



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Ana Carolina Silva Galdino

**Alterações quantitativas de compostos fenólicos e flavonoides do feijoeiro
(*Phaseolus vulgaris* L.) após a infecção por *Fusarium oxysporum***

Florianópolis
2020

Ana Carolina Silva Galdino

**Alterações quantitativas de compostos fenólicos e flavonoides do feijoeiro
(*Phaseolus vulgaris* L.) após a infecção por *Fusarium oxysporum***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Marciel J. Stadnik, Dr.

Florianópolis
2020

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

Galdino, Ana Carolina Silva

Alterações quantitativas de compostos fenólicos e flavonoides do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) após a infecção por *Fusarium oxysporum* / Ana Carolina Silva Galdino ; orientador, Marciel J. Stadnik, 2020.

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Resistência genética. 3. Feijão. 4. *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli. I. Stadnik, Marciel J. . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Ana Carolina Silva Galdino

**Alterações quantitativas de compostos fenólicos e flavonoides do feijoeiro
(*Phaseolus vulgaris* L.) após a infecção por *Fusarium oxysporum***

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Franceli Rodrigues Kulcheski, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Robson Marcelo Di Piero, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Aline Cristina Velho
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências.

Prof. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais

Prof. Marciel J. Stadnik, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marciel J. Stadnik pela oportunidade.

Ao Dr. Mateus B. de Freitas, por toda ajuda, ensinamentos, orientação, amizade e confiança. O laboratório e nossas vidas são mais alegres com sua presença.

À Paula Astolfi, pela amizade, sabedoria, ajuda ao longo dessa jornada e por ser quem é.

Ao Marlon C. de Borba, pela confiança, auxílio durante os experimentos e conhecimento transmitido.

Aos integrantes do Labfitop pela ajuda, alegrias diárias, companheirismo e conhecimento compartilhado. Vocês tornaram essa experiência especial.

Aos meu pais, Andréa C. Sanches e José A. Galdino, pelo apoio incondicional, amor, sabedoria, paciência e equilíbrio emocional. Sem eles eu não seria ninguém na vida.

Aos meus irmãos, Carlos H. Galdino e Maria Laura Galdino, pelo apoio, amor, amizade e companheirismo. A vida é melhor quando compartilhada.

À Ana Marina Pedrolo, minha irmã de coração, pela amizade de longa data, compreensão, carinho e suporte. Meus dias são mais felizes com você.

Aos demais familiares que torceram por mim e sempre me apoiaram.

“The harder the rain, honey, sweeter the sun.”

– HOZIER-BYRNE, Andrew, 2019.

Alterações quantitativas de compostos fenólicos e flavonoides do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) após a infecção por *Fusarium oxysporum*

RESUMO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa amplamente produzida no Brasil e no mundo, apresentando grande importância socioeconômica devido seu elevado teor de nutrientes e proteínas. Porém, sua produção é limitada por diversos fatores abióticos e bióticos. Dentre os fatores bióticos, destaca-se a Murcha de Fusarium causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). Esta é uma das principais doenças acometem o feijão e vem se tornando um problema crescente devido ao plantio sucessivo em áreas de monocultura, sendo responsável por perdas de até 100% na produção. Os mecanismos de defesa vegetal contra patógenos são diversos e incluem barreiras físicas e bioquímicas, como a produção de diversos metabólitos secundários incluindo compostos com atividade antimicrobiana produzidos após a indução por um elicitor biótico ou abiótico, também conhecidos como fitoalexinas. O objetivo deste trabalho foi examinar as alterações na produção de metabólitos da rota dos fenilpropanoides e a colonização vascular ao longo do tempo em plantas de feijão suscetíveis e resistentes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). A inoculação foi realizada através da imersão do sistema radicular de plantas de feijão suscetível (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01) em uma suspensão de macroconídios de *Fop*. A amostragem foi feita aos 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação (dai) para as análises bioquímicas (conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, faseolina, compostos com atividade antimicrobiana, lignina e ergosterol) e aos 30 dai para a avaliação da severidade e necrose vascular. O conteúdo de compostos fenólicos totais em raízes e hipocótilos reduziu ao longo do tempo. O conteúdo de flavonoides totais no hipocótilo aumentou ao longo do tempo e não sofreu alterações nas raízes. O hipocótilo das plantas apresentou aproximadamente o dobro do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais do que as raízes. Ao 1 dai, o conteúdo de fenólicos totais foi significativamente maior no hipocótilo do genótipo resistente inoculado e não inoculado quando comparado com o genótipo suscetível inoculado com *Fop*. O conteúdo de flavonoides totais no hipocótilo do UFSC-01 não inoculado foi significativamente maior em relação ao hipocótilo do cv. Uirapuru inoculado e não inoculado com *Fop* ao 1 dai. O conteúdo de faseolina em raízes e hipocótilos diminuiu ao longo do tempo e foi diferente estatisticamente quando comparado os tipos de tecido vegetal. Não foi detectado compostos com atividade antimicrobiana contra *A. brassicicola* após a bioautografia. Nas raízes, o conteúdo de lignina foi diferente estatisticamente entre os 1 e 9 dai, enquanto no hipocótilo permaneceu o mesmo. O conteúdo de ergosterol aumentou nas raízes até o 6 dai e não variou no hipocótilo. Os primeiros sintomas da doença foram observados aos 14 dai e aos 30 dai a porcentagem de necrose vascular em plantas suscetíveis foi 6 vezes maior do que em plantas resistentes.

Palavras chave: compostos fenólicos, flavonoides, faseolina, resistência genética, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Quantitative changes of phenolic compounds and flavonoid of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) after infection with *Fusarium oxysporum*

ABSTRACT

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a leguminous vegetable widely produced in Brazil and in the world, that presents a large socioeconomic importance due to its high nutrient and protein content. However, bean production is limited by several abiotic and biotic factors. Among the biotic factors, Fusarium wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) stands out. This is one of the main diseases that affect beans and has become a growing problem in monoculture areas due to successive planting, being responsible for losses of up to 100% in production. The defense plant mechanisms against pathogens are diverse and include physical and biochemical barriers, such as the production of several secondary metabolites, including compounds with antimicrobial activity synthesized after induction by a biotic or abiotic elicitor, known as phytoalexins. The objective of this work was to study the alterations in the production of metabolites derived from the phenylpropanoid pathway and the vascular colonization over time in susceptible and resistant common bean plants after inoculation with *Fop*. Inoculation was performed by immersing the root system of the susceptible (cv. Uirapuru) and resistant (UFSC-01) bean plants in a macroconidium suspension of *Fop*. Sampling was done at 1, 3, 6 and 9 days after inoculation (dai) for biochemical analysis (content of total phenolic compounds, total flavonoids, phaseolin, antimicrobial compounds, lignin and ergosterol) and at 30 dai for disease severity and vascular necrosis.

The total phenolic compounds content in roots and hypocotyls decreased over time. The total flavonoids content in the hypocotyl increased over time and did not change in the roots. The hypocotyl of the plants showed approximately twice the content of total phenolic compounds and total flavonoids than the roots. At 1 dai, the total phenolic content was significantly higher in the hypocotyl of the resistant genotype inoculated and not inoculated when compared with the susceptible genotype inoculated with *Fop*. The total flavonoids content in the hypocotyl of UFSC-01 uninoculated was significantly higher in relation to the hypocotyl of cv. Uirapuru inoculated and not inoculated with *Fop* at 1 dai. The content of phaseolin in roots and hypocotyls decreased over time and was statistically different when compared the types of plant tissue. No compounds with antimicrobial activity against *A. brassicicola* were detected after bioautography. In the roots, the lignin content was statistically different between 1 and 9 dai, while in the hypocotyl it remained the same. Ergosterol content increased in roots until 6 dai and did not vary in the hypocotyl. The first disease symptoms were observed at 14 dai and at 30 dai the percentage of vascular necrosis in susceptible plants was 6 times higher than in resistant plants.

Keywords: phenolic compounds, flavonoids, phytoalexins, genetic resistance, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	17
Figura 2. Estádios fenológicos do feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	18
Figura 3. Esporos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	21
Figura 4. Sintomas externos da murcha de Fusarium em plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	23
Figura 5. Ciclo de relação patógeno hospedeiro de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	24
Figura 6. Estrutura geral dos flavonoides.....	28
Figura 7. Rota biossintética e metabólitos na produção de fitoalexinas.....	31
Figura 8. Biossíntese de fitoalexinas derivadas da rota dos fenilpropanoides em Fabaceae ..	32
Figura 9. Representação das regiões de tecido vegetal utilizada nos experimentos.	36
Figura 10. Conteúdo de compostos fenólicos totais (µg EAG g-1 peso fresco) em hipocótilo e raiz de plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	41
Figura 11. Conteúdo de flavonoides totais (µg EQ g-1 peso fresco) em hipocótilo e raiz de plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	43
Figura 12. Conteúdo de faseolina (ABS g-1 peso fresco) em hipocótilo e raiz de plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	44
Figura 13. Bioautografia de extratos de raiz e hipocótilo de plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	46
Figura 14. Conteúdo de ergosterol (µg g-1 peso seco) em hipocótilo e raiz de plantas suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	48
Figura 15. Evolução da murcha de Fusarium ao longo do tempo (A) e sintomas externos da doença aos 30 dai (B) em plantas suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	49
Figura 16. Necrose (A) e descoloração vascular (B) em plantas suscetível (a - Uirapuru não inoculado; b -Uirapuru + <i>Fop</i>) e resistente (c - UFSC-01 não inoculado; d - UFSC-01 + <i>Fop</i>) de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) aos 30 dias após a inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Escala CIAT para a severidade da Murcha de Fusarium	40
Tabela 2. Slope da análise de regressão do conteúdo de faseolina em raiz e hipocótilo de plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	45
Tabela 3. Conteúdo de lignina (mg lignina mg ⁻¹ peso seco) em raiz e hipocótilo de plantas de feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) 1 e 9 dias após a inoculação <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA – Batata Dextrose Ágar

dai – dias após a inoculação

ETI – Imunidade induzida por efetores (Effector triggered immunity)

Fop – *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

MAMP - Padrão molecular associado a micróbio (Microbe associated molecular pattern)

MTI – Imunidade induzida por micróbio (Microbe triggered immunity)

PAMP – Padrão molecular associado a patógenos (Pathogen associated molecular pattern)

PTI – Imunidade induzida por patógeno (Pathogen triggered immunity)

TLC – Cromatografia de camada delgada (Thin layer cromathography)

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Geral	16
2.2. Específicos	16
3. HIPÓTESE	16
4. REVISÃO DA LITERATURA	17
4.1. Cultura do feijão	17
4.1.1. Características gerais	17
4.1.2. Produtividade e papel socioeconômico	19
4.1.3. Principais doenças	19
4.2. Murcha de Fusarium	20
4.2.1. Ocorrência	20
4.2.2. Etiologia	21
4.2.3. Taxonomia	22
4.2.4. Sintomatologia	22
4.2.5. Ciclo de relação patógeno hospedeiro	23
4.3. Mecanismos de defesa da planta	26
4.3.1. Compostos fenólicos	27
4.3.2. Flavonoides	28
4.3.2.1. Fitoalexinas	29
4.3.2.1.1. Fitoalexinas em Fabaceae	32
4.3.2.1.1.1. Faseolina	32
4.4. Lignina	33
4.5. Ergosterol	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1. Material biológico	34
5.2. Condições de cultivo de plântulas	35
5.3. Inoculação	35
5.4. Amostragem	36
5.5. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais	36
5.6. Determinação de faseolina	37
5.7. Detecção de compostos com atividade antimicrobiana	38
5.8. Determinação do conteúdo de lignina	38
5.9. Determinação do conteúdo de ergosterol	39
5.10. Avaliação da severidade da doença e da necrose vascular	39
5.11. Delineamento experimental	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Compostos fenólicos totais	41
6.2. Conteúdo de flavonoides totais	42
6.3. Conteúdo de faseolina	43
6.4. Detecção de compostos com atividade antimicrobiana	45
6.5. Conteúdo de lignina	46
6.6. Conteúdo de ergosterol	47
6.7. Severidade da doença e necrose vascular	48
7. DISCUSSÃO	50
8. CONCLUSÃO	54

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
10. APÊNDICES	66
10.1. Apêndice A	66
10.2. Apêndice B	67
10.3. Apêndice C	68
10.4. Apêndice D	69
10.5. Apêndice E	70
10.6. Apêndice F	71
10.7. Apêndice G	72

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais consumidas no mundo, considerada uma rica fonte de nutrientes e proteínas de grande importância socioeconômica (CRUZ et al., 1974; BATISTA et al., 2017). Os principais produtores a nível mundial são a Índia, Myanmar e Brasil (FAO, 2019). No Brasil, a produção ultrapassou 3 milhões de toneladas na safra de 2018/19 (CONAB, 2019). Porém, fatores limitantes como a fertilidade do solo, estado inicial de plântulas, sistema de cultivo e manejo de plantas daninhas, pragas e doenças (WORDELL FILHO et al., 2013), apresentam ameaças ao seu rendimento.

Entre as doenças que podem afetar a produção de feijão, destaca-se a Murcha de Fusarium, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *phaseoli* Kendrick e Synder (*Fop*), que vem se tornando um problema crescente devido ao plantio sucessivo em áreas de monocultura em diversos países produtores da cultura (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990; WORDELL FILHO et al., 2013; XUE et al., 2015). Os sintomas externos da doença incluem murcha, clorose foliar, desfolha prematura das folhas mais velhas e necrose do tecido vascular, o que pode levar amorte da planta (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987; BURUCHARA; CAMACHO, 2000; XUE et al., 2013). Seu desenvolvimento é favorecido por temperaturas amenas e alta umidade de solo, podendo ocasionar redução de mais de 80% no rendimento de cultivares suscetíveis (SARTORATO; RAVA, 1994; FIALHO et al., 2015).

O controle da Murcha de Fusarium é difícil, uma vez que o fungo apresenta ampla variabilidade genética e pode sobreviver saprofiticamente em restos culturais ou por longos períodos de tempo na ausência do hospedeiro através de estruturas de resistência (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990; DHINGRA et al., 2006; YADETTA; THOMMA, 2013). Atualmente, os principais métodos de controle envolvem a rotação de culturas e o uso de genótipos resistentes, porém ainda é escasso o número de materiais resistentes disponível comercialmente (BURUCHARA; CAMACHO, 2000; SCHWARTZ et al., 2005; de BORBA et al. 2017). Portanto, é imprescindível a identificação e caracterização de materiais resistente à Murcha de Fusarium.

Plantas são continuamente desafiadas por patógenos, incluindo os de solo, e por isso desenvolveram diversas estratégias de defesa contra o ataque destes microrganismos, como a imunidade inata, barreiras pré- e pós-formadas (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Os compostos fenólicos são um dos principais grupos de metabólitos secundários de plantas que possuem importantes funções no seu desenvolvimento e são divididos em subgrupos, sendo os flavonoides os principais compostos fenólicos encontrados em leguminosas (AGUILERA et

al., 2010). Suas funções são diversas na resistência a estresses e incluem a capacidade antioxidante, atuação como quelantes de íons metálicos e como moléculas sinalizadoras. Além disso, podem atuar como moléculas sinalizadoras, afetar o crescimento e desenvolvimento celular, são componentes da rizosfera e matéria orgânica, podem atuar diretamente sobre microrganismos patogênicos e são responsáveis pela coloração de órgãos vegetais (MAKOI; NDAKIDEMI, 2007; FERREYRA et al., 2012; MIERZIAK et al., 2014; FAN; BETA, 2017; KHALID et al., 2019).

Estudos recentes sugerem que uma das estratégias de defesa de plantas contra patógenos de solo são a exsudação de metabólitos pelas raízes, porém, os mecanismos e funções envolvidas nesta estratégia ainda não são completamente conhecidos. Entretanto, seu papel na rizosfera é evidente uma vez que possuem a capacidade repelente a patógenos e atrativa para microrganismos benéficos, são capazes de inibir o crescimento de espécies competidoras e de alterar propriedades do solo (BAIS et al., 2006; LANOUE et al., 2010; de LA PENA et al., 2010; WESTON et al., 2012; CONINCK et al., 2015; KHALID et al., 2019). De uma forma geral, os compostos exsudatos pelas raízes pertencem à classe dos compostos fenólicos e terpenóides, sendo os flavonoides os principais metabólitos derivados da rota dos fenilpropanoides encontrados em tecidos vegetais (LANOUE et al., 2010; CESCO et al., 2010)

Em estudos sobre a interação planta-patógeno no patossistema feijão-*Fop*, autores observaram expressão gênica diferencial, alterações morfológicas e metabólicas relacionadas com mecanismos de defesa da planta neste patossistema (RAMOS et al., 2007; NIÑO-SANCHEZ et al., 2015; XUE et al., 2015; GARCÉS-FIALLOS et al., 2017; de QUADROS et al., 2019). Estes mecanismos de defesa podem ainda incluir o reforço da parede celular, formação de espécies reativas de oxigênio, sinalização da resistência sistêmica adquirida e o acúmulo de substâncias químicas com capacidade antimicrobiana, conhecidas como fitoalexinas (GRAYNER; KOKUBUN, 2001).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi quantificar a produção de compostos sintetizados através da rota dos fenilpropanoides durante a interação feijão - *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a produção de metabólitos da rota dos fenilpropanoides e a colonização vascular ao longo do tempo em plantas de feijão suscetíveis e resistentes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*).

2.2. Específicos

- Quantificar o conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e faseolina em raízes e hipocótilos de plantas de feijão suscetíveis e resistentes a *Fop*;
- Identificar compostos com atividade antimicrobiana presente em raízes e hipocótilos de feijão suscetíveis e resistentes a *Fop* através da bioautografia;
- Quantificar o conteúdo de lignina em raízes de plantas de feijão suscetíveis e resistentes a *Fop*;
- Quantificar a colonização vascular de plantas de feijão suscetíveis e resistentes a *Fop* por meio da determinação do conteúdo de ergosterol;
- Avaliar a severidade da murcha de *Fusarium* em plantas de feijão suscetíveis e resistentes.

3. HIPÓTESE

Existe diferença na produção e acúmulo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, faseolina e lignina em plantas de feijão suscetíveis e resistentes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Colocar avaliação de severidade, evolução da doença.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Cultura do feijão

4.1.1. Características gerais

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (Figura 1) pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*. O gênero *Phaseolus* abrange aproximadamente 55 espécies e cinco são cultivadas. (VILHORDO et al., 1996). É a espécie de maior importância deste gênero e uma das principais fontes de proteína que complementa alimentos ricos em carboidratos, como o arroz, milho e mandioca, sendo fundamental para a nutrição de mais de 500 milhões de pessoas em países em desenvolvimento (GRAHAM; VENCE, 2003).

