleo; O. corpo osmofílico; Pw. parede celular primária; Sw. parede celular secundária; Xv. vaso do xilema; Asterisco. Aposição à parede celular.

Anexo 2 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da severidade da doença, altura de planta e percentagem de necrose vascular de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Severidade da doença					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Experimento	1	0.571	0.571	0.80	0.380
Tratamento	1	357.143	357.143	500.00	0.000
Exp*Trat	1	0.571	0.571	0.80	0.380
Erro	24	17.143	0.714		
Altura de planta					
Experimento	1	40.63	40.63	1.37	0.248
Tratamento	3	6071.22	2023.74	68.08	0.000
Exp*Trat	3	209.72	69.91	2.35	0.084
Erro	48	1426.78	29.72		
Percentagem de necrose vascular					
Experimento	1	0.1	0.1	0.00	0.944
Tratamento	1	61586.3	61586.3	3521.72	0.000
Exp*Trat	1	19.8	19.8	1.13	0.298
Erro	24	419.7	17.5		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 3 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de peróxido de hidrogênio na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.000084	0.000084	0.34	0.569
	Tratamento	3	0.001992	0.000664	2.67	0.082
	Exp*Trat	3	0.001184	0.000395	1.59	0.231
	Erro	16	0.003973	0.000248		
1	Experimento	1	0.058776	0.058776	208.93	0.000
	Tratamento	3	0.013210	0.004403	15.65	0.000
	Exp*Trat	3	0.001805	0.000602	2.14	0.135
	Erro	16	0.004501	0.000281		
3	Experimento	1	0.027354	0.027354	161.46	0.000
	Tratamento	3	0.023439	0.007813	46.12	0.000
	Exp*Trat	3	0.001536	0.000512	3.02	0.060
	Erro	16	0.002711	0.000169		
6	Experimento	1	0.012517	0.012517	18.14	0.001
	Tratamento	3	0.035077	0.011692	16.95	0.000
	Exp*Trat	3	0.001404	0.000468	0.68	0.578
	Erro	16	0.011040	0.000690		
9	Experimento	1	0.068684	0.068684	213.16	0.000
	Tratamento	3	0.043760	0.014587	45.27	0.000
	Exp*Trat	3	0.002649	0.000883	2.74	0.078
	Erro	16	0.005155	0.000322		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 4 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de peróxido de hidrogênio no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.003750	0.003750	4.92	0.041
	Tratamento	3	0.001544	0.000515	0.68	0.580
	Exp*Trat	3	0.004583	0.001528	2.00	0.154
	Erro	16	0.012195	0.000762		
1	Experimento	1	0.011301	0.011301	6.91	0.018
	Tratamento	3	0.009312	0.003104	1.90	0.171
	Exp*Trat	3	0.005028	0.001676	1.02	0.408
	Erro	16	0.026181	0.001636		
3	Experimento	1	0.043962	0.043962	20.11	0.000
	Tratamento	3	0.038157	0.012719	5.82	0.007
	Exp*Trat	3	0.001774	0.000591	0.27	0.846
	Erro	16	0.034969	0.002186		
6	Experimento	1	0.02276	0.022762	3.00	0.103
	Tratamento	3	0.10968	0.036562	4.81	0.014
	Exp*Trat	3	0.03702	0.012340	1.62	0.223
	Erro	16	0.12151	0.007595		
9	Experimento	1	0.052006	0.052006	26.67	0.000
	Tratamento	3	0.042373	0.014124	7.24	0.003
	Exp*Trat	3	0.005111	0.001704	0.87	0.475
	Erro	16	0.031198	0.001950		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 5 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de hidroperóxido de lipídios na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.000657	0.000657	17.82	0.001
	Tratamento	3	0.000197	0.000066	1.78	0.191
	Exp*Trat	3	0.000262	0.000087	2.37	0.109