A origem do feijão é um assunto muito debatido, porém, evidências mostram que a cultura é originária de duas populações selvagens da região da Mesoamérica e Andina, que divergiram de um ancestral comum há mais de 100.000 anos (MAMIDI et al., 2012). Aproximadamente 8.000 anos atrás se deu o início da domesticação independente destas duas populações selvagens, na região hoje conhecida como México e América do Sul, dando origem ao feijão que cultivamos atualmente. (BITOCCHI et al., 2013; SCHMUTZ et al., 2014; VLASOVA et al., 2016).

Figura 1. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)



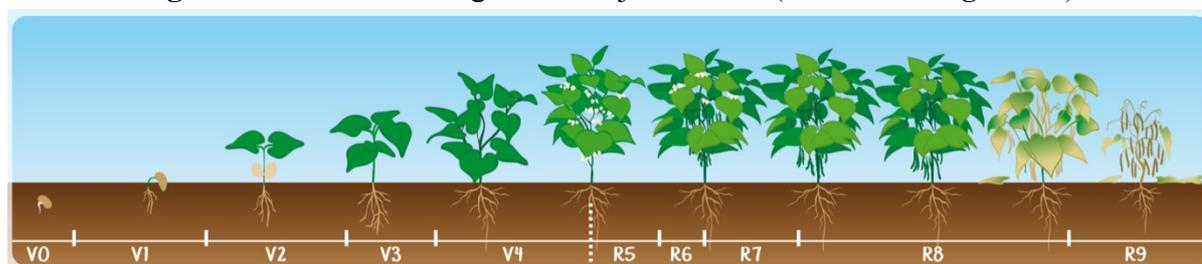
Foto: Ana Carolina Galdino

O feijão é uma planta cujo sistema radicular pivotante atinge aproximadamente 20 cm de comprimento, concentrando a maior parte nos 10 cm superficiais do solo. O seu hábito de crescimento pode ser determinado (ereto) ou indeterminado (semiereto, prostrado e trepador). Seu caule é herbáceo. Suas folhas são pecioladas, trifolioladas e alternas, exceto as primárias que são simples e opostas. As flores, cuja cor pode ser branca, rósea ou violeta, são agrupadas em duas ou mais em um pedúnculo formando a inflorescência. O fruto é uma vagem de formato

reto ou arqueado, cuja coloração varia de verde a marrom de acordo com seu grau de maturação. A semente possui alto teor de carboidratos e proteínas além de ampla variedade de cores, que é utilizada na diferenciação e classificação de cultivares de feijão (VILHORDO et al., 1996; SILVA; COSTA, 2003).

Os estádios fenológicos do feijão comum (Figura 2) são divididos em duas fases: a vegetativa (V) e a reprodutiva (R). A primeira é representada pelos estádios V0, V1, V2, V3 e V4, enquanto a segunda é representada pelos estádios R5, R6, R7, R8 e R9.

Figura 2. Estádios fenológicos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)



Fonte: OLIVEIRA et al., 2018.

O ciclo da cultura varia de 60 a 120 dias, dependendo do genótipo e das condições de cultivo (SANTOS; GAVILAINE, 2006). A época de semeadura do feijão pode ser dividida em três períodos distintos: o feijão das águas (1ª safra), o feijão da seca (2ª safra) e o feijão de inverno (3ª safra). O feijão de 1ª safra é semeado entre agosto até início de dezembro, período que marca o início das chuvas, principalmente na região sul do Brasil, e sua colheita é realizada de novembro a abril. A semeadura de 2ª safra é feita entre janeiro e março em todos os estados brasileiros e sua colheita ocorre entre março e julho. Por fim, a semeadura de 3ª safra é feita de abril a junho, preferencialmente com irrigação suplementar e, sua colheita concentra nos meses de julho a outubro (POSSE et al., 2010; SILVA, 2015)

Diversos fatores climáticos influenciam o desenvolvimento da cultura, sendo a temperatura e precipitação os mais importantes pois em condições ideais, determinam o potencial de produtividade. Regiões com temperatura variando entre 15 a 29°C são consideradas aptas para o plantio, sendo 21°C a temperatura ideal de cultivo. Temperaturas abaixo de 12°C podem reduzir, atrasar ou impedir a germinação de sementes e emergência de plântulas, além de causar abortamento floral. Já as temperaturas acima de 29°C são prejudiciais principalmente durante o florescimento pois causam o abortamento de flores e, conseqüentemente, diminuem o número de vagens por planta (PORTUGAL et al., 2015). A cultura é bastante sensível à falta de água durante a floração, início da formação de vagens e enchimento dos grãos, uma vez que esse déficit afeta diretamente a produção de

fotoassimilados. Geralmente, o requerimento total de água da cultura está entre 250 a 350 mm durante o ciclo vegetativo do feijão (OLIVEIRA et al., 2018).

4.1.2. Produtividade e papel socioeconômico

O feijão desempenha um papel social e econômico importante em diversos países; faz parte da dieta da população brasileira e é composto por um elevado teor de proteínas, aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais. Os principais países produtores são Índia, Myanmar, Brasil, China e Estados Unidos (FAO, 2019). No Brasil, 57,3% do feijão produzido é o carioca, 27,1% é de feijão preto comum e 15,6% é de feijão-caupi. A principal região produtora de feijão é o Sul do Brasil, representando 72% da produção total (EPAGRI, 2019).

O consumo desta leguminosa no Brasil depende da cor e tipo de grão bem como de seus atributos particulares para a culinária nas diferentes regiões do país. O feijão preto é consumido principalmente no Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Distrito Federal, representando 20% do total, enquanto o feijão carioca é tipo mais consumido no Brasil, representando 70% do total, principalmente em São Paulo e demais regiões do país (USDA, 2010). Na safra 2018/19 (Apêndice B) a produção de feijão no Brasil ultrapassou 3 milhões de toneladas, sendo o Paraná o principal Estado produtor, seguido por Minas Gerais e Mato Grosso. Na safra em questão, Santa Catarina foi o 9º maior produtor, com mais de 100 mil toneladas produzidas (CONAB, 2019), sendo 49% da área plantada com feijão preto (EPAGRI, 2019).

4.1.3. Principais doenças

Devido ao fato de que o feijão é cultivado em várias áreas no Brasil, desde regiões de clima temperado a quente, as condições propícias ao cultivo também torna favorável a ocorrência de uma grande diversidade de pragas, plantas daninhas e doenças, que interferem no desenvolvimento e produção da cultura (CARVALHO; PEREIRA, 2015).

Dentre as principais doenças de feijão, pode ser citado a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), mosaico dourado (BGMV) e a Murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), que podem reduzir drasticamente a produtividade da lavoura (WORDELL FILHO et al., 2013).

4.2. Murcha de Fusarium

4.2.1. Ocorrência

O primeiro relato da doença foi feito por Harter na Califórnia/EUA em 1929, onde foi caracterizada por murcha de plantas, amarelecimento, queda das folhas e colonização vascular. Após estudos de patogenicidade foi constatado que tal patógeno poderia ser distinguido de outras *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* que acometiam o feijão e foi proposto o nome *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (KENDRICK; SNYDER, 1942).

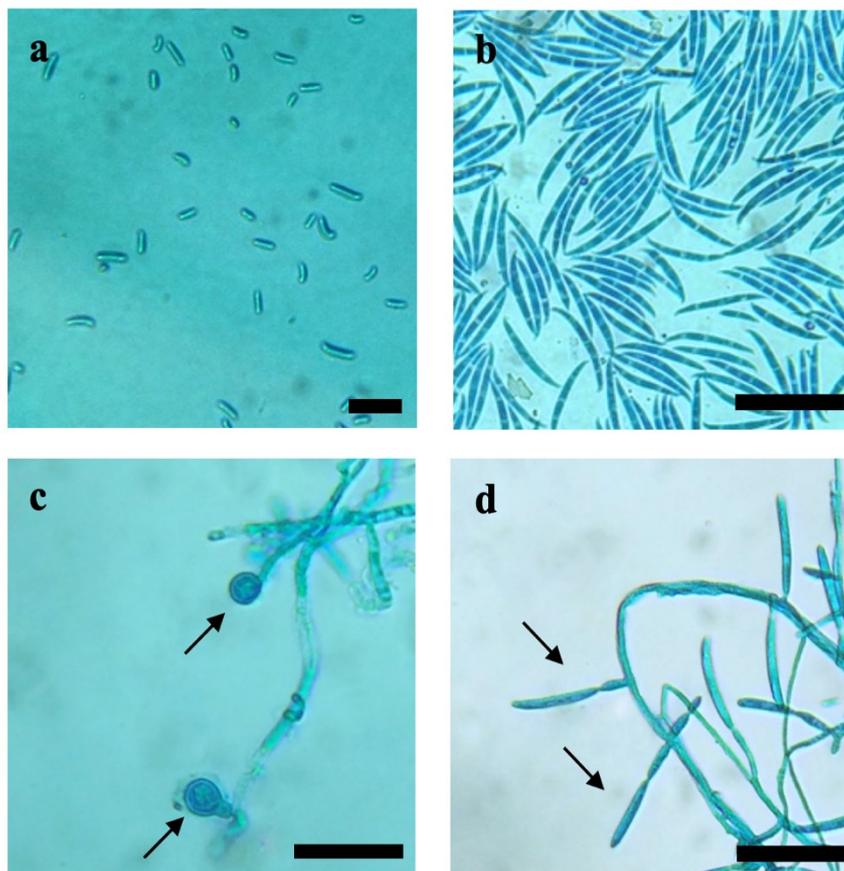
No Brasil, o primeiro relato da doença foi feito da região de Laranjal Paulista/SP, em plantas de feijão da variedade Rosinha por CARDOSO et al. (1966). Em 1974, CRUZ et al. diagnosticaram a doença em cultivos de feijão vagem em Juquiá, Cosmópolis, Campinas, Itariri e Mogi Guaçu no Estado de São Paulo. COSTA et al. (1982) relataram a ocorrência da murcha de Fusarium em áreas experimentais em Alagoas e Pernambuco, e no ano seguinte, MOHAN et al. (1983) relataram sua presença em regiões do Estado do Paraná. Em 1986, foi constatado a ocorrência da doença em Minas Gerais por ZAMBOLIM et al. (1987) e GOULART (1988). No nordeste brasileiro foi observado a ocorrência endêmica da doença por PASTOR-CORRALES e ABAWI (1987) e, em 1990, BALARDIN et al. relataram um aumento significativo da doença em áreas de cultivo de feijão em Santa Catarina.

Atualmente, esta doença é encontrada em todas as regiões produtoras de feijão dado o cultivo sucessivo e poucos cuidados no controle preventivo da mesma, principalmente em áreas de monocultura (WORDELL FILHO et al., 2013). As perdas de produtividade variam de 80 a 100% e estão relacionadas ao nível de infestação, variedade utilizada, as características físicas, químicas e biológicas do solo, bem como condições ambientais (FIALHO et al., 2015).

4.2.2. Etiologia

O agente causal da Murcha de Fusarium é o fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder. Este fungo produz micélio abundante cuja cor pode variar de branco ao violeta, de acordo com a idade da colônia (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os esporos assexuados (Figura 3) são representados por microconídios, macroconídios e clamidósporos. Os microconídios são hialinos, unicelulares, elípticos e produzidos na extremidade dos conidióforos. Os macroconídios são produzidos no ápice do conidióforo, em fiáldes curtas, ou na superfície de esporodóquios (conidióforos agregados em massa unidos pela base) e, possuem formato fusiforme, com extremidade pontiaguda, com 3 a 5 septos, medindo de 3-6 x 25-30 μm . Os clamidósporos são globosos, com parede espessa, podem medir 2-4 x 6-15 μm geralmente abundantes e localizados nas extremidades ou intercaladamente nas hifas, atuando como estruturas de resistência (BIANCHINI et al., 2005; LESLIE; SUMMERELL, 2006; BEDENDO, 2018).

Figura 3. Esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.



Legenda: (a) microconídios; (b) macroconídios; (c) clamidósporos terminais (setas); (d) macroconídios em fiálide (setas). Barra: 20 μm . **Fotos:** Ana Carolina Galdino

4.2.3. Taxonomia

O fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder é classificado da seguinte forma (AGRIOS et al., 2005; GEISER et al., 2013):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Sordariomycetes

Ordem: Hypocreales

Família: Nectriaceae

Gênero: *Fusarium*

Espécie: *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Kendrick & Snyder

Forma especial: *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

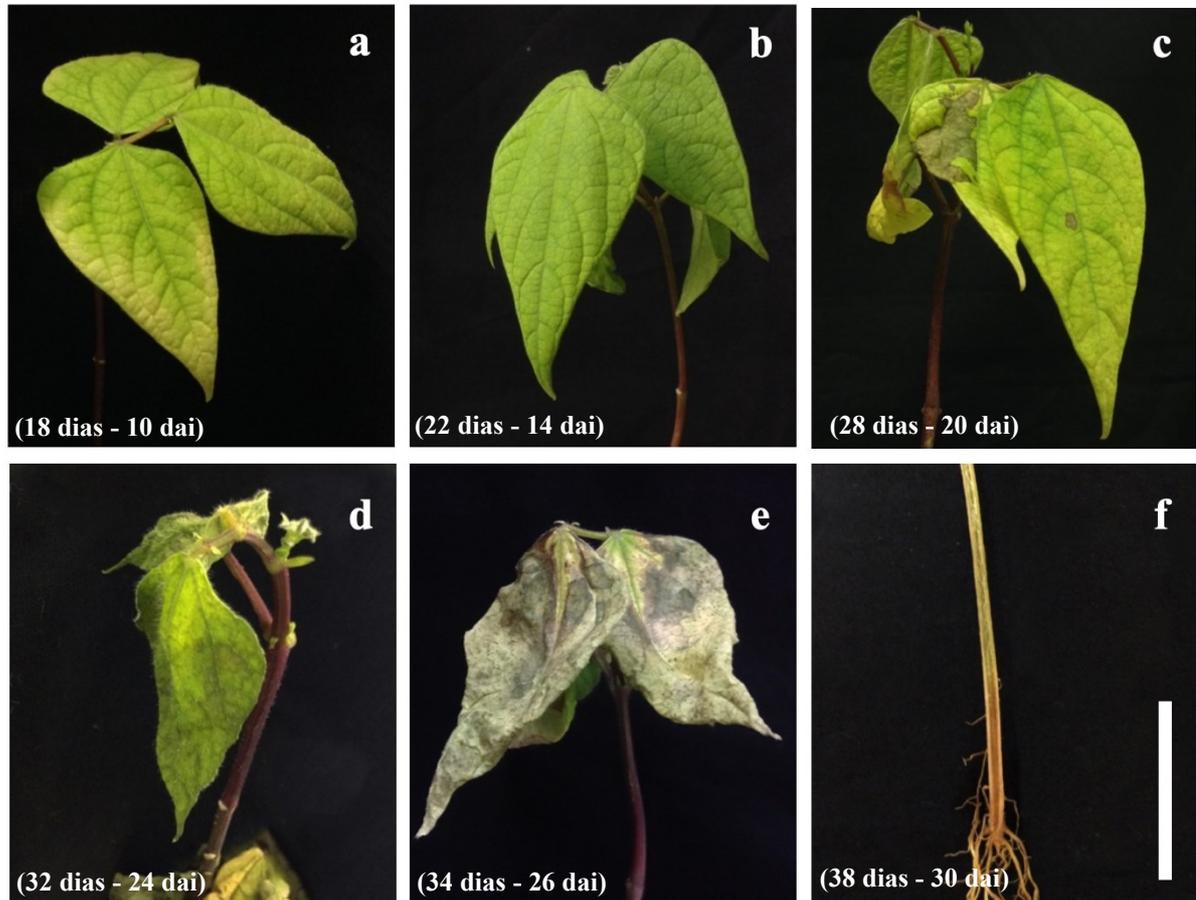
4.2.4. Sintomatologia

Os sintomas (Figura 4) iniciais da doença podem ser observados nas folhas primárias de feijão, a partir dos 10 dias após a inoculação, sendo caracterizados por clorose, murcha, nanismo pronunciado, desfolha completa em algumas plantas, além da descoloração vascular na região da coroa da raiz e hipocótilo, que adquirem uma coloração pardo-avermelhada levando a eventual morte da planta (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987; BURUCHARA; CAMACHO, 2000; WORDELL FILHO, 2013; NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015; XUE et al., 2015).

Como consequência da infecção, as plantas exibem sintomas de forma progressiva nas folhas, iniciando pelas inferiores até alcançar as superiores, sendo facilmente observados nas fases de pré-floração e enchimento de grãos, o que pode ocasionar a produção de vagens vazias (BURUCHARA; CAMACHO, 2000; WORDELL FILHO, 2013). No campo, é possível observar áreas em reboleira com plantas sintomáticas, especialmente em locais recentemente infestados e, quando a infecção é severa, a planta pode secar completamente (WORDELL FILHO, 2013). Em condições de alta umidade relativa do ar pode-se observar a esporulação

rosada do fungo sobre o caule de plantas mortas (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987; BIANCHINI et al., 2005).

Figura 4. Sintomas externos da murcha de *Fusarium* em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)



Legenda: (a) clorose; (b) murcha; (c) necrose foliar; (d) desfolha; (e) morte e (f) necrose vascular. Barra: 2 cm. (idade da planta – dias após a inoculação) Fotos: Ana Carolina Galdino

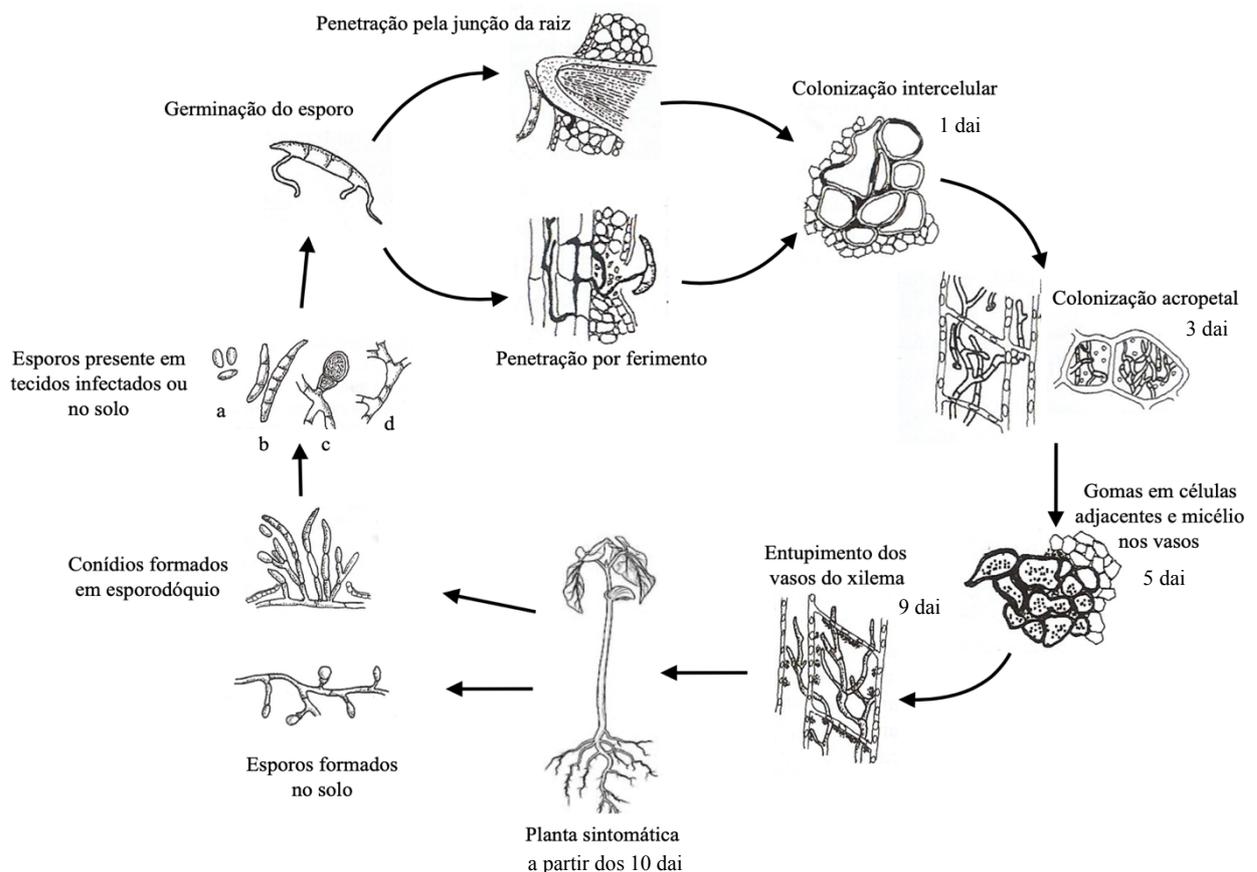
4.2.5. Ciclo de relação patógeno hospedeiro

Patógenos vasculares como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) são caracterizados pela sua capacidade de colonizar o sistema vascular do hospedeiro e obter nutrientes de células do parênquima do xilema (GARCÍA- SÁNCHEZ et al., 2010; NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015; YADETA; THOMMA, 2013).

O ciclo de relação patógeno-hospedeiro (Figura 5) tem início através da germinação de esporos do fungo em resposta aos exsudatos liberados pelas raízes do hospedeiro (YADETA; THOMMA, 2013). A infecção de plantas de feijão ocorre através de ferimentos, aberturas naturais e, preferencialmente, pela junção das raízes laterais e principal (NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015).

Em seguida, as hifas crescem no espaço intercelular da epiderme e córtex da raiz até atingir o xilema (JIMENÉZ-FERNÁNDES et al., 2013; NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015; GARCÉS-FIALLOS et al. 2017; de QUADROS, 2019), iniciando o processo de colonização do sistema vascular e parte aérea, induzindo o aparecimento dos sintomas típicos de murcha vascular (BURUCHARA e CAMACHO, 2000). Devido ao fato de ser um colonizador vascular especializado e por razões ainda desconhecidas, *Fop* acumula uma maior quantidade de micélio em regiões aéreas da planta (NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015) onde esporula produzindo microconídios que, podem ser levados pela seiva da planta para outras regiões da planta, nas quais germinam, produzem hifas, penetram a parede dos vasos do xilema, produzindo microconídios, dando continuidade ao processo de colonização (BECKMAN, 1987; DI PIETRO et al., 2003; GARCÉS-FIALLOS et al. 2017).

Figura 5. Ciclo de relação patógeno hospedeiro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)



Legenda: (a) microconídios; (b) macroconídios; (c) clamidósporos e (d) micélio.

Fonte: adaptado de BENDENO, 2018.

Análises microscópicas de tecidos da raiz e hipocótilo de plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01 feitas por GARCÉS-FIALLOS et al. (2017) e de QUADROS (2019) revelaram o processo de colonização vascular por *Fop*, como segue: ao 1 dai, *Fop* penetrou o tecido hospedeiro através da junção das raízes, foi observado na parede externa de células da epiderme e progrediu para o córtex da raiz onde produziu esporos (conídios e clamidósporos). Aos 3 dai, o fungo atingiu o espaço intercelular das células do córtex da raiz no genótipo UFSC-01 e foi observado o acúmulo de compostos similares a carboidratos e fenólicos. Neste momento, no genótipo Uirapuru o fungo atingiu os espaços intra- e intercelulares dos vasos do xilema. Aos 6 dai, o patógeno havia colonizado vasos do xilema do hipocótilo do genótipo suscetível e as células do xilema das raízes do UFSC-01. Por fim, aos 9 dai células do xilema do cv. Uirapuru foram mais colonizadas do que as do UFSC-01, a destruição de vasos xilemáticos foi observada apenas no genótipo suscetível, o acúmulo de carboidratos e fenólicos aconteceu em ambos genótipos e *Fop* foi observado no xilema do hipocótilo do cv. Uirapuru e UFSC-01. Contudo, em maior intensidade no genótipo suscetível.

Posterior a colonização dos tecidos aéreos, os vasos do xilema colapsam devido ao acúmulo do micélio do fungo, produção de toxinas e respostas de defesa do hospedeiro como géis, gomas, tiloses e outros metabólitos secundários, produzindo uma drástica redução no transporte de água para a parte aérea da planta, acarretando na morte da mesma (DI PIETRO et al., 2003; RONCERO et al., 2003; DIVON et al., 2006; YADETA; THOMMA, 2013; NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015; GARCÉS-FIALLOS et al. 2017; de QUADROS et al., 2019). Após a morte da célula hospedeira em estágios avançados da doença, pode ser observado o desenvolvimento de clamidósporos e macroconídios sobre o tecido hospedeiro, induzidos pela degradação das células hospedeiras e necessidade de nutrientes do fungo (BURUCHARA; CAMACHO, 2000; HALL et al., 2013; NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015).

Além disso, uma massa conidial rosada, constituída principalmente por esporodóquios pode ser observada na superfície do caule de plantas mortas. Estas estruturas podem atuar como fonte de inóculo para plantas sadias adjacentes ou para aumentar o número de propágulos no solo (PASTOR-CORRALES; ABAWI 1987; SALGADO; SCHWARTZ, 1993). Os clamidósporos, que permanecem no solo ou em restos de cultura por longos períodos de tempo na ausência do hospedeiro, atuam como fonte primária de inóculo em novos cultivos (KENDRICK; SNYDER, 1942; ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990, SOUSA et al., 2014). A disseminação de *Fusarium oxysporum* dentro da área de cultivo pode ser feita através da água de chuva ou irrigação e da movimentação do solo no processo de gradagem e aração. Já a disseminação a longa distância pode ocorrer através de mudas, solos e sementes contaminadas

(BEDENDO, 2018). As sementes contaminadas são a principal forma de disseminação desta doença a longas distâncias, podendo atingir uma taxa de transmissão de 42,8% (SANTOS et al., 1996).

4.3. Mecanismos de defesa da planta

As plantas se defendem do ataque de patógenos através da combinação de dois mecanismos: 1) características estruturais que atuam como barreiras físicas e inibem a penetração e colonização dos tecidos vegetais pelo patógeno e 2) reações bioquímicas em células e tecidos do hospedeiro, onde são produzidas substâncias que atuam como barreiras físicas e são tóxicas ao patógeno que criam condições que inibem o desenvolvimento do mesmo na planta (AGRIOS et al., 2005). O primeiro também é conhecido como os mecanismos de defesa pré-formados e o segundo, como os mecanismos de defesa induzidos ou pós-formados. A combinação entre estes mecanismos no processo de defesa da planta é variável de acordo com a relação patógeno-hospedeiro, idade da planta, tipo de tecido e órgão afetado, condições nutricionais da planta e condições ambientais (AGRIOS et al., 2005).

Em casos quando os mecanismos de defesa pré-formados (barreiras físicas ou substâncias de defesa pré-existent) da planta não forem suficientes para impedir a germinação do esporo ou penetração do patógeno, esta utiliza os mecanismos pós-formados na tentativa de bloquear ou atrasar a colonização pelo patógeno através da ação direta sobre o patógeno (GRAYER; KOKUBUN, 2001). Essas respostas são induzidas pela ativação de genes de defesa da planta relacionados com a imunidade induzida por microrganismos/patógenos (MTI/PTI) ou pela imunidade induzida por efetores (ETI). A primeira é ativada após o reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP) ou a patógenos (PAMP), enquanto a segunda é ativada pelo reconhecimento de proteínas efetoras (YADETA; THOMMA, 2013).

O processo de infecção da planta por *F. oxysporum* é complexo e envolve diversos estágios de interação patógeno-hospedeiro, como por exemplo, o reconhecimento das raízes do hospedeiro e adsorção, penetração da hifa em diferentes tecidos da raiz, penetração e colonização do xilema e, adaptação ao ambiente interno da planta (ZVIRIN et al., 2010). O reconhecimento de patógenos responsáveis pela murcha vascular é mediado por receptores extra e intracelulares que levam a respostas de defesa nos vasos do xilema através da ativação do sistema imune inato da planta (YADETA; THOMMA, 2013).

Mecanismos estruturais de defesa vegetal contra patógenos vasculares compreendem a formação de tiloses, géis, gomas, reforço da parede celular e deposição de calose (YADETA;

THOMMA, 2013; GARCÉS-FIALLOS et al., 2017). Já os mecanismos bioquímicos de defesa contra estes patógenos são representados pela ativação de genes de defesa levando ao aumento da atividade enzimática e produção de compostos antimicrobianos como espécies reativas de oxigênio, compostos fenólicos, enxofre inorgânico e fitoalexinas (RAMOS et al., 2007; AHUJA et al., 2012; NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015; XUE et al., 2015; de QUADROS et al., 2019). Alguns dos compostos químicos acumulados na seiva do xilema modulam a morfologia de tecidos do xilema inibindo a colonização vertical e horizontal, enquanto outros possuem capacidade antimicrobiana e são capazes de eliminar o patógeno (YADETA; THOMMA, 2013).

As reações bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro produzem substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas para o crescimento do mesmo no interior da planta. Embora os mecanismos estruturais possam atuar em diferentes níveis na defesa das plantas contra alguns tipos de patógenos, pesquisas mostram que, na maior parte das interações, são substâncias produzidas nas células do hospedeiro, antes ou após a infecção, que contribuem significativamente para a resistência (PIASECKA et al., 2015).

De maneira geral, para contribuir para a resistência, as substâncias pré- ou pós-formadas devem estar presentes e/ou ser acumuladas em concentrações adequadas nas partes invadidas e em formas acessíveis ao patógeno. Além disso, alterações na concentração dessas substâncias devem ser correlacionadas com mudanças na expressão da doença (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

4.3.1. Compostos fenólicos

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, pode ser destacado os compostos fenólicos que são um grupo diverso de metabólitos secundários e representam aproximadamente 40% do carbono orgânico em plantas. Eles possuem uma ampla variação em tamanho e complexidade da molécula mas, geralmente são constituídos de um anel aromático (C₆) ligado diretamente à pelo menos um grupo hidroxila ou outros como grupo carboxila e metila, que possuem caráter polar, permitindo sua dissolução em água (KUTCHAN et al., 2015; KULBAT, 2016).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas oriundos da rota do chiquimato-fenilpropanoide-flavonoide. A classificação destes compostos foi feita considerando o esqueleto de carbono inicial e é composta pelas seguintes classes: C₆ (fenol simples, benzoquinonas); C₆-C₁ (ácidos fenólicos); C₆-C₂ (ácido fenilacético, acetofenona); C₆-C₃ (ácidos hidroxicinâmicos, coumarinas, fenilpropanos, cromonas); C₆-C₄ (naftoquinonas);

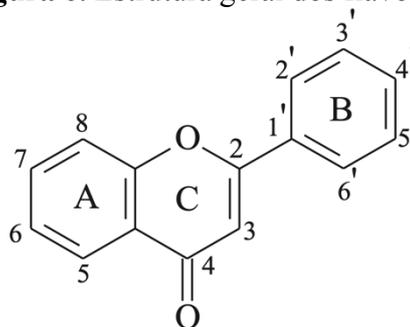
$C_6-C_1-C_6$ (xantonas); $C_6-C_2-C_6$ (estilbenos, antraquinonas); $C_6-C_3-C_6$ (flavonoides, isoflavonoides); $(C_6-C_3)_2$ (lignanas, neolignanas); $(C_6-C_3-C_6)_2$ (biflavonoides); $(C_6-C_3)_n$ (ligninas); $(C_6)_n$ (catecol melaninas) e $(C_6-C_3-C_6)_n$ (taninos condensados) (LATTANZIO et al., 2006).

4.3.2. Flavonoides

Os flavonoides são o grupo de compostos derivados da rota dos fenilpropanoides mais estudados (KUTCHAN et al., 2015) e o principais compostos fenólicos encontrados em legumes (AGUILERA et al., 2010). Quimicamente, sua molécula possui um esqueleto de 15 carbonos, que consiste em dois anéis aromáticos conectados por 3 carbonos ($C_6-C_3-C_6$) (KULBAT, 2016).

A biossíntese de flavonoides ocorre através de duas rotas: a rota do acetato (anel A) e a rota do chiquimato (anel B em conjunto com a cadeia de ligação – anel C – criando o esqueleto C_6-C_3). O anel A é sintetizado a partir de três moléculas de malonil-CoA oriundas da transformação de glicose, enquanto o anel B é sintetizado a partir de 4-coumarioul-CoA produzido a partir da fenilalanina na rota do chiquimato (Figura 6). A condensação dos anéis A e B geram a chalcona, que é isomerizada para formar flavonona e então é utilizada como precursor da síntese dos demais flavonoides. Atualmente são conhecidos aproximadamente 7000 flavonoides e todos eles possuem esta rota biossintética dos fenilpropanoides em comum, portanto, compartilham o mesmo esqueleto estrutural básico (NABAVI et al., 2018).

Figura 6. Estrutura geral dos flavonoides



Legenda: A e B: benzeno; C: pirona. Os números indicam as posições onde podem ocorrer saturação ou oxidação no processo de formação de outros flavonoides. **Fonte:** NABAVI et al., 2018.

Esta rota bioquímica se ramifica e produz diversas classes de flavonoides incluindo di-hidrochalconas, auronas, flavanonóis, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianinas, protoantocianidinas e leucoantocianidinas (KHALID et al., 2019). Devido a estrutura química

diversa e variedade de compostos gerados através da adição de radicais, os flavonoides possuem diferentes funções nas plantas como por exemplo a proteção contra estresses abióticos (radiação UV, seca, calor e salinização) e bióticos (ataque de herbívoros e patógenos); são responsáveis pela sinalização durante o processo de nodulação, pela coloração de flores e outros órgãos vegetais, pelo aroma e palatabilidade de frutos, pela manutenção do estado redox em células; participam do transporte de auxina e da remoção de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio, em tecidos vegetais (FERREYRA et al., 2012; MIERZIAK et al., 2014; KHALID et al., 2019).

Os flavonoides relacionados à defesa podem ser divididos em dois grupos: compostos pré-formados e compostos induzidos. O primeiro grupo corresponde àquelas substâncias sintetizadas durante o desenvolvimento normal do tecido vegetal enquanto o segundo, são produzidos em resposta a estresses bióticos e abióticos. Os flavonoides cuja produção é induzida após estresses e possuem ação antimicrobiana também são conhecidos como fitoalexinas (VANETTEN et al., 1994; TREUTTER, 2006).

4.3.2.1. Fitoalexinas

Um dos relatos mais antigos sobre a produção de fitoalexinas foi feito por Noel Bernard em 1911, ao descobrir que tubérculos de duas espécies de orquídeas se tornaram resistente ao ataque de patógenos após a infecção com *Rhizoctonia repens*, através da produção de substâncias antifúngicas que são formadas especificamente quando as plantas são atacadas por fungos (GRAYER; KOKUBUN, 2001). Em 1940, Müller e Borger demonstraram que a infecção do tubérculo de *Solanum tuberosum* com uma raça incompatível de *Phytophthora infestans* induziu resistência contra a subsequente infecção com uma raça compatível do mesmo fungo. A partir disto, os autores propuseram o primeiro conceito de fitoalexinas, baseado na hipótese de que o tecido da planta, em resposta a reação incompatível, produzia substâncias não específicas que inibiam o desenvolvimento do patógeno e protegiam o tecido contra posteriores infecções por patógenos compatíveis (HAMMERSCHMIDT, 1999; GROBKINSKY et al., 2012).