	Erro	16	0.000589	0.000037		
1	Experimento	1	0.000490	0.000490	38.47	0.000
	Tratamento	3	0.000971	0.000324	25.43	0.000
	Exp*Trat	3	0.000073	0.000024	1.92	0.168
	Erro	16	0.000204	0.000013		
3	Experimento	1	0.001664	0.001664	121.54	0.000
	Tratamento	3	0.000368	0.000123	8.96	0.001
	Exp*Trat	3	0.000130	0.000043	3.17	0.053
	Erro	16	0.000219	0.000014		
6	Experimento	1	0.000881	0.000881	22.90	0.000
	Tratamento	3	0.000382	0.000127	3.31	0.047
	Exp*Trat	3	0.000265	0.000088	2.30	0.116
	Erro	16	0.000615	0.000038		
9	Experimento	1	0.000545	0.000545	15.51	0.001
	Tratamento	3	0.000597	0.000199	5.66	0.008
	Exp*Trat	3	0.000158	0.000053	1.50	0.252
	Erro	16	0.000563	0.000035		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 6 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de hidroperóxido de lipídios no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.009224	0.009224	192.95	0.000
	Tratamento	3	0.000328	0.000109	2.29	0.118
	Exp*Trat	3	0.000041	0.000014	0.28	0.836
	Erro	16	0.000765	0.000048		
1	Experimento	1	0.001295	0.001295	16.55	0.001
	Tratamento	3	0.000296	0.000099	1.26	0.322
	Exp*Trat	3	0.000089	0.000030	0.38	0.770
	Erro	16	0.001252	0.000078		
3	Experimento	1	0.005497	0.005497	81.57	0.000
	Tratamento	3	0.001055	0.000352	5.22	0.011
	Exp*Trat	3	0.000168	0.000056	0.83	0.496
	Erro	16	0.001078	0.000067		
6	Experimento	1	0.001639	0.001639	58.07	0.000
	Tratamento	3	0.001134	0.000378	13.39	0.000
	Exp*Trat	3	0.000175	0.000058	2.07	0.145
	Erro	16	0.000452	0.000028		
9	Experimento	1	0.006368	0.006368	204.05	0.000
	Tratamento	3	0.000089	0.000030	0.95	0.440
	Exp*Trat	3	0.000175	0.000058	1.87	0.176
	Erro	16	0.000499	0.000031		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 7 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de malonaldeído na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	1.79438	1.79438	933.64	0.000
	Tratamento	3	0.01498	0.00499	2.60	0.088
	Exp*Trat	3	0.00249	0.00083	0.43	0.734
	Erro	16	0.03075	0.00192		
1	Experimento	1	0.005522	0.005522	74.65	0.000
	Tratamento	3	0.000885	0.000295	3.99	0.027
	Exp*Trat	3	0.000199	0.000066	0.90	0.464
	Erro	16	0.001184	0.000074		
3	Experimento	1	0.004091	0.004091	58.34	0.000
	Tratamento	3	0.000132	0.000044	0.63	0.608
	Exp*Trat	3	0.000246	0.000082	1.17	0.352
	Erro	16	0.001122	0.000070		
6	Experimento	1	0.000001	0.000001	0.04	0.847
	Tratamento	3	0.000185	0.000062	2.03	0.150
	Exp*Trat	3	0.000101	0.000034	1.11	0.373
	Erro	16	0.000485	0.000030		
9	Experimento	1	0.000750	0.000750	14.17	0.002
	Tratamento	3	0.000865	0.000288	5.44	0.009
	Exp*Trat	3	0.000166	0.000055	1.04	0.401
	Erro	16	0.000847	0.000053		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 8 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de malonaldeído no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.000263	0.000263	1.87	0.190
	Tratamento	3	0.001030	0.000343	2.45	0.102
	Exp*Trat	3	0.000608	0.000203	1.44	0.267
	Erro	16	0.002246	0.000140		
1	Experimento	1	0.040352	0.040352	411.76	0.000
	Tratamento	3	0.006847	0.002282	23.29	0.000
	Exp*Trat	3	0.000548	0.000183	1.87	0.176
	Erro	16	0.001568	0.000098		