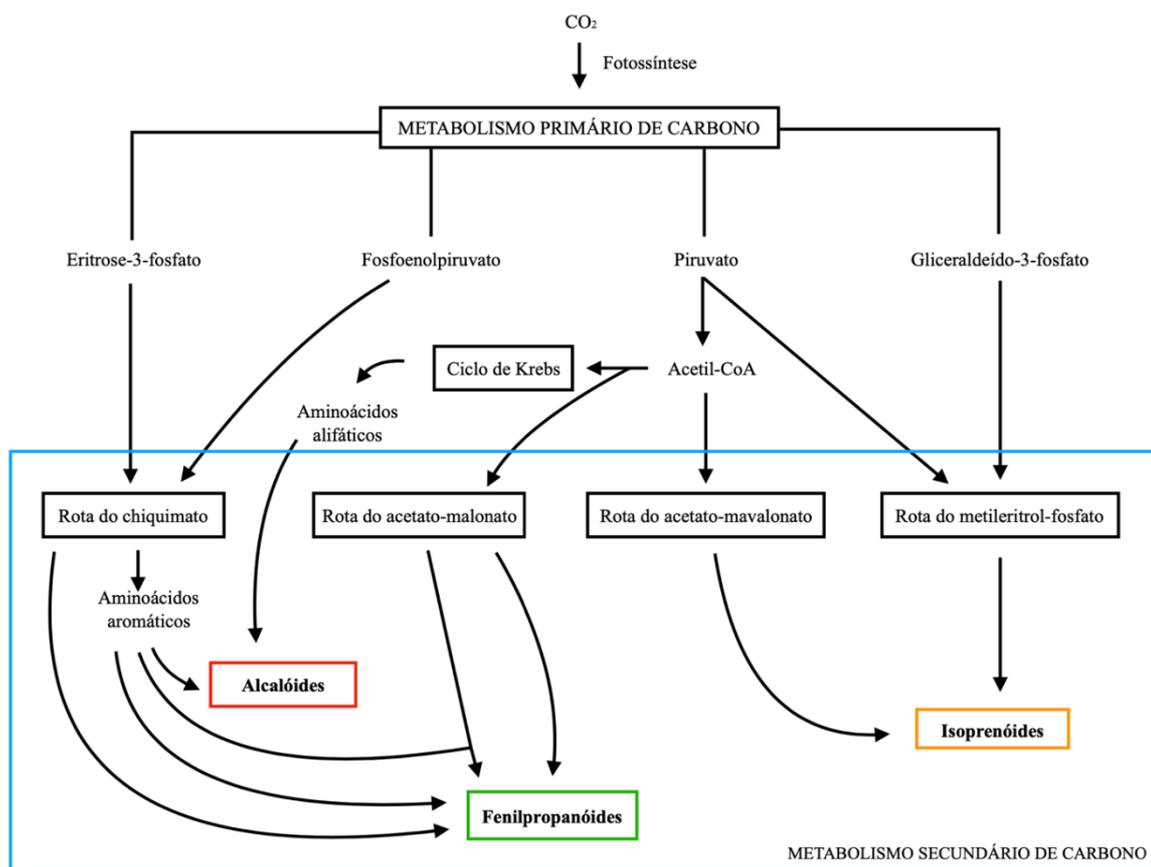
Atualmente, as fitoalexinas são caracterizadas como um grupo heterogêneo de metabólitos secundários de baixo peso molecular, com atividade antimicrobiana, produzidos por plantas após a indução por estresses bióticos e abióticos como por exemplo, a infecção por microrganismos fitopatogênicos, injúrias físicas e indução com substâncias químicas. Estes compostos são produzidos por células sadias adjacentes a células danificadas no local de

infecção e seu acúmulo ocorre tanto em tecido resistente quanto suscetível, sendo que a resistência ocorre quando a concentração de uma ou mais fitoalexinas atinge uma concentração suficiente para a restrição do desenvolvimento do patógeno (AGRIOS et al., 2005; GROBKINSKY et al., 2012).

A síntese destes metabólitos ocorre *de novo* após a infecção do patógeno, sendo *up* ou *down-regulated* por elicitores endógenos, como a expressão de fitohormônios (ácido jasmônico, ácido salicílico, etileno, auxinas, ácido abscísico, citocininas e, em menor extensão, giberelinas), por reguladores transcricionais, genes relacionados a defesa da planta, e também através de elicitores exógenos e do patógeno, envolvendo a atividade de diversas enzimas, que exige alta coordenação da transdução de sinais e regulação da expressão gênica. (AGRIOS et al., 2005; AHUJA et al., 2012; GROBKINSKY et al., 2012; JEANDET et al., 2014; HAMMOND-KOSACK; JONES, 2015). Este mecanismo é uma alternativa econômica de energia gasta pela célula para defesa contra patógenos uma vez que os recursos energéticos vão para a síntese de fitoalexinas somente no início e no local da infecção (GRAYER; KOKUBUN, 2001). As fitoalexinas podem não apenas matar o patógeno invasor, mas também retardar sua propagação, permitindo que a planta ative respostas de defesa mais sofisticadas, porém mais lentas (GROBKINSKY et al., 2012). A interação entre planta e patógeno depende em grande parte na habilidade do último metabolizar as fitoalexinas às quais está exposto (JEANDET, 2014).

Análises fisiológicas e bioquímicas feitas durante a interação planta-patógeno revelaram que o espectro destes compostos acumulados em resposta a vários patógenos depende fortemente da espécie e família da planta (GROBKINSKY et al., 2012). As fitoalexinas são derivadas do metabolismo central interconectado (Figura 7) que pode ser grosseiramente separado em metabolismo de alcalóides, isoprenóides (terpenóides) e fenilpropanóides. Estas rotas formam diferentes classes de fitoalexinas dependendo do precursor inicial e conversões enzimáticas subsequentes ao longo de ramos metabólicos específicos (GROBKINSKY et al., 2012). A fenilalanina, é o substrato para a síntese de várias fitoalexinas da classe dos flavonóides e isoflavonóides através ação da enzima fenilalanina amônia-liase na rota biossintética dos fenilpropanóides (MANSFIELD, 2000; HAMMOND-KOSACK; JONES, 2015).

Figura 7. Rota biossintética e metabólitos na produção de fitoalexinas.



Os intermediários derivados do metabolismo primário de carbono são utilizados como precursores da síntese de metabólitos secundários específicos (em negrito).

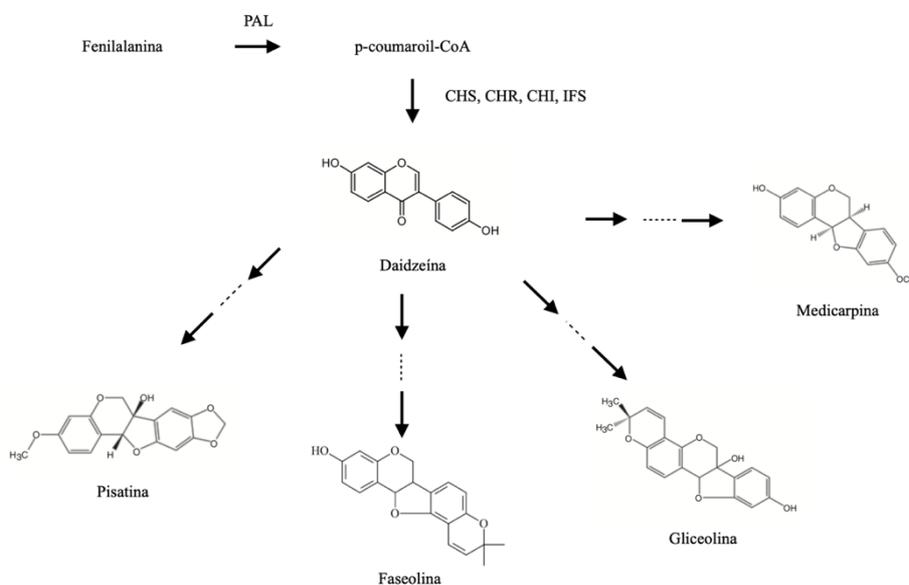
Fonte: adaptado de GROBKINSKY et al., 2012.

4.3.2.1.1. Fitoalexinas em Fabaceae

A família Fabaceae compreende várias leguminosas comestíveis como a soja (*Glycine max*), ervilha (*Pisum sativum*), grão-de-bico (*Cicer arietinum*), alfalfa (*Medicago sativa*), amendoim (*Arachis hypogaea*), além do feijão (*Phaseolus vulgaris*). O maior número de espécies estudadas na produção de fitoalexinas pertence a esta família, sendo que pelo menos 600 espécies já foram pesquisadas (HARBORNE, 1999; AHUJA et al., 2012).

A maioria das fitoalexinas produzidas por esta família pertencem a cinco classes de isoflavonoides: isoflavonas, isoflavanonas, pterocarpenos, isoflavanos e coumestanos. Algumas fitoalexinas pterocarpânicas como a pisatina (produzida por *Pisum sativum*), faseolina (produzida por *Phaseolus vulgaris*), gliceolina (produzida por *Glycine max*) e medicarpina (produzida por *Medicago sativa*) são mais estudadas (Figura 8). Além desses compostos, um pequeno número de leguminosas também produz fitoalexinas não isoflavonoides, como furanoacetilenos e estilbenos (JEANDET et al., 2014).

Figura 8. Biossíntese de fitoalexinas derivadas da rota dos fenilpropanoides em Fabaceae



Legenda: PAL: fenilalanina amônia-liase; CHS: chalcona sintase; CHR: chalcona redutase; CHI: chalcona isomerase; IFS: isoflavona sintase.

Fonte: adaptado de PIASECKA et al., 2015

4.3.2.1.1.1. Faseolina

A faseolina, uma globulina 7S (classe vicilina), é a principal proteína de armazenamento em *Phaseolus vulgaris* L., representando mais de 50% do total de proteínas da

semente de feijão (YAO et al., 2016). É considerada uma proteína oligomérica composta por três subunidades de polipeptídeos: α -, β - e γ -faseolina, com peso molecular variando de 43 a 53 kDa (BOLLINI; VITALE, 1981; YIN et al., 2010).

A diversidade molecular da faseolina tem sido utilizada como um indicador da domesticação do feijão comum na região da América Central e dos Andes (MONTOYA et al., 2010), uma vez que oferece informações botânicas, arqueológicas e históricas devido ao polimorfismo, estabilidade ambiental e características bioquímicas complexas (GEPTS, 1988).

Mais de 40 diferentes tipos de faseolina, de acordo com sua composição polipeptídica, já foram encontrados em materiais de feijão selvagem e cultivado (MONTOYA et al., 2010). O feijão possui tipos distintos de faseolina de acordo com seu centro de origem. Os materiais oriundos da região da Mesoamérica apresentam faseolina do tipo S (Sanilac), M (Middle America) ou B (Boyacá), enquanto os materiais originários da região dos Andes apresentam faseolina do tipo T (Tendergreen), C (Contender), H (Huevo de Huanchaco), A (Ayacucho), J (Jujuy) ou I (Inca) (GEPTS; BLISS, 1986; GEPTS et al., 1986; KOENING et al., 1990).

A faseolina se acumula rapidamente nos cotilédones da semente de feijão até a germinação, quando então é degradada por enzimas proteolíticas presentes em plântulas (SUN et al., 1978; HALL et al., 1999). Sua produção em tecidos de feijão pode ser induzida por ação de substâncias abióticas como cloreto de cobre (DEWICK; STEELE, 1982; DURANGO et al., 2002), cloreto de mercúrio e ácido abscísico (GOOSSENS et al., 1987) e ácido salicílico (DURANGO et al., 2013) e também quando desafiadas por patógenos como *Colletotrichum lindemuthianum* (BAILEY, 1974), *Rhizoctonia solani* (SMITH et al., 1975; GOOSSENS; VAN LAERE, 1983), e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (BOZKURT; SOYLU, 2011), ou com fungos saprófitas (SOLINO et al., 2017).

4.4. Lignina

A lignina é um heteropolímero complexo que consiste primariamente em unidades de p-hidroxifenil, guaiacil e seringil formadas através da oxidação dos álcoois p-coumaril, coniferil e sinapil, respectivamente, que são produtos da rota dos fenilpropanoides (VANHOLME et al., 2010). Este polímero é depositado na parede de células especializadas em tecidos vegetais, na lamela média ou nas paredes primárias e secundárias das células. Possui funções como suporte mecânico, estabilidade para tecidos vasculares do xilema, defesa vegetal contra pragas e patógenos e ainda pode atuar como barreira apoplástica e permitir o transporte de seiva em tecidos vasculares (BARROS et al., 2015) Sua composição química dificulta a

digestão por herbívoros e pode inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (HELDT; PIECHULLA, 2011).

A lignificação atua como uma barreira física contra a penetração de patógenos através do aumento da resistência da parede celular à enzimas degradadoras, e ainda na difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro e de nutrientes do hospedeiro em direção ao patógeno. Além disso, a produção e deposição de uma gama de polímeros fenólicos similares a lignina e espécies de ligninas na parede celular pode ser induzida após estresses bióticos ou abióticos, o que limitaria e/ou confinaria o crescimento de patógenos (BHUIYAN et al., 2009; SATTLER; FUNNEL-HARRIS, 2013; PASCHOLATI; DALIO, 2018). Propriedades bioquímicas da lignina como concentração, composição, estrutura e localização, podem influenciar as funções celulares em diferentes formas, variando dentre as camadas da parede celular, tipos de células, órgãos, estágio de desenvolvimento, espécie vegetal e condições ambientais (BARROS et al., 2015).

4.5. Ergosterol

O ergosterol é o principal esterol componente da membrana plasmática de fungos e ausente em plantas superiores. Suas principais funções envolvem a manutenção da integridade e fluidez de membranas, permeabilidade de cátions, crescimento celular e atividade de enzimas de membrana (NIEMENMAA et al., 2008; LIU et al., 2013; YUN et al., 2014). Sua determinação tem sido aplicada quando é necessário o acompanhamento do crescimento fúngico em meio sólido, solos, tecidos vegetais, sedimentos e outros (VARGA et al., 2006; NIEMENMAA et al., 2008; BALDRIAN et al., 2013; YUN et al., 2014; GARCÉS-FIALLOS et al., 2017).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material biológico

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (cv. Uirapuru) e resistente (linhagem UFSC-01) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) (de BORBA et al., 2017) e o isolado altamente agressivo MANE 174 – raça 6 de *Fop*, determinada de acordo com ALVES-SANTOS et al. (2002), mantido em meio BDA a 25°C ± 1°C e fotoperíodo de 12 h, foram utilizadas nos experimentos.

O isolado CBS 125088 de *Alternaria brassicicola* foi utilizado para a detecção de compostos com atividade antimicrobiana presente nos extratos vegetais após a cromatografia de camada delgada. O fungo foi mantido em placas de Petri contendo meio V8 a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro por 15 dias para a esporulação (de FREITAS; STADNIK, 2015).

5.2. Condições de cultivo de plântulas

Após a desinfestação superficial das sementes por imersão em etanol 70% por 1 min, seguida pela imersão em hipoclorito de sódio 0,5% por 2 min e lavagem em água destilada, a semeadura foi feita em bandejas de polietileno de 15 células (234 cm^3 por célula) contendo vermiculita esterilizada como substrato. Em seguida, as bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento em condições controladas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 h de fotoperíodo com luz branca a $180\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e a irrigação foi realizada de acordo com a necessidade hídrica da cultura. As plantas foram cultivadas por 8 dias antes da inoculação.

5.3. Inoculação

Para a obtenção do inóculo, *Fop* foi crescido até a esporulação em placas de Petri contendo meio cravo-ágar a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h por 3 semanas (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A suspensão de esporos foi preparada através da adição de 10 mL de água destilada às placas de Petri com meio cravo-ágar, seguido de filtragem em camada dupla de gaze para a remoção de fragmentos de micélio e ajuste da concentração de conídios em câmara de Neubauer para 1×10^6 conídios mL^{-1} (GARCÉS-FIALLOS et al., 2017).

As plântulas de feijão com 8 dias de idade, no estágio fenológico V2 (folhas primárias totalmente expandidas), foram removidas da vermiculita e suas raízes lavadas em água destilada. A inoculação foi realizada através da imersão do sistema radicular em uma suspensão de conídios de *Fop* na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} por 20 minutos (GARCÉS-FIALLOS et al., 2017). Plântulas cujo sistema radicular foi imerso em água destilada por 20 min foram utilizadas como controle.

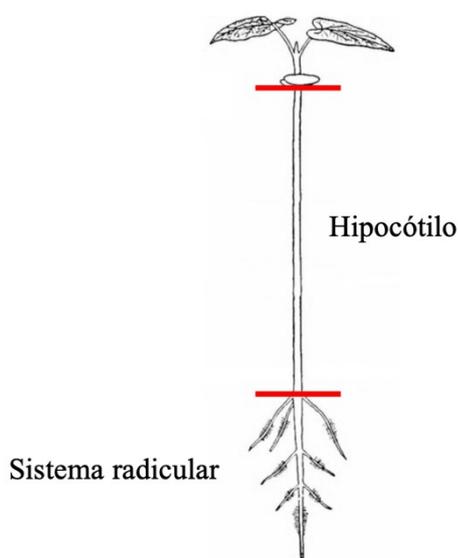
Após a inoculação, as plântulas foram transplantadas para bandejas de células e mantidas nas condições descritas anteriormente. A irrigação foi feita conforme a necessidade hídrica da cultura com solução nutritiva (Dripsol; Ca, N, P, K, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn a 0,69; 0,93; 0,19; 1,2; 0,2; 0,3; 0,0015; 0,0007; 0,0075; 0,0025; 0,0002 e 0,004 g L^{-1} respectivamente) diluída em água.

5.4. Amostragem

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais, flavonoides, faseolina, lignina e ergosterol, a amostragem foi realizada aos 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação (dai) e para a avaliação da severidade da doença e necrose vascular a amostragem foi realizada aos 30 dai. Foram coletadas 16 amostras ao longo do tempo para cada tipo de análise bioquímica e 24 amostras para a avaliação de severidade e necrose vascular.

Após a remoção das plântulas do substrato e lavagem das raízes em água destilada, as mesmas foram divididas em sistema radicular e hipocótilo. Neste trabalho, foi considerado como sistema radicular a porção das raízes em conjunto com a coroa da raiz e como hipocótilo, a porção do tecido aéreo imediatamente superior ao sistema radicular até o local de inserção do cotilédono (Figura 9). Após a divisão, cada região foi pesada individualmente e imediatamente acondicionada a -20°C até o momento das análises.

Figura 9. Representação das regiões de tecido vegetal utilizada nos experimentos.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

5.5. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais

O extrato vegetal foi feito através da homogeneização do sistema radicular e hipocótilo com auxílio de almofariz e pistilo em 5 mL de etanol absoluto e centrifugadas (Centrifuge

5810R, Eppendorf) por 15 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e utilizado na determinação de compostos fenólicos e de flavonoides totais.

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi realizada conforme CHEN et al. (2015). Foram pipetados em microplaca 25 μL do extrato vegetal e 125 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10; v/v) e feita a incubação por 10 min no escuro a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 125 μL de Na_2CO_3 7,5% (p/v) e novamente incubado por 30 min nas condições descritas acima. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 765 nm utilizando leitor de microplacas (SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode). O ácido gálico (Sigma) foi utilizado para construir uma curva padrão (Apêndice A). O conteúdo de compostos fenólicos totais foi expresso em μg de equivalente de ácido gálico por grama de peso fresco da amostra ($\mu\text{g EAG g}^{-1}$ peso fresco).

Para a determinação do conteúdo de flavonoides totais foram pipetados em microplaca 30 μL do extrato vegetal, 150 μL de etanol absoluto e 30 μL de AlCl_3 (10%; p/v; preparado em metanol). A microplaca então foi incubada por 30 min no escuro em temperatura ambiente e a absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 420 nm utilizando leitor de microplacas (SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode) (DIRAR et al., 2019; com modificações). A quercetina (Sigma) foi utilizada para construir uma curva padrão (Apêndice B) e o conteúdo de flavonoides totais foi expresso em μg de equivalente de quercetina por grama de peso fresco da amostra ($\mu\text{g EQ g}^{-1}$ peso fresco).

5.6. Determinação de faseolina

Para a obtenção do extrato vegetal, as amostras foram incubadas em 5 mL de etanol absoluto por 24h a -20°C . Após este período, foram agitadas por 1 h em agitador orbital a 120 rpm e centrifugadas (Centrifuge 5810R, Eppendorf) por 15 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e 300 μL de cada amostra foram pipetados em microplaca e sua absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm utilizando leitor de microplacas (SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode). O conteúdo de faseolina foi expresso em unidade de absorbância por grama de peso fresco da amostra (ABS g^{-1} peso fresco) (SOLINO et al., 2017; com modificações).

5.7. Detecção de compostos com atividade antimicrobiana

A detecção de compostos com atividade antimicrobiana foi realizada através da cromatografia de camada delgada (TLC) dos mesmos extratos utilizados na determinação do conteúdo de faseolina. Para isso, após a determinação da faseolina os extratos vegetais foram condensados em evaporador rotativo (Quimis) a 40°C até a remoção total do etanol e o resíduo foi resuspenso em 2 mL de etanol absoluto. Em seguida, 20 µL de cada amostra foram pipetados em cromatogramas de TLC (Silica gel 60 F₂₅₄; Sigma) e então desenvolvidos em cuba cromatográfica contendo uma mistura de clorofórmio:metanol (93:7; v/v). Em seguida, os cromatogramas foram pulverizados com uma suspensão de conídios de *Alternaria brassicicola* na concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹ preparada conforme de FREITAS; STADNIK (2015), suplementada com meio mínimo (7,0 g KH₂PO₄; 3,0 g Na₂HPO₄•2H₂O; 4,0 g KNO₃; 1,0 g MgSO₄•7H₂O; 1,0 g NaCl) e glicose (4 %) antes da pulverização. Os cromatogramas foram incubados no escuro a 25°C ± 1°C por 72 h para a identificação de compostos com atividade antimicrobiana (AZPILICUETA et al., 2004; com modificações). O fungicida Daconil (clorotalonil; 1,7 g/L) foi utilizado como controle positivo.

5.8. Determinação do conteúdo de lignina

A determinação do conteúdo de lignina foi realizada através da extração em ácido tioglicólico de amostras do 1 e 9 dai. Amostras de raízes foram secas a 60°C por 3 horas e trituradas à um pó com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, foram incubadas a 95°C por 4 horas em uma mistura de 1,2 mL de ácido tioglicólico e 5 mL de HCl 2M (v/v). Após centrifugação e lavagem com água destilada, o pellet foi incubado por 18 h em 5 mL de NaOH 0,5M (p/v) para a extração do ácido lignotioglicólico. O sobrenadante foi coletado após centrifugação, acidificado com 200 µL de HCl concentrado e incubado em gelo por 4 horas. Por fim foi feita a centrifugação, descarte do extrato acidificado e ressuspensão do pellet em 2 mL de NaOH 0,5M (p/v). A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm utilizando leitor de microplacas (SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode) (STADNIK; BUCHENAUER, 2000; com modificações). A lignina (Sigma) foi utilizada para construir uma curva padrão (Apêndice C). O conteúdo de lignina foi expresso em mg de lignina por mg de peso seco (mg lignina mg⁻¹ peso seco).

5.9. Determinação do conteúdo de ergosterol

A quantificação de ergosterol foi feita conforme GARCÉS-FIALLOS et al. (2017). As amostras foram secas em forno de ar forçado a 60°C por 3 horas, homogeneizadas com almofariz e pistilo em solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH, 4,5 M (p/v) em etanol 39%) na proporção de 1:60 para as raízes e 1:30 para o hipocótilo. Após centrifugação (Centrifuge 5810R, Eppendorf) a 10.000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi coletado, incubado a 80°C por 1 h, e resfriado à temperatura ambiente. Os esteróis foram extraídos através da adição de 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de n-heptano (Chromasolv Plus 99%; Sigma), seguido de agitação em vórtex por 3 min. As amostras foram armazenadas a -20°C por até 24 horas e então, foi feita a diluição de 1 mL da camada clarificada de heptano contendo os esteróis em 4 mL de etanol absoluto. A absorvância do ergosterol foi determinada espectrofotometricamente a 282 nm utilizando leitor de microplacas (SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode). O ergosterol purificado (ergosta-5,7-22-trien-3-β-ol; Sigma) foi utilizado para construir uma curva padrão (Apêndice D). O conteúdo de ergosterol de plantas controle foi subtraído das plantas inoculadas e expresso em µg de ergosterol por grama de peso seco (µg ergosterol g⁻¹ peso seco).

5.10. Avaliação da severidade da doença e da necrose vascular

A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 30 dai de acordo com a escala CIAT (Tabela 1), cujas notas variam de 1 (sem sintomas visíveis) a 9 (aproximadamente 75%, ou mais, das folhas apresentando murcha, clorose, necrose, desfolha e morte) (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987).

A avaliação da porcentagem de tecido apresentando necrose vascular (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987) também foi feita aos 30 dai. A altura do hipocótilo completo foi medida utilizando régua. Após o corte longitudinal do hipocótilo foi feita a medição da área apresentando descoloração vascular para o cálculo da porcentagem de área com necrose vascular.

Tabela 1- Escala CIAT para a severidade da Murcha de Fusarium

Nota	Descrição
1	Sem sintomas visíveis;
3	Não mais do que 10% das folhas apresentando murcha;
5	Aproximadamente 25% das folhas apresentando murcha e clorose;
7	Aproximadamente 50% das folhas apresentando murcha, clorose e necrose limitada;
9	Aproximadamente 75%, ou mais, das folhas apresentando murcha, clorose, necrose, desfolha, e eventual morte da planta.

Fonte: adaptado de VAN SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987

5.11. Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado. Os tratamentos foram compostos por quatro repetições e a unidade experimental composta por duas plantas.

Após a verificação de homocedasticidade de variâncias e normalidade, os dados foram submetidos a análise de variância e regressão. O teste t de Student ($P \leq 0,05$) e o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P \leq 0,05$) foi utilizado para comparação em pares. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Sisvar (versão 5.6) e Excel (versão 16.31).

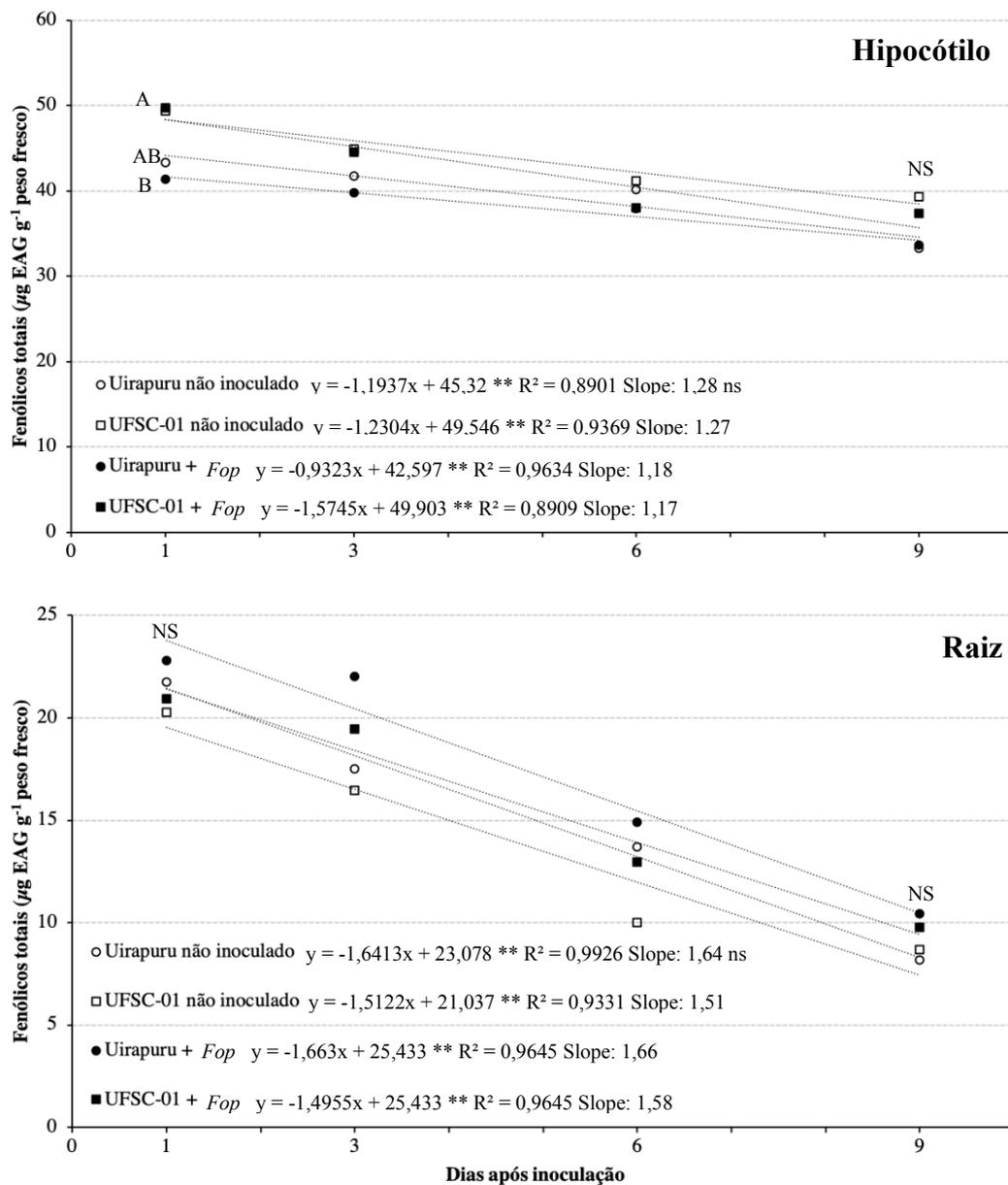
Os resultados expressos são a combinação de dois experimentos com resultados semelhantes.

6. RESULTADOS

6.1. Compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais reduziu ao longo do tempo (análise de regressão; $P \leq 0,01$) nas raízes e hipocótilos de plantas de ambos genótipos (Uirapuru e UFSC-

Figura 10. Conteúdo de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g EAG g}^{-1}$ peso fresco) em hipocótilo e raiz de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*



Asteriscos indicam diferença significativa no conteúdo de fenólicos totais ao longo do tempo (** $P \leq 0,01$). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre o slope dos tratamentos. Letras maiúsculas indicam diferença significativa no conteúdo de fenólicos totais entre os tratamentos no mesmo dia (teste Tukey; $P \leq 0,05$). ns e NS indicam diferença não significativa.

01). Apenas ao 1^o dai o conteúdo de compostos fenólicos totais no hipocótilo de plantas resistente (UFSC-01) inoculadas e não inoculadas diferiu significativamente (teste Tukey, $P \leq 0,05$) do conteúdo em hipocótilos suscetíveis (Uirapuru) inoculados com *Fop* (Figura 10).

De uma forma geral, o hipocótilo de plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01 apresentou aproximadamente o dobro do conteúdo de fenólicos totais presentes nas raízes. Houve uma redução de 23,17% e 20,40%, respectivamente, no conteúdo de compostos fenólicos totais no hipocótilo de plantas não inoculadas do cv. Uirapuru e UFSC-01. Enquanto em plantas inoculadas com *Fop* essa redução foi de 18,62% e 24,75% no hipocótilo do cv. Uirapuru e UFSC-01, respectivamente.

Em raízes, o conteúdo de compostos fenólicos totais diminuiu, respectivamente, 62,42% e 57,25%, em plantas não inoculadas do cv. Uirapuru e UFSC-01, e 54,3% e 53,4% em raízes do cv. Uirapuru e UFSC-01, respectivamente, inoculadas com *Fop*.

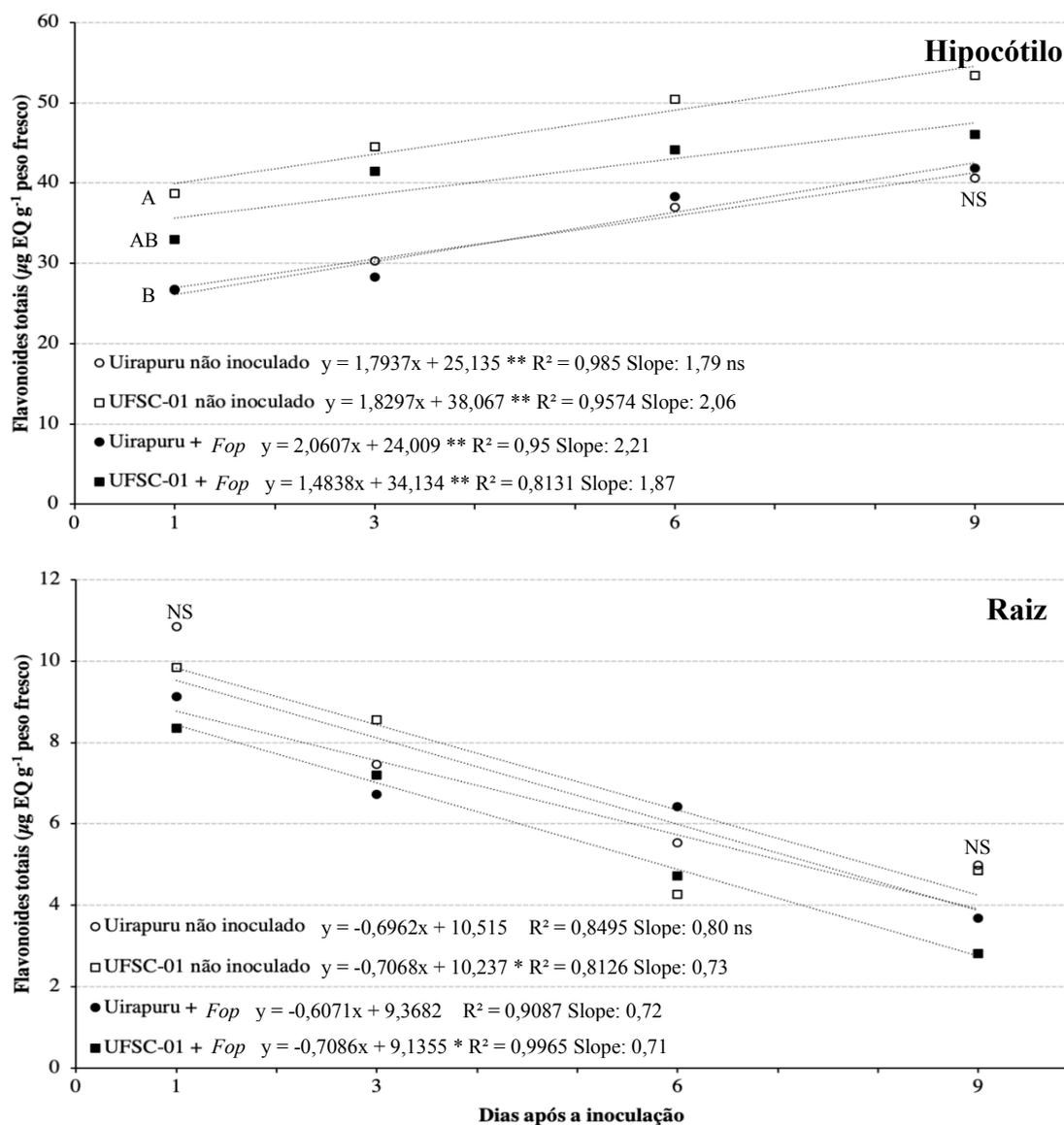
6.2. Conteúdo de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais no hipocótilo de plantas suscetíveis (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) aumentou ao longo do tempo (análise de regressão; $P \leq 0,01$). Apesar deste aumento, a inoculação com *Fop* provocou uma redução de 12% no conteúdo médio de flavonoides no hipocótilo do UFSC-01 quando comparado ao mesmo genótipo não inoculado. Os hipocótilos do genótipo UFSC-01 não inoculado apresentou um maior conteúdo de flavonoides totais do que os hipocótilos suscetíveis não inoculados e inoculados com *Fop* ao 1^o dai (teste Tukey, $P \leq 0,05$) (Figura 11).

Nas raízes de ambos genótipos houve uma redução ao longo do tempo do conteúdo de flavonoides totais (análise de regressão; $P \leq 0,01$). Esta redução foi de 50,76% e 66,34%, respectivamente, em raízes não inoculadas e inoculadas com *Fop* do genótipo resistente (UFSC-01). Embora não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo, o conteúdo de flavonoides totais no genótipo cv. Uirapuru também exibiu a tendência de redução ao longo do tempo.

Houve um claro aumento no conteúdo de flavonoides totais no hipocótilo em relação às raízes. Nos genótipos Uirapuru e UFSC-01 não inoculados, este aumento foi, respectivamente, de 52,4% e 38,1%. Quando inoculados, o aumento no conteúdo de flavonoides totais foi de 56,2% e 39,5%, respectivamente, em plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01.

Figura 11. Conteúdo de flavonoides totais ($\mu\text{g EQ g}^{-1}$ peso fresco) em hipocótilo e raiz de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.