3	Experimento	1	0.037395	0.037395	753.97	0.000
	Tratamento	3	0.003558	0.001186	23.91	0.000
	Exp*Trat	3	0.000087	0.000029	0.58	0.634
	Erro	16	0.000794	0.000050		
6	Experimento	1	0.020463	0.020463	138.45	0.000
	Tratamento	3	0.003945	0.001315	8.90	0.001
	Exp*Trat	3	0.001168	0.000389	2.63	0.085
	Erro	16	0.002365	0.000148		
9	Experimento	1	0.004663	0.004663	42.36	0.000
	Tratamento	3	0.003753	0.001251	11.36	0.000
	Exp*Trat	3	0.000192	0.000064	0.58	0.636
	Erro	16	0.001761	0.000110		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 9 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de dienos conjugado na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.603308	0.603308	189.44	0.000
	Tratamento	3	0.000848	0.000283	0.09	0.965
	Exp*Trat	3	0.010145	0.003382	1.06	0.393
	Erro	16	0.050954	0.003185		
1	Experimento	1	0.137547	0.137547	91.10	0.000
	Tratamento	3	0.107899	0.035966	23.82	0.000
	Exp*Trat	3	0.005547	0.001849	1.22	0.333
	Erro	16	0.024158	0.001510		
3	Experimento	1	0.18000	0.180004	59.30	0.000
	Tratamento	3	0.09300	0.031002	10.21	0.001
	Exp*Trat	3	0.01909	0.006365	2.10	0.141
	Erro	16	0.04856	0.003035		
6	Experimento	1	0.035343	0.035343	26.30	0.000
	Tratamento	3	0.121379	0.040460	30.11	0.000
	Exp*Trat	3	0.005684	0.001895	1.41	0.276
	Erro	16	0.021498	0.001344		
9	Experimento	1	0.185949	0.185949	59.83	0.000
	Tratamento	3	0.184251	0.061417	19.76	0.000
	Exp*Trat	3	0.004981	0.001660	0.53	0.665
	Erro	16	0.049724	0.003108		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 10 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de dienos conjugado no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.761499	0.761499	179.17	0.000
	Tratamento	3	0.002395	0.000798	0.19	0.903
	Exp*Trat	3	0.014341	0.004780	1.12	0.369
	Erro	16	0.068001	0.004250		
1	Experimento	1	0.109708	0.109708	40.55	0.000
	Tratamento	3	0.002113	0.000704	0.26	0.853
	Exp*Trat	3	0.001922	0.000641	0.24	0.869
	Erro	16	0.043288	0.002706		
3	Experimento	1	0.229058	0.229058	205.29	0.000
	Tratamento	3	0.001820	0.000607	0.54	0.659
	Exp*Trat	3	0.005972	0.001991	1.78	0.191
	Erro	16	0.017853	0.001116		
6	Experimento	1	0.140804	0.140804	178.38	0.000
	Tratamento	3	0.037866	0.012622	15.99	0.000
	Exp*Trat	3	0.003092	0.001031	1.31	0.307
	Erro	16	0.012629	0.000789		
9	Experimento	1	0.263052	0.263052	69.46	0.000
	Tratamento	3	0.046402	0.015467	4.08	0.025
	Exp*Trat	3	0.001138	0.000379	0.10	0.959
	Erro	16	0.060593	0.003787		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 11 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de trienos conjugado na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.25798	0.257985	47.81	0.000
	Tratamento	3	0.01362	0.004539	0.84	0.491
	Exp*Trat	3	0.01521	0.005069	0.94	0.445
	Erro	16	0.08633	0.005396		
1	Experimento	1	0.294399	0.294399	87.22	0.000
	Tratamento	3	0.005035	0.001678	0.50	0.689
	Exp*Trat	3	0.008275	0.002758	0.82	0.503
	Erro	16	0.054009	0.003376		
3	Experimento	1	2.14337	2.14337	1898.45	0.000
	Tratamento	3	0.05811	0.01937	17.16	0.000
	Exp*Trat	3	0.01078	0.00359	3.18	0.053
	Erro	16	0.01806	0.00113		
6	Experimento	1	1.39048	1.39048	258.12	0.000