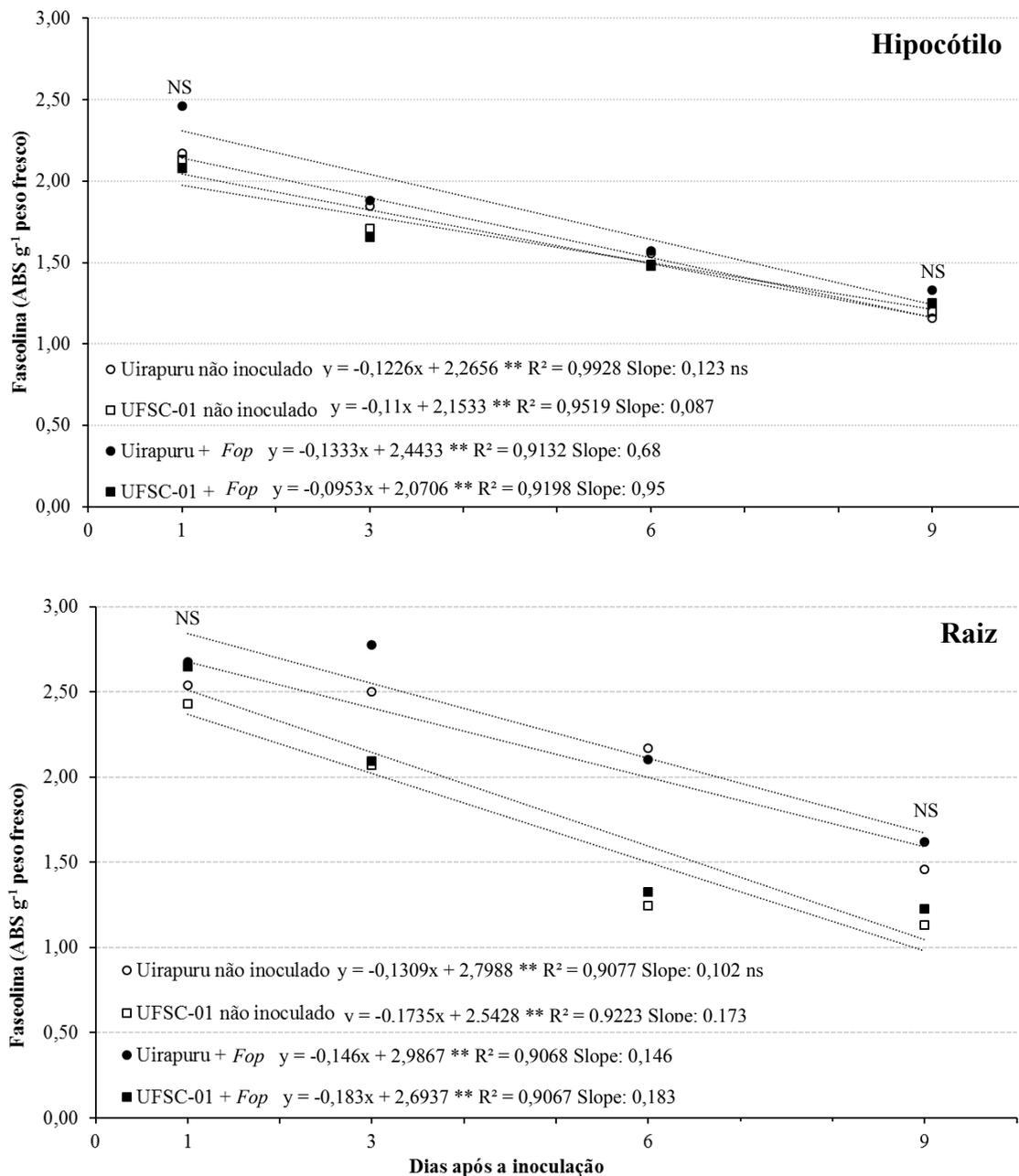
Asteriscos indicam diferença significativa no conteúdo de flavonoides ao longo do tempo (** $P \leq 0,01$). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre o slope dos tratamentos. Letras maiúsculas indicam diferença significativa no conteúdo de fenólicos totais entre os tratamentos no mesmo dia (teste Tukey; $P \leq 0,05$). ns e NS indicam diferença não significativa.

6.3. Conteúdo de faseolina

O conteúdo de faseolina reduziu ao longo do tempo em tecidos do hipocótilo e raízes de ambos genótipos (Uirapuru e UFSC-01) não inoculados e inoculados com *Fop* (análise de

regressão; $P \leq 0,01$). Não houve diferença no conteúdo de faseolina em hipocótilo e raízes do Uirapuru e UFSC-01 em ambos tratamentos ao 1 e 9 dai (teste Tukey; $P \leq 0,05$) (Figura 12).

Figura 12. Conteúdo de faseolina (ABS g⁻¹ peso fresco) em hipocótilo e raiz de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.



Asteriscos indicam diferença significativa no conteúdo de faseolina ao longo do tempo (** $P \leq 0,01$). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre o slope dos tratamentos e letras maiúsculas indicam diferença significativa no conteúdo de faseolina entre os tratamentos no mesmo dia (teste Tukey; $P \leq 0,05$). ns e NS indicam diferença não significativa.

O hipocótilo de plantas do cv. Uirapuru inoculadas com *Fop* apresentou uma queda de 45,9% no conteúdo de faseolina ao longo do tempo e, quando não inoculado, essa redução ao longo do tempo foi de 46,5%. Já nos hipocótilos do genótipo UFSC-01 o conteúdo de faseolina reduziu, respectivamente, 43,6% e 40% quando não inoculados e inoculados com *Fop*.

Nas raízes não inoculadas do Uirapuru e UFSC-01 o conteúdo de faseolina diminuiu 41% e 53%, respectivamente. E nas raízes inoculadas com *Fop*, essa redução foi de 46,5% e 43,6%, respectivamente, no genótipo Uirapuru e UFSC-01.

O conteúdo de faseolina foi diferente entre o hipocótilo e raízes do UFSC-01 não inoculados e inoculados com *Fop* e do genótipo suscetível (Uirapuru) inoculado com *Fop* (Tabela 2). Os tecidos da raiz do genótipo UFSC-01 não inoculado apresentaram 5,2% a mais faseolina do que os hipocótilos do mesmo genótipo. O conteúdo de faseolina nas raízes do genótipo Uirapuru e UFSC-01 inoculados com *Fop* foi 20,9% e 11,5% maior, respectivamente, do que nos hipocótilos.

Tabela 2. Slope da análise de regressão do conteúdo de faseolina em raiz e hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Genótipo	Hipocótilo	Raiz
Uirapuru não inoculado	0,123 ± 0,057	0,102 ± 0,034 ¹ ns
UFSC-01 não inoculado	0,087 ± 0,031	0,173 ± 0,033 *
Uirapuru + <i>Fop</i>	0,068 ± 0,033	0,146 ± 0,045 *
UFSC-01 + <i>Fop</i>	0,095 ± 0,018	0,183 ± 0,023 *

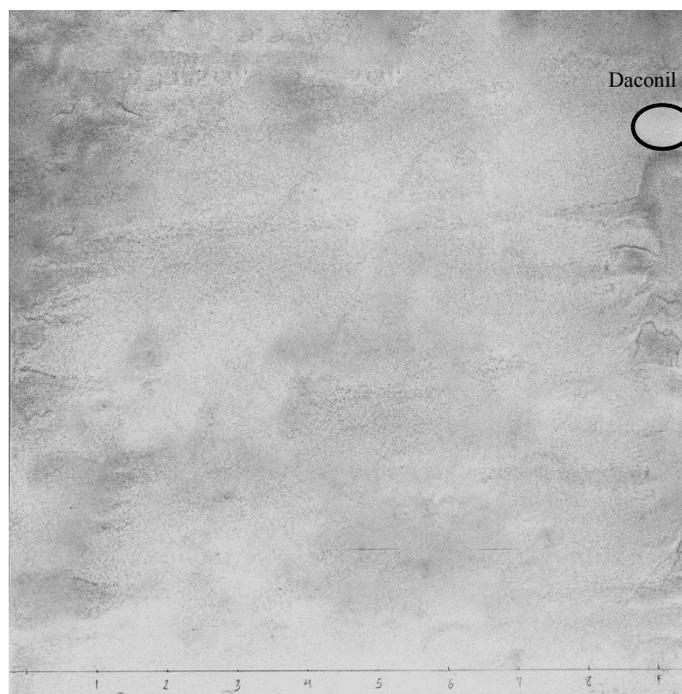
¹ Média ± desvio padrão

Asterisco indica diferença estatística no slope dos tratamentos entre hipocótilo e raiz do mesmo genótipo (teste t de Student; $P \leq 0,05$). ns indica diferença não significativa.

6.4. Detecção de compostos com atividade antimicrobiana

Não foi detectado compostos com atividade antimicrobiana contra *Alternaria brassicicola* nos extratos de raiz e hipocótilo de plantas de ambos genótipos não inoculados e inoculados com *Fop*. O fungicida Daconil apresentou um R_F de 0,89 (Figura 13).

Figura 13. Bioautografia de extratos de raiz e hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*



Legenda: Extratos vegetais 1 e 5: Uirapuru não inoculado; 2 e 6: UFSC-01 não inoculado; 3 e 7: Uirapuru + *Fop*; 4 e 8: UFSC-01 + *Fop*; F: fungicida Daconil.

6.5. Conteúdo de lignina

O conteúdo de lignina em raízes de ambos genótipos não inoculados e inoculados diminuiu ao longo do tempo (teste t de Student; $P \leq 0,05$) (Tabela 3). As maiores reduções ocorreram no genótipo Uirapuru, em uma taxa de 77,8% e 71,8%, respectivamente, quando não inoculado e inoculado com *Fop*. O conteúdo de lignina em raízes do genótipo Uirapuru e UFSC-01 não inoculados foi diferente aos 9 dai (teste Tukey; $P \leq 0,05$).

No hipocótilo, o conteúdo de lignina não foi diferente entre os genótipos (teste Tukey; $P \leq 0,05$) nem entre os tempos avaliados (teste t de Student; $P \leq 0,05$). O conteúdo médio de lignina nas raízes foi 80,1% e 51,7% superior aos 1 e 9 dai, respectivamente, do que no hipocótilo.

Tabela 3. Conteúdo de lignina (mg lignina mg⁻¹ peso seco) em raiz e hipocótilo de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) 1 e 9 dias após a inoculação *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Conteúdo de lignina (µg lignina mg ⁻¹ peso seco)				
Tecido vegetal	Raiz		Hipocótilo	
Tratamento	1 dai	9 dai	1 dai	9 dai
Uirapuru não inoculado	193,61 ± 75,05 ¹ * NS	43,08 ± 19,60 ^B	28,69 ± 9,57 ^{ns NS}	20,34 ± 6,57 ^{NS}
UFSC-01 não inoculado	186,67 ± 18,87 *	97,84 ± 36,16 ^A	38,37 ± 14,86 ^{ns}	46,25 ± 16,07
Uirapuru + <i>Fop</i>	244,68 ± 34,15*	69,19 ± 14,05 ^{AB}	41,00 ± 29,34 ^{ns}	19,77 ± 11,98
UFSC-01 + <i>Fop</i>	230,19 ± 27,50 *	58,01 ± 15,79 ^{AB}	61,84 ± 0,026 ^{ns}	42,95 ± 23,90
Média geral	213,78 ± 38,89 *	67,03 ± 21,40	42,48 ± 19,92 ^{ns}	32,33 ± 14,63

¹ Média ± desvio padrão

Asterisco indica diferença estatística (teste t de Student; $P \leq 0,05$) no conteúdo de lignina no mesmo tecido vegetal do mesmo genótipo ao 1 e 9 dai. ns = não significativo

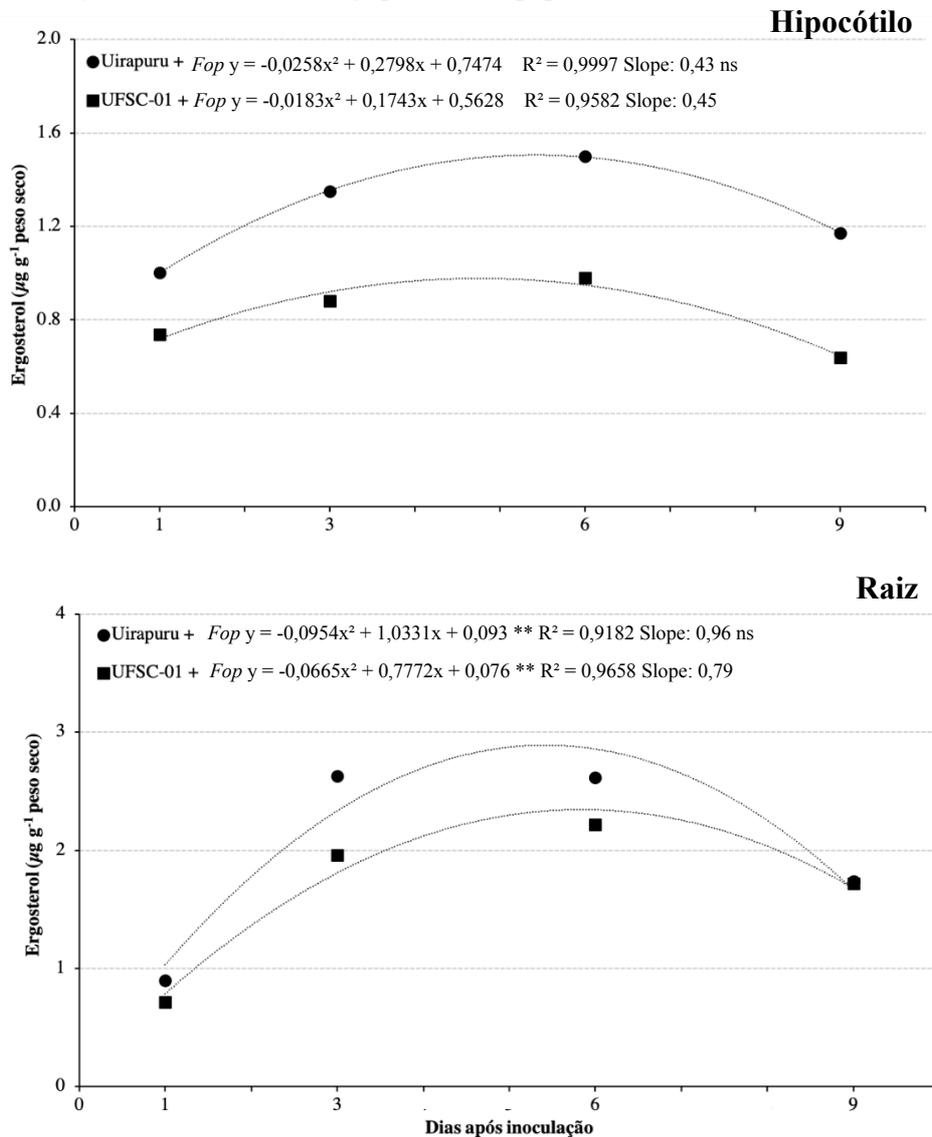
Letras maiúsculas indicam diferença estatística (teste Tukey; $P \leq 0,05$) entre os tratamentos no mesmo dia. NS = não significativo.

6.6. Conteúdo de ergosterol

Não houve variação significativa no conteúdo de ergosterol ao longo do tempo (análise de regressão; $P \leq 0,01$) em tecidos do hipocótilo de plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01. A maior quantidade de ergosterol no hipocótilo de plantas de feijão inoculadas com *Fop* ocorreu aos 6 dai. Enquanto isso, o conteúdo de ergosterol presente nas raízes de plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01 aumentou (análise de regressão; $P \leq 0,01$) até os 6 dai (Figura 14). As raízes do cv. Uirapuru apresentaram o maior conteúdo de ergosterol aos 3 dai, enquanto as raízes UFSC-01 aos 6 dai.

Em média, as plantas do cv. Uirapuru apresentaram um conteúdo de ergosterol em raízes e hipocótilo, respectivamente, 16,2% e 35,2% maior do que plantas UFSC-01. Embora a quantidade média de ergosterol presente nos tecidos vegetais do genótipo suscetível (Uirapuru) tenha sido maior quando comparado ao genótipo resistente (UFSC-01), esta não apresentou diferença estatística significativa (teste t de Student; $P \leq 0,05$).

Figura 14. Conteúdo de ergosterol ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em hipocótilo e raiz de plantas suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.



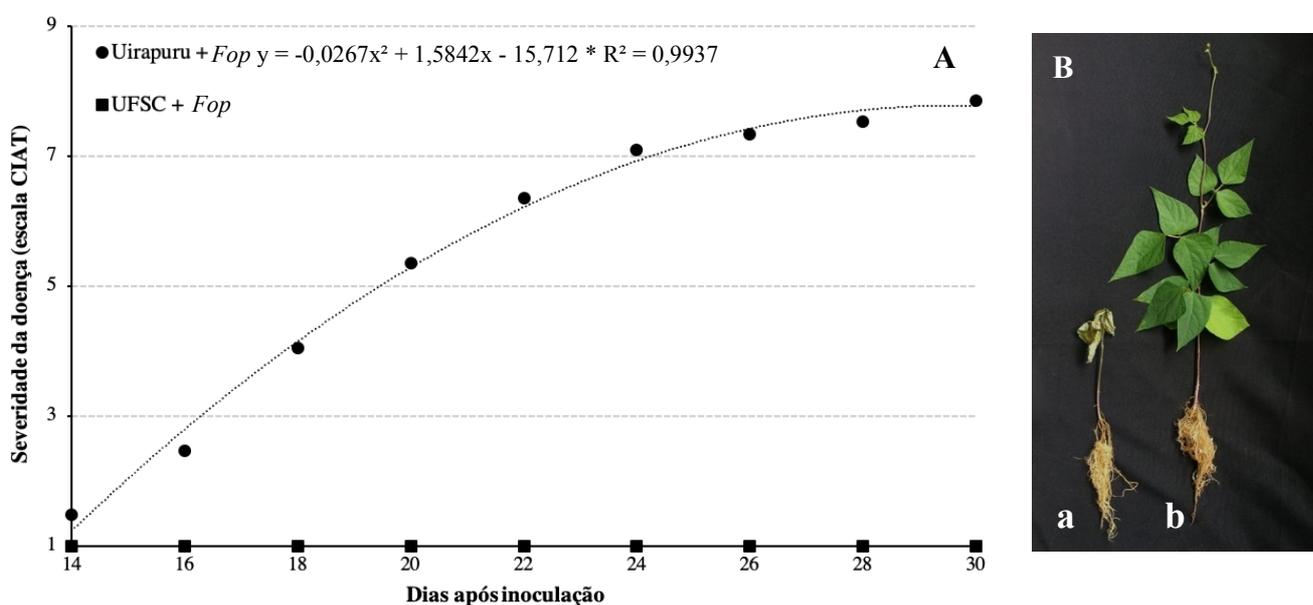
Asteriscos indicam diferença significativa no conteúdo de ergosterol ao longo do tempo (** $P \leq 0,01$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre o slope dos genótipos (teste t de Student; $P \leq 0,05$). ns indica diferença não significativa.

6.7. Severidade da doença e necrose vascular

A partir do momento da exibição dos primeiros sintomas da murcha de *Fusarium* foi feito o acompanhamento da evolução da doença através da avaliação da severidade (escala CIAT) em intervalos de 48h (Figura 15). Os sintomas iniciais, clorose e murcha nas folhas inferiores, da murcha de *Fusarium* foram manifestados aos 14 dai em plantas da cv. Uirapuru e as plantas UFSC-01 não exibiram sintomas visíveis da doença. Aos 20 dai, 17,46% das plantas

do genótipo Uirapuru apresentavam necrose foliar, desfolha e morte do tecido vegetal. Aos 24 dai todas as plantas do cv. Uirapuru exibiam sintomas externos da murcha de Fusarium em diferentes notas na escala de severidade e aos 26 dai, 57,14% das plantas destas plantas apresentavam a maior nota (9) na escala CIAT. O genótipo Uirapuru apresentou um aumento significativo (análise de regressão; $P \leq 0,01$) na intensidade dos sintomas da doença exibidos ao longo do tempo.

Figura 15. Evolução da murcha de Fusarium ao longo do tempo (A) e sintomas externos da doença aos 30 dai (B) em plantas suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli.



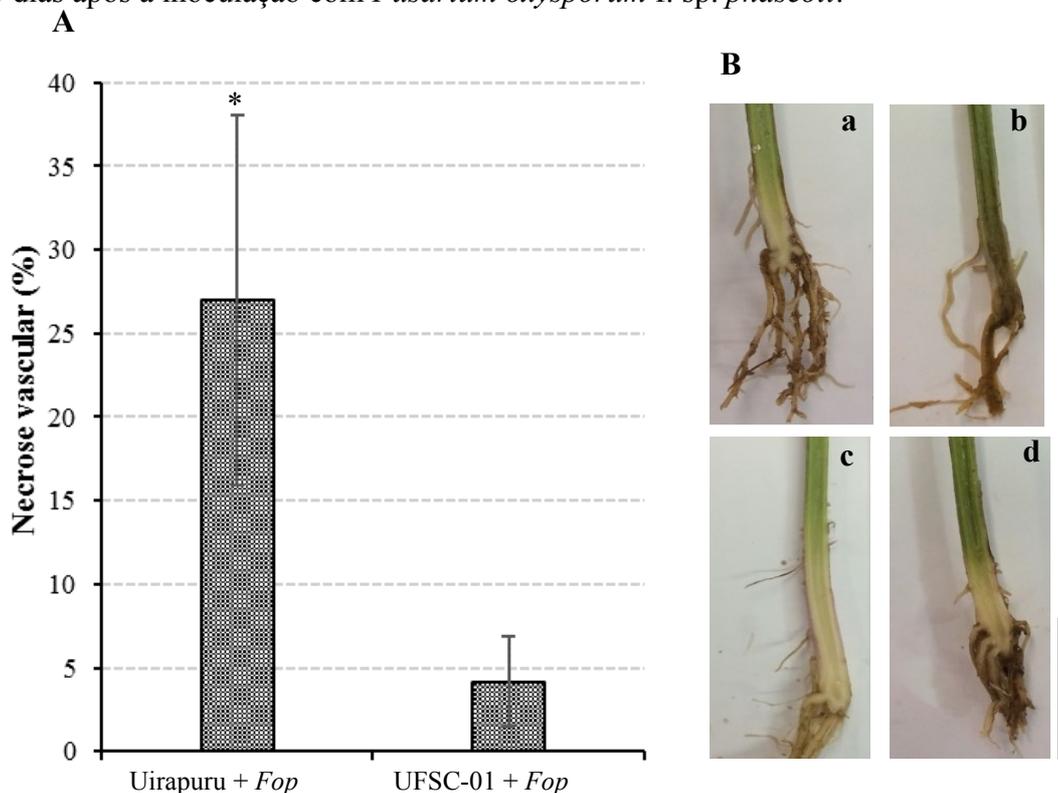
Asteriscos indicam diferença significativa da severidade da doença ao longo do tempo (* $P \leq 0,05$).

Aos 30 dai, a severidade da murcha de Fusarium foi significativamente diferente (teste de Wilcoxon-Mann-Whitney; $P \leq 0,05$) em plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01. Os genótipos Uirapuru e UFSC-01 atingiram, respectivamente, uma nota de 7,86 e 1,0 na escala CIAT, o que caracterizou a primeira como suscetível e a segunda como resistente à *Fop*. Na avaliação final da severidade, 63,49% das plantas do cv. Uirapuru apresentavam necrose foliar, desfolha e morte da planta, enquanto as plantas UFSC-01 não apresentavam sintomas externos da doença.

A necrose vascular em ambos genótipos apresentou diferença significativa (teste t de Student; $P \leq 0,05$) aos 30 dai. Plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01 apresentaram 27,02% e 4,17%, respectivamente, de necrose vascular no tecido aéreo na ocasião (Figura 16). Em plantas do cv. Uirapuru a necrose vascular foi observada ao longo das raízes, coroa da raiz e hipocótilo,

enquanto que em plantas UFSC-01, a necrose vascular foi observada apenas em raízes e região da coroa da raiz.

Figura 16. Necrose (A) e descoloração vascular (B) em plantas suscetível (a - Uirapuru não inoculado; b - Uirapuru + *Fop*) e resistente (c - UFSC-01 não inoculado; d - UFSC-01 + *Fop*) de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 30 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.



Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos (teste t de Student; $P \leq 0,05$). Barra de erro indica o desvio padrão da média. Barra: 2 cm.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado uma redução ao longo do tempo no conteúdo de fenólicos e flavonoides totais de raízes de plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01 inoculadas e não inoculadas com *Fop*. Esta redução pode ser explicada por pelo menos três razões: A) houve a exsudação destes compostos para a rizosfera na tentativa de impedir a colonização de *Fop* e B) estes compostos foram utilizados como precursores de outras moléculas durante a ativação de mecanismos de defesa pós-formados.

A síntese, acúmulo e liberação de compostos relacionados com a defesa de plantas pode ser estimulada após o estabelecimento da interação com patógenos (BAETZ; MARTINOIA, 2014) e isto foi demonstrado por LANOUE et al. (2010) no patossistema cevada – *Fusarium graminearum*, onde a inoculação com o patógeno induziu o acúmulo de ácido

cinâmico em raízes, aumento da exsudação desta substância e de outros fenólicos, bem como seu efeito direto sobre a germinação de macroconídios. Em um estudo de BANASIAK et al. (2013) foi demonstrado que após o silenciamento de um transportador ABCG em *Medicago truncatula*, responsável pela modulação do transporte entre membranas de compostos sinalizadores de defesa, houve uma redução da exsudação de isoflavonoides pelas raízes, expondo-as ao ataque de *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*, uma vez que esta resposta de defesa estava inativada.

O aumento do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais no hipocótilo de ambos genótipos é corroborada pela resposta de defesa demonstrada por GARCÉS-FIALLOS et al. (2017) e de QUADROS (2019) relacionada a barreiras física e bioquímicas contra *Fop* existente em tecidos vasculares destes genótipos, responsável por atrasar a colonização da parte aérea pelo patógeno no material resistente. A diferença encontrada no conteúdo médio de compostos fenólicos e flavonoides totais em diferentes tecidos vegetais também foi observada por CURIR et al. (2005) durante o acompanhamento do acúmulo de um flavonol em genótipo de cravo resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Em raízes, flavonoides geralmente são acumulados em células da coifa e ponta das mesmas, enquanto demais em células os flavonoides se acumulam no núcleo, vacúolo, parede e membrana celular, e ainda no citoplasma (HASSAN; MATHESIUS, 2012). Devido ao fato de que *Fop* penetra preferencialmente pela junção de raízes (NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015) e suas hifas crescem no espaço intercelular da epiderme e córtex da raiz até atingir o xilema (JIMENÉZ-FERNÁNDES et al., 2013; NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015; GARCÉS-FIALLOS et al. 2017; de QUADROS, 2019), locais onde o acúmulo de flavonoides é restrito, o efeito direto destes metabólitos sobre o patógeno pode ser limitado.

A produção de faseolina após a indução com elicitores bióticos e abióticos é frequentemente relatada na literatura (BAILEY, 1974; SMITH et al., 1975; GOOSSENS; VAN LAERE, 1983; GOOSSENS et al., 1987; BOZKURT; SOYLU, 2011; DURANGO et al., 2013; SOLINO et al., 2017) porém, ainda não havia relatos da sua produção durante a interação com *Fop*, sendo este o primeiro trabalho a fazê-lo.

O acúmulo de faseolina nas raízes foi maior do que no hipocótilo de plantas de feijão suscetíveis e resistentes a *Fop*, corroborando o fato de que fitoalexinas acumulam rapidamente nos locais de infecção após o ataque de patógenos tanto em tecido suscetível quanto resistente (GROßKINSKY et al., 2012). A redução no conteúdo de faseolina ao longo do tempo em ambos tecidos vegetais pode estar relacionada com a capacidade de detoxificação exibida por fungos do gênero *Fusarium* já relatada para diversas fitoalexinas produzidas por Fabaceae, como por

exemplo a própria faseolina através da ação de *F. solani* f. sp. *phaseoli* (KISTLER; VAN ETTEN, 1981), a faseolidina também por *F. solani* f. sp. *phaseoli* (TURBEK et al., 1992), a medicarpina por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (WELTRING et al., 1983) e a pisiatina por *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (DELSERONE et al., 1999).

O maior conteúdo de lignina em raízes resistentes inoculadas com *Fop* ao 1 dai pode estar associado à resposta primária de lignificação na tentativa de impedir a penetração e colonização do patógeno, através da maior expressão de genes como polifenol oxidase, com diversas funções na rota dos fenilpropanoides incluindo a produção de polímeros de lignina (STRACK; SCHLIEMANN, 2001), relatada por CHEN et al. (2019). Porém, a redução do conteúdo de lignina nas raízes em conjunto com a maior quantidade de ergosterol até os 6 dai seguido pelo redução aos 9 dai, leva a acreditar que os mecanismos empregados pelo patógeno para favorecer sua colonização foram mais eficientes do que aqueles utilizados pela planta para se defender.

A redução ao longo do tempo no conteúdo de lignina nas raízes encontrada neste trabalho pode estar relacionada com a capacidade de *Fop* em modificar a parede primária, dissolver o citoplasma e alterar completamente a arquitetura de células do xilema relatada por XUE et al. (2015) bem como às alterações no acúmulo de transcritos e metabólitos ligados ao enfraquecimento de mecanismos de defesa estruturais em raízes de feijão relatadas por CHEN et al. (2019) em resposta à inoculação com *Fop* em material suscetível. O conjunto de alterações na arquitetura celular e enfraquecimento estrutural de raízes de feijão após inoculação com *Fop* facilitaria a obtenção de nutrientes e colonização do tecido suscetível e resistente, o que pode ser corroborado pelo aumento do conteúdo de ergosterol até os 6 dai observado neste estudo.

Em trabalho recente no patossistema feijão – *Fop*, GARCÉS-FIALLOS et al. (2017) determinaram o conteúdo de ergosterol presente em raiz, hipocótilo e epicótilo de plantas do cv. Uirapuru e UFSC-01 inoculadas com *Fop* durante o período de 5 aos 30 dai. Aos 5 dai os tecidos de raízes, hipocótilos e epicótilos do genótipo UFSC-01 apresentavam um baixo conteúdo de ergosterol ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco no hipocótilo) e não apresentou mudança significativa ao longo do tempo neste genótipo. Enquanto isso, o conteúdo de ergosterol permaneceu o mesmo em raízes de plantas do cv. Uirapuru e apresentou uma tendência de aumento ao longo do tempo no hipocótilo. Apesar de se tratar do mesmo patógeno e hospedeiro, estas tendências não foram observadas neste trabalho e uma das prováveis razões para isto é a diferença entre o momento de avaliação estabelecido (de 5 a 30 dai no trabalho dos autores citados e de 1 a 9 dai no presente trabalho). Além disso, não se pode excluir a possibilidade de

uma variação na determinação do conteúdo de ergosterol causado por diferentes espécies, nutrição mineral e estágio de crescimento da planta (BARAJAS-ACEVES et al., 2002).

O conteúdo médio de ergosterol superior no tecido do hipocótilo do genótipo suscetível em relação ao do genótipo resistente pode ser explicado pelo fato de que o hipocótilo é uma região onde patógenos vasculares como *Fop* adquirem os nutrientes necessários para seu desenvolvimento, evitam competição com outros microrganismos e esporulam facilitando o transporte de microconídios para partes mais elevadas do tecido vegetal (YADETTA; THOMMA, 2013; NIÑO-SANCHÉZ et al., 2015; GARCÉS-FIALLOS et al., 2017). A redução do conteúdo de ergosterol aos 9 dai no hipocótilo pode estar relacionado com a diluição do composto devido ao crescimento vegetal, morte do fungo ou degradação do composto. Já o conteúdo de ergosterol nas raízes similar ao longo do tempo e entre o genótipo resistente e suscetível encontrado neste trabalho é corroborado pelo relato de GARCÉS-FIALLOS et al. (2017) e de QUADROS (2019) que após observações microscópicas do processo de colonização de *Fop* em feijão ficou demonstrado que o fungo é capaz de penetrar e colonizar tanto raízes suscetíveis quanto resistentes.

Os sintomas iniciais da murcha de *Fusarium* se manifestaram aos 14 dai em plantas do genótipo Uirapuru e evoluíram gradativamente até atingir sintomas mais severos, como a necrose foliar, desfolha e morte de planta aos 30 dai, enquanto plantas do genótipo UFSC-01, oriundo da segregação do genótipo Uirapuru (de FREITAS; STADNIK, 2012) e resistente à *Fop* (de BORBA et al., 2017), não exibiram sintomas externos da doença. Esta diferença fenotípica na exibição de sintomas externos da murcha de *Fusarium* em genótipos de feijão resistente e suscetível à *Fop* já foi relatada anteriormente (SALGADO; SCHWARTZ, 1993; XUE et al., 2015; GARCÉS-FIALLOS et al., 2017; de BORBA et al., 2017; de QUADROS et al., 2019) e pode estar associada ao mecanismos de resistência de feijão ao patógeno que atuam como barreiras físicas e são capazes de impedir ou atrasar a colonização dos tecidos vegetais acarretando em menor exibição de sintomas externos ou ausência dos mesmos (BURUCHARA; CAMACHO, 2000; GARCÉS-FIALLOS et al., 2017; de QUADROS, 2019).

Embora não tenham exibido sintomas externos da murcha de *Fusarium*, plantas do genótipo UFSC-01 apresentaram descoloração vascular restrita à região das raízes e coroa da raiz. A restrição ao sistema radicular e coroa da raiz da necrose vascular no genótipo UFSC-01 pode estar associada à presença de materiais de oclusão e metabólitos caracterizados como carboidratos e fenólicos nestes tecidos que, atuam como barreiras permeáveis bloqueando o transporte de microconídios de *Fop* para os tecidos aéreos impedindo o progresso da colonização ou criando um ambiente inóspito para o desenvolvimento do patógeno (GARCÉS-

FIALLOS et al., 2017; de QUADROS, 2019). Em plantas do cv. Uirapuru, a necrose vascular foi observada tanto no sistema radicular quanto na extensão do hypocótilo, em uma taxa 6,5 vezes maior do que no genótipo resistente, semelhantemente ao que foi relatado por de QUADROS et al. (2019).

8. CONCLUSÃO

A resistência genética do genótipo UFSC-01 a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* parece não estar relacionada à ação de metabólitos secundários como os compostos fenólicos, flavonoides, à fitoalexina faseolina e lignina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research and Methodologies and Management Strategies**. Cali, Colombia, 114 p., 1990.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 2. ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 922 p., 2005.

AGUILERA, Y.; Dueñas, M.; ESTRELLA, I., HERNÁNDEZ, T.; BENITEZ, V.; ESTEBAN, R. M.; MARTÍN- CABREJAS, M. A. Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of *Pardina lentil* as affected by industrial dehydration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(18), 10101–10108, 2010.

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A.M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends In Plant Science**, v. 17, n. 2, p.73-90, 2012.

ALVES-SANTOS, F. M. et al. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**, v. 51, n. 5, p.605-611, 2002.

AZPILICUETA, C. E.; ZAWOZNIK, M. S.; TOMARO, M. L. Phytoalexins synthesis is enhanced in groundnut plants inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*). **Crop Protection**, v. 23, n. 11, p.1069-1074, 2004.

BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates: the hidden part of plant defense. **Trends In Plant Science**, v. 19, n. 2, p.90-98, 2014.

BAILEY, J.A. The relationship between symptom expression and phytoalexin concentration in hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, 4, 477-488, 1974.

BAIS, H.P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.** 57, 233–266, 2006.

BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Resistência de germoplasmas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**. v.15, n.1, p.102-103, 1990.

BALDRIAN, P.; VĚTROVSKÝ, T.; CAJTHAML, T.; DOBIÁŠOVÁ, P.; PETRÁNKOVÁ, M.; ŠNAJDR, J.; EICHLEROVÁ, I. Estimation of fungal biomass in forest litter and soil. **Fungal Ecology**, 6(1), p. 1–11, 2013.

BANASIAK, J. et al. A *Medicago truncatula* ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. **Journal Of Experimental Botany**, v. 64, n. 4, p. 1005-1015, 2013.

BARAJAS-ACEVES, M. et al. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 50, n. 3, p.227-236, 2002.

BARROS, J. et al. The cell biology of lignification in higher plants. **Annals Of Botany**, v. 115, n. 7, p.1053-1074, 2015.

BATISTA, R. O. et al. Inheritance of resistance to fusarium wilt in common bean. **Euphytica**, v. 213, n. 7, p. 1–12, 2017.

BECKMAN, C. H. **The nature of wilt diseases of plants**. St Paul: APS Press, 175 p., 1987.

BEDENDO, I. P. Murchas vasculares. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamim Filho, A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**, 5 ed. Ouro Fino-MG, Agronômica Ceres, v. 1. p. 333-338, 2018.

BHUIYAN, N. H. et al. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defense in wheat against powdery mildew invasion. **Journal Of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p.509-521, 2009.

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**, 4 ed. São Paulo, Ceres. v. 2, p. 333-349, 2005.

BITOCCHI, E., et al. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytologist**, v. 197, n. 1, p. 300-313, 2012.

BOLLINI, R.; VITALE, A. Genetic variability in charge microheterogeneity and polypeptide composition of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris*; and peptide maps of its three major subunits. **Physiologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 96-100, 1981.