	Tratamento	3	0.17523	0.05841	10.84	0.000
	Exp*Trat	3	0.01746	0.00582	1.08	0.385
	Erro	16	0.08619	0.00539		
9	Experimento	1	0.49284	0.492842	76.85	0.000
	Tratamento	3	0.11910	0.039701	6.19	0.005
	Exp*Trat	3	0.01154	0.003847	0.60	0.624
	Erro	16	0.10261	0.006413		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 12 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos do conteúdo de trienos conjugado no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.028739	0.028739	11.10	0.004
	Tratamento	3	0.003588	0.001196	0.46	0.713
	Exp*Trat	3	0.005451	0.001817	0.70	0.565
	Erro	16	0.041410	0.002588		
1	Experimento	1	0.209571	0.209571	45.38	0.000
	Tratamento	3	0.048655	0.016218	3.51	0.040
	Exp*Trat	3	0.004409	0.001470	0.32	0.812
	Erro	16	0.073891	0.004618		
3	Experimento	1	0.643696	0.643696	102.20	0.000
	Tratamento	3	0.003836	0.001279	0.20	0.893
	Exp*Trat	3	0.007878	0.002626	0.42	0.743
	Erro	16	0.100775	0.006298		
6	Experimento	1	1.41091	1.41091	279.76	0.000
	Tratamento	3	0.05407	0.01802	3.57	0.038
	Exp*Trat	3	0.03312	0.01104	2.19	0.129
	Erro	16	0.08069	0.00504		
9	Experimento	1	1.14348	1.14348	93.66	0.000
	Tratamento	3	0.00295	0.00098	0.08	0.970
	Exp*Trat	3	0.01952	0.00651	0.53	0.666
	Erro	16	0.19535	0.01221		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 13 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de ascorbato peroxidase na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.000128	0.000128	9.28	0.008
	Tratamento	3	0.000035	0.000012	0.85	0.485
	Exp*Trat	3	0.000015	0.000005	0.37	0.773
	Erro	16	0.000220	0.000014		
1	Experimento	1	0.002922	0.002922	130.09	0.000
	Tratamento	3	0.000336	0.000112	4.99	0.012
	Exp*Trat	3	0.000126	0.000042	1.87	0.176
	Erro	16	0.000359	0.000022		
3	Experimento	1	0.001584	0.001584	26.94	0.000
	Tratamento	3	0.005361	0.001787	30.39	0.000
	Exp*Trat	3	0.000404	0.000135	2.29	0.117
	Erro	16	0.000941	0.000059		
6	Experimento	1	0.002408	0.002408	41.43	0.000
	Tratamento	3	0.004826	0.001609	27.67	0.000
	Exp*Trat	3	0.000284	0.000095	1.63	0.222
	Erro	16	0.000930	0.000058		
9	Experimento	1	0.000132	0.000132	4.72	0.045
	Tratamento	3	0.000067	0.000022	0.80	0.514
	Exp*Trat	3	0.000216	0.000072	2.57	0.091
	Erro	16	0.000449	0.000028		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 14 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de ascorbato peroxidase no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.000073	0.000073	23.14	0.000
	Tratamento	3	0.000003	0.000001	0.28	0.838
	Exp*Trat	3	0.000013	0.000004	1.34	0.295
	Erro	16	0.000050	0.000003		
1	Experimento	1	0.001096	0.001096	60.24	0.000
	Tratamento	3	0.000096	0.000032	1.76	0.195
	Exp*Trat	3	0.000135	0.000045	2.47	0.099
	Erro	16	0.000291	0.000018		
3	Experimento	1	0.002717	0.002717	35.36	0.000
	Tratamento	3	0.003393	0.001131	14.72	0.000
	Exp*Trat	3	0.000615	0.000205	2.67	0.083
	Erro	16	0.001229	0.000077		
6	Experimento	1	0.000351	0.000351	4.48	0.050
	Tratamento	3	0.001844	0.000615	7.84	0.002
	Exp*Trat	3	0.000334	0.000111	1.42	0.273
	Erro	16	0.001254	0.000078		
9	Experimento	1	0.000063	0.000063	2.20	0.157
	Tratamento	3	0.001648	0.000549	19.18	0.000
	Exp*Trat	3	0.000094	0.000031	1.09	0.380
	Erro	16	0.000458	0.000029		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 15 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de catalase na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.000000	0.000000	0.03	0.858
	Tratamento	3	0.000044	0.000015	1.09	0.381
	Exp*Trat	3	0.000025	0.000008	0.61	0.617
	Erro	16	0.000216	0.000013		
1	Experimento	1	0.000374	0.000374	12.20	0.003
	Tratamento	3	0.000308	0.000103	3.36	0.045
	Exp*Trat	3	0.000093	0.000031	1.01	0.413
	Erro	16	0.000490	0.000031		
3	Experimento	1	0.001409	0.001409	84.28	0.000
	Tratamento	3	0.000313	0.000104	6.25	0.005
	Exp*Trat	3	0.000013	0.000004	0.26	0.854
	Erro	16	0.000268	0.000017		
6	Experimento	1	0.011943	0.011943	173.21	0.000
	Tratamento	3	0.003333	0.001111	16.11	0.000
	Exp*Trat	3	0.000657	0.000219	3.18	0.053
	Erro	16	0.001103	0.000069		
9	Experimento	1	0.001096	0.001096	7.61	0.014
	Tratamento	3	0.003138	0.001046	7.26	0.003
	Exp*Trat	3	0.000899	0.000300	2.08	0.143
	Erro	16	0.002304	0.000144		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 16 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de catalase no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.000039	0.000039	5.79	0.029
	Tratamento	3	0.000009	0.000003	0.44	0.726
	Exp*Trat	3	0.000020	0.000007	0.99	0.425
	Erro	16	0.000108	0.000007		
1	Experimento	1	0.000085	0.000085	6.55	0.021
	Tratamento	3	0.000141	0.000047	3.60	0.037
	Exp*Trat	3	0.000055	0.000018	1.42	0.275
	Erro	16	0.000209	0.000013		
3	Experimento	1	0.000494	0.000494	20.76	0.000
	Tratamento	3	0.000755	0.000252	10.58	0.000
	Exp*Trat	3	0.000162	0.000054	2.27	0.120
	Erro	16	0.000381	0.000024		
6	Experimento	1	0.000376	0.000376	11.91	0.003
	Tratamento	3	0.002937	0.000979	30.97	0.000
	Exp*Trat	3	0.000125	0.000042	1.32	0.304
	Erro	16	0.000506	0.000032		
9	Experimento	1	0.000027	0.000027	0.66	0.429
	Tratamento	3	0.000526	0.000175	4.28	0.021
	Exp*Trat	3	0.000065	0.000022	0.53	0.669
	Erro	16	0.000655	0.000041		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 17 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de lipoxigenase (ácido linoleico) na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.001357	0.001357	11.48	0.004
	Tratamento	3	0.016602	0.005534	46.84	0.000
	Exp*Trat	3	0.000427	0.000142	1.20	0.340
	Erro	16	0.001891	0.000118		
1	Experimento	1	0.011766	0.011766	67.31	0.000
	Tratamento	3	0.008535	0.002845	16.28	0.000
	Exp*Trat	3	0.001339	0.000446	2.55	0.092
	Erro	16	0.002797	0.000175		
3	Experimento	1	0.003624	0.003624	17.18	0.001
	Tratamento	3	0.012991	0.004330	20.53	0.000
	Exp*Trat	3	0.001204	0.000401	1.90	0.170
	Erro	16	0.003374	0.000211		
6	Experimento	1	0.004052	0.004052	63.15	0.000
	Tratamento	3	0.005106	0.001702	26.52	0.000
	Exp*Trat	3	0.000419	0.000140	2.17	0.131
	Erro	16	0.001027	0.000064		
9	Experimento	1	0.038107	0.038107	465.86	0.000
	Tratamento	3	0.001141	0.000380	4.65	0.016
	Exp*Trat	3	0.000273	0.000091	1.11	0.373
	Erro	16	0.001309	0.000082		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 18 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de lipoxigenase (ácido linoleico) no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.007135	0.007135	32.51	0.000