BOZKURT, I. A.; SOYLU, S. Determination of responses of different bean cultivars against races of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, causal agent of halo blight of bean. **Euphytica**, v. 179, n. 3, p.417-425, 2011.

BURUCHARA R.; CAMACHO, L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. **J Phytopathol**, 148:39–45, 2000.

CARDOSO, C. O. M.; KIMATI, H.; FERNANDES, N. G. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium oxysporium* f. sp. *phaseoli* (Schlecht) Kendrick & Snyder causando murcha vascular em feijoeiro. **Anais da ESALQ**, v. 23, p. 273–276, 1996.

CARVALHO, F. T.; PEREIRA, F. A. R. Controle de plantas daninhas. In: ARF O. (Ed.) **Aspectos gerais da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)** 1 ed., FEPAF, Botucatu/SP, 2015. Cap. 11, p. 209-218.

CESCO, S. et al. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. **Plant Soil** 329, 1–25, 2010.

CHEN, L. et al. Combined De Novo Transcriptome and Metabolome Analysis of Common Bean Response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Infection. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p.1-17, 2019.

CHEN, P. X. et al. Free and conjugated phenolic compounds and their antioxidant activities in regular and non-darkening cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats. **Journal Of Functional Foods**, v. 18, p. 1047-1056, 2015.

CONAB. (2019). Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de grãos. v. 7; n. 3; p. 1-106; safra 2019/10, Brasília/DF, dezembro 2019.

CONINCK, B. et al. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. **Trends In Plant Science**, v. 20, n. 2, p. 91-101, 2015.

COSTA, A.F. da; MENEZES, M.; MIRANDA, P. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick; Snyder em feijoeiro, (*Phaseolus vulgaris* L.) em Pernambuco, Alagoas. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1., Goiânia, 1982. **Anais**. Goiânia: EMBRAPA, CNPAF, p.282-284, 1982.

CRUZ, B.P.B.; TERANISH, L.; ISSA, E. Resistência de cultivares de feijão vagem a murcha de *Fusarium*. **O Biológico**, v.40, p.25-32, 1974.

CURIR, P.; DOLCI, M.; GALEOTTI, F. A phytoalexin-like flavonol involved in the carnation (*Dianthus caryophyllus*) – *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* pathosystem. **J. Phytopathology**, 153, p. 65 – 67, 2005.

de BORBA, M. C.; GARCÉS-FIALLOS, F. R.; STADNIK, M. J. Reactions of black bean seedlings and adult plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Crop Protection**, v. 96, p.221-227, 2017.

de FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Race-specific and ulvan-induced defence responses in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and molecular plant pathology**, 78, p. 8-13, 2012.

de FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Ulvan-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Alternaria brassicicola* requires reactive oxygen species derived from NADPH oxidase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 90, p.49-56, 2015.

de LA PENA, C. et al. Root secretion of defense-related proteins is development-dependent and correlated with flowering time. **J. Biol. Chem.** 285, 30654–30665, 2010.

de QUADROS, F. M. **Análises morfofisiológicas e bioquímicas com ênfase na peroxidação lipídica durante a interação do feijoeiro com *Fusarium oxysporum***. 2019. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2019.

de QUADROS, F. M; GARCÉS-FIALLOS, F. R.; de BORBA, M. C; de FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. *Fusarium oxysporum* affects differently the hydrogen peroxide levels and oxidative metabolism in susceptible and resistant bean roots. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 106, p.1-6, 2019.

DELSERONE, L.M., MCCLUSKEY, K., MATTHEWS, D.E., VANETTEN, H.D. Pisatin demethylation by fungal pathogens and nonpathogens of pea: association with pisatin tolerance and virulence. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 55, 317–326, 1999.

DEWICK, P. M.; STEELE, M. J. Biosynthesis of the phytoalexin phaseollin in *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1599-1603, 1982.

DHINGRA, O. D. et al. Selection of endemic nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* from bean roots and rhizosphere competent fluorescent *Pseudomonas* species to suppress Fusarium-yellow of beans. **Biological Control**, v. 39, n. 1, p.75-86, 2006.

DI PIETRO, A. et al. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 5, p. 315–325, 2003.

DIRAR, A. I. et al. Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. **South African Journal Of Botany**, v. 120, p.261-267, jan. 2019.

DIVON, H. H. et al. The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 6, p. 485–97, 2006.

DURANGO, D.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; ROSERO, Y.; GIL, J.; ECHEVERRI, F. Phytoalexin accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. **Molecules**, 7, 817-832, 2002.

DURANGO, D. et al. Effect of Salicylic Acid and Structurally Related Compounds in the Accumulation of Phytoalexins in Cotyledons of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Molecules**, v. 18, n. 9, p.10609-10628, 2013.

EL MODAFAR C., EL BOUSTANI, E. Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*. **Biol Plant**, 44:125–130, 2001.

EPAGRI – Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de Santa Catarina. **Boletim agropecuário**, n° 69. 18 fev 2019. Disponível em: http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/Boletim_agropecuario/boletim_agropecuario_n69.pdf Acesso em: 24 dez 2019.

FAN, G.; BETA, T. Discrimination of geographical origin of Napirira bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on phenolic profiles and antioxidant activity. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 62, p.217-222, 2017.

FAO. FAOSTAT. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 8 dez 2019.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 1-15, 2012.

FIALHO, R. O.; PAPA, M. F. S.; CERESINI, P. C. Doenças. In: ARF O. (Ed.) **Aspectos gerais da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)** 1 ed., FEPAF, Botucatu/SP, p. 253-282, 2015.

GARCÉS-FIALLOS, F. R. et al. Delayed upward colonization of xylem vessels is associated with resistance of common bean to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, n. 2, p.477-489, 16 mar. 2017.

GARCÍA-SÁNCHEZ, M. A. et al. *fost12*, the *Fusarium oxysporum* homolog of the transcription factor *Ste12*, is upregulated during plant infection and required for virulence. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 3, p. 216–225, 2010.

GAUTHIER, L.; BONNIN-VERDAL, M. N.; MARCHEGAY, G.; et al. Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: New insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, 221, 61–68, 2016.

GEISER, D. M. et al. One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 400–408, 2013.

GEPTS, P.; BLISS, F. A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. **Economic Botany**, 40, 469–478, 1986.

GEPTS P.; OSBORN T. C.; RASHKA K.; BLISS F. A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple centers of domestication, **Econ. Bot.** 40, 451–468, 1986.

GEPTS, P. Phaseolin as an Evolutionary Marker. In: **Genetic Resources of Phaseolus Beans**, P. Gepts (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 215–241, 1998.

GOOSSENS, J. F.; STABEL, A.; VENDRIG, J. C. Relationship between kievitone and phaseollin accumulation in different tissues of *Phaseolus vulgaris* in response to treatment with mercuric chloride, a fungal wall elicitor and abscisic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 30, p. 1-12, 1987.

GOSSSENS, J. F.; VAN LAERE, A. J. High-performance liquid chromatography of isoflavonoid phytoalexins in French Bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Chromatography**, 267, p. 439-442, 1983.

GOULART, A. C. P. Doenças do feijoeiro na região Norte de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.3, p.230-232, 1988.

GRAHAM, P. H; VENCE, C. P. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p.872-877, 2003.

GRAYER, R. J.; KOKUBUN, T. Plant-fungal interaction: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, 56, 253-263, 2001.

GROBKINSKY, D. K.; GRAAFF, E. D.; ROITSCH, T. Phytoalexin transgenics in crop protection—Fairy tale with a happy end? **Plant Science**, v. 195, p.54-70, 2012.

HALL, C.; HEATH, R.; GUEST, D. The infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australian cotton. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2013.

HALL, T. C.; CHANDRASEKHARAN, M. B.; LI, G.: Phaseolin: Its Past, Properties, Regulation and Future. In: **Seed Proteins**, P.R. Shewry, R. Casey (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 209–240, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review Of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p.285-306, 1999.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (Eds.) **Biochemistry and molecular biology of plants**, 2 ed., Chichester, Reino Unido, American Society of Plant Biologists, Wiley Blackwell, p. 984-1050, 2015.

HARBORNE, J.B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochem. System. Ecol.** 27, 335–367, 1999.

HASSAN, S.; MATHESIUS, U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signaling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. **Journal Of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3429-3444, 2012.

HELDT, H. W.; PIECHULLA, B. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In: Heldt, H. W.; Piechulla, B. **Plant biochemistry**, 4 ed., EUA, Elsevier, p. 431 – 449, 2011.

JEANDET, P. et al. Deciphering the Role of Phytoalexins in Plant-Microorganism Interactions and Human Health. **Molecules**, v. 19, n. 11, p.18033-18056, 2014.

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D., LANDA, B.B., KANG, S., JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., NAVAS-CORTÉS, J.A. Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interactions between chickpea cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races. *Plos One* 8, e61360, 2013.

KENDRICK, J. B.; SNYDER, W. C. Fusarium yellows of beans. **Phytopathology**, v. 32, n. 11, p. 1010–1014, 1942.

KHALID, M. et al. Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review. **Journal Of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 1, p. 211-230, 2019.

KISTLER, H. C.; VAN ETTEN, H. D. Phaseollin metabolism and tolerance in *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Physiological Plant Pathology**, 19, 257-271, 1981.

KOENING, R. L.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, 44, 50–60, 1990.

KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnol Food Sci**, 80 (2), p. 97-108, 2016.

KUTCHAN, T. M.; GERSHENZON, J.; MØLLER, B. L.; GANG, D. R. Natural products. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (Eds) **Biochemistry & molecular biology of plants**, 2 ed. West Sussex, Wiley Blackwell, John Wiley & Sons. p. 1132-1205, 2015.

LANOUE, A. et al. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to Fusarium attack in barley. **New Phytologist**, v. 185, n. 2, p.577-588, 29, 2010.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in Research**, ISBN 81-308-0034-9, p. 23-67, 2006.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **Fusarium laboratory manual**. Iowa: Blackwell Publishing, 388 p., 2006.

LIU, Xin et al. Involvement of FgERG4 in ergosterol biosynthesis, vegetative differentiation and virulence in *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 1, p.71-83, 2013.

MAKOI, J. H. J.R; NDAKIDEMI, P. A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. **African Journal of Biotechnology**, v. 6 (12), p. 1358-1368, 18, 2007.

MAMIDI, S., et al. Demographic factors shaped diversity in the two gene pools of wild common bean *Phaseolus vulgaris* L. **Heredity**, v. 110, n. 3, p.267-276, 2012.

MANSFIELD, J. W. Antimicrobial compounds and resistance: the roles of phytoalexins and phytoanticipins. In: Slusarenko, A. J.; Fraser, R. S. S.; van Loon, L. C. (Eds.) **Mechanisms of resistance to plant diseases**, 1 ed, Springer-Science Business, p. 325-370, 2000.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with environment. **Molecules**, 19, p. 16240-16265, ISSN 1420-3049, 2014.

MOHAMED, M. S.M. et al. Growth, hydrolases and ultrastructure of *Fusarium oxysporum* as affected by phenolic rich extracts from several xerophytic plants. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 141, p.57-64, 2017.

MOHAN, S. K.; BIANCHINI, A.; MENEZES, R. J. **Doenças do feijoeiro no Estado do Paraná: Guia para identificação e controle**. Londrina: IAPAR, p.26., 1983.

MONTOYA, C. A.; LALLÈS, J.; BEEBE, S.; LETERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 443-449, 2010.

NABAVI, S. M; ŠAMEC, D.; TOMCZYK M.; MILELLA, L. et al., Flavonoids biosynthetic pathways in plants: versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology advances**, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.005>

NIEMENMAA, O.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 2, p.125-134, 2008.

NIÑO-SÁNCHEZ, J. et al. 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**, v. 6, p.1-14, 2 abr. 2015.

OLIVEIRA, L. F. C., et al. **Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos**. Embrapa, 2 ed. rev. e ampl., 61 p., Brasília/DF, 2018.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamim Filho, A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**, 5 ed. Ouro Fino-MG, Agronômica Ceres, v. 1. p. 423-452, 2018.

PASTOR-CORRALES, M. A., & ABAWI, G. S. Reactions of selected bean germ plasm to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease*, 71(11), 990–993, 1987.

PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK-REY, N.; BEDNAREK, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*, v. 206, n. 3, p.948-964, 2015.

PORTUGAL, J. R.; PERES, A. R.; RODRIGUES, R. A. F. Aspectos climáticos do feijoeiro. In: ARF O. (Ed.) **Aspectos gerais da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)** 1 ed., FEPAF, Botucatu/SP, 2015. Cap. 4, p. 65-75.

POSSE, S. C. P.; RIVA-SOUZA E. M.; SILVA G. M.; FASOLO L. M.; SILVA, M. B.; ROCHA, M. A. M.; **Informações Técnicas para o cultivo do feijoeiro comum na região central-brasileira: 2009-2011**. Vitória, ES, Incaper, 245p. (Incaper documentos, 191), 2010.

RAMOS, B. et al. The gene coding for a new transcription factor (ftf1) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 9, p.864-876, set. 2007.

RONCERO, M. I. G. et al. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 87–98, 2003.

SALGADO, M. O.; SCHWARTZ, H. F. Physiological specialization and effects of inoculum concentration on *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. **Plant Disease**, v. 77, n. 5, p. 492–496, 1993.

SANTOS, G. R. D. et al. Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da micoflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v. 43, n. 249, p. 621–627, 1996.

SANTOS, J.B.; GAVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2.ed. Viçosa/MG: Editora UFV, p. 41-65, 2006.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Murcha ou amarelecimento de Fusarium. In: Sartorato A, Rava CA (eds). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Embrapa-SPI, Brasília, p. 175–190, 1994.

SATTLER, S. E.; FUNNELL-HARRIS, D. L. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? **Frontiers In Plant Science**, v. 4, p.1-8, 2013.

SCHMUTZ, J. et al. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p.707-713, 2014.

SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R.; HALL, R.; FORSTER, R.L. **Compendium of Bean Diseases**, 2 ed. American Phytopathological Society (APS Press), 2005.

SILVA, M. G. Implantação da cultura. In: ARF O. (Ed.) **Aspectos gerais da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)** 1 ed., FEPAF, Botucatu/SP, Cap. 9, p. 163-180, 2015.

SILVA, H. T.; COSTA, A. O. **Caracterização botânica de espécies silvestres do gênero *Phaseolus* L. (Leguminosae)**. Embrapa Arroz e Feijão, Documentos 156, 40 p., Santo Antônio de Goiás/GO, 2003.

SINGH, S. P.; Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review, **Crop Sci.** 41 1659–1675, 2001.

SIRANIDOU, E., KANG, Z., BUCHENAUER, H. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to Fusarium Head Blight. **J. Phytopathol.** 150, p. 200–208, 2002.

SMITH, D. A.; VAN ETEN, H. D.; BATEMAN, D. F. Accumulation of phytoalexins in *Phaseolus vulgaris* hypocotyls following infection by *Rhizoctonia solani*. **Physiological Plant Pathology**, v. 5, p. 51-64, 1975.

SOLEDADE, M.; PEDRAS, C.; ABDOLI, A. Pathogen inactivation of cruciferous phytoalexins: detoxification reactions, enzymes and inhibitors. **RSC Advances**, 7(38): 23633-23646, 2017.

SOLINO, A. J. S. Accumulation of phytoalexins in beans, soybeans and sorghum by fungal filtrates. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p.1073-1078, 2017.

SOUSA, M. V. et al. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. **Plant Pathology**, v. 64, n. 2, p.478-488, 2014.

STADNIK, M.J; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 25-34, 2000.

STRACK, D.; SCHLIEMANN, W. Bifunctional polyphenol oxidases: novel functions in plant pigment biosynthesis. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.** 40:3791-3794, 2001.

SUN S. M.; MUTSCHLER, M. A.; BLISS, F. A.; HALL, T. C. Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth. **Plant Physiol.** 61, 918–923. 35, 1978.

THORDAL-CHRISTENSEN H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, 6: 351–357, 2003.

TREUTTER, Dieter. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, n. 3, p.147-157, 2006.

TURBEK, C.S., LI, D., CHOI, G.H., SCHARDL, C.L., SMITH, D.A. Induction and purification of kievitone hydratase from *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Phytochemistry** 29, 2841–2846, 1990.

USDA – United States Department of Agriculture. Foreign agricultural service. Global agricultural information network. **Brazilian dry bean production**. BR0627. 12 Aug 2010. Disponível em:

https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Brazilian%20Dry%20Bean%20Production_Brasilia_Brazil_12-8-2010.pdf Acesso em: 24 jun 2019.

VANETTEN, H. D. et al. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus. **The Plant Cell**, 6 (9), p.1191-1192, 1994.

VANHOLME R.; DEMEDTS B.; MORREEL K.; RALPH J.; BOERJAN W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiol.** 153: 895–905, 2010.

VARGA, M., BARTÓK, T., & MESTERHÁZY, Á. Determination of ergosterol in *Fusarium*-infected wheat by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, 1103(2), 278–283, 2006.

VAN SCHOONHOVEN, A., PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm**. CIAT, Cali, 1987.

VLASOVA, A. et al. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p.1-18, 2016.

VILHORDO, B.W.; MIKUSINKI, O. M. F.; BURIN, M. E.; GANDOLFI, V. H. Morfologia. In: ARAÚJO, R.S. (Coord). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, p.71-99, 1996.

WELTRING, K.M., BARZ, W., DEWICK, P.M. Degradation of the phytoalexin medicarpin by *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry** 22, 2883–2884, 1983.

WESTON, L.A. et al. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. **J. Exp. Bot.** 63, 3445–3454, 2012.

WORDELL FILHO, J. A. et al. Manejo de doenças na cultura do feijão, in: WORDELL FILHO, J.A.; CHIARADIA, L.A.; BALBINOT, A. (Eds.), **Manejo Fitossanitário na Cultura do Feijão**. EPAGRI, Florianópolis, 2013, v. 1, 47 p

XUE, R. et al. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plos One**. v. 10, e0127698, 2015.

XUE, R. F. et al. Salicylic Acid Enhances Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal Of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p.470-476, 2013.

YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-12, 2013.

YAO, Y.; HU, Y.; ZHU, Y.; GAO, Y.; REN, G.. Comparisons of phaseolin type and α -amylase inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in China. **The Crop Journal**, v. 4, n. 1, p. 68-72, 2016.

YIN, S.; TANG, C.; WEN, Q.; YANG, X.. Conformational and thermal properties of phaseolin, the major storage protein of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 91, n. 1, p. 94-99, 2010.

YUN