	Tratamento	3	0.001077	0.000359	1.64	0.221
	Exp*Trat	3	0.000262	0.000087	0.40	0.756
	Erro	16	0.003511	0.000219		
1	Experimento	1	0.004835	0.001612	4.75	0.015
	Tratamento	3	0.010823	0.010823	31.87	0.000
	Exp*Trat	3	0.001949	0.000650	1.91	0.168
	Erro	16	0.005433	0.000340		
3	Experimento	1	0.002860	0.000953	9.66	0.001
	Tratamento	3	0.056791	0.056791	575.62	0.000
	Exp*Trat	3	0.000704	0.000235	2.38	0.108
	Erro	16	0.001579	0.000099		
6	Experimento	1	0.001982	0.000661	6.35	0.005
	Tratamento	3	0.000079	0.000079	0.76	0.395
	Exp*Trat	3	0.000369	0.000123	1.18	0.348
	Erro	16	0.001664	0.000104		
9	Experimento	1	0.000082	0.000082	0.53	0.475
	Tratamento	3	0.004724	0.001575	10.26	0.001
	Exp*Trat	3	0.000166	0.000055	0.36	0.783
	Erro	16	0.002456	0.000154		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 19 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de lipoxigenase (ácido linolênico) na raiz de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.000295	0.000295	5.19	0.037
	Tratamento	3	0.010028	0.003343	58.91	0.000
	Exp*Trat	3	0.000258	0.000086	1.52	0.248
	Erro	16	0.000908	0.000057		
1	Experimento	1	0.001572	0.001572	12.28	0.003
	Tratamento	3	0.006892	0.002297	17.94	0.000
	Exp*Trat	3	0.000413	0.000138	1.08	0.387
	Erro	16	0.002049	0.000128		
3	Experimento	1	0.002712	0.002712	19.69	0.000
	Tratamento	3	0.005449	0.001816	13.19	0.000
	Exp*Trat	3	0.000885	0.000295	2.14	0.135
	Erro	16	0.002203	0.000138		
6	Experimento	1	0.003217	0.003217	21.24	0.000
	Tratamento	3	0.003510	0.001170	7.72	0.002
	Exp*Trat	3	0.000990	0.000330	2.18	0.130
	Erro	16	0.002424	0.000151		
9	Experimento	1	0.000406	0.000406	7.41	0.015
	Tratamento	3	0.000253	0.000084	1.54	0.243
	Exp*Trat	3	0.000045	0.000015	0.27	0.843
	Erro	16	0.000876	0.000055		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.

Anexo 20 Análise de variância fatorial (ANOVA) entre experimentos da atividade de lipoxigenase (ácido linolênico) no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes aos 0, 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

<i>dai</i>	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
0	Experimento	1	0.001672	0.001672	16.60	0.001
	Tratamento	3	0.001217	0.000406	4.03	0.026
	Exp*Trat	3	0.000222	0.000074	0.73	0.547
	Erro	16	0.001612	0.000101		
1	Experimento	1	0.001763	0.001763	7.62	0.014
	Tratamento	3	0.001721	0.000574	2.48	0.099
	Exp*Trat	3	0.000840	0.000280	1.21	0.338
	Erro	16	0.003705	0.000232		
3	Experimento	1	0.053787	0.053787	125.53	0.000
	Tratamento	3	0.002530	0.000843	1.97	0.159
	Exp*Trat	3	0.001146	0.000382	0.89	0.467
	Erro	16	0.006856	0.000428		
6	Experimento	1	0.008886	0.008886	32.26	0.000
	Tratamento	3	0.005630	0.001877	6.81	0.004
	Exp*Trat	3	0.001343	0.000448	1.63	0.223
	Erro	16	0.004406	0.000275		
9	Experimento	1	0.011826	0.011826	59.12	0.000
	Tratamento	3	0.052755	0.017585	87.91	0.000
	Exp*Trat	3	0.001113	0.000371	1.85	0.178
	Erro	16	0.003201	0.000200		

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de $F_c > F$ esperado; *dai*: dias após a inoculação; Exp: experimento; Trat: tratamento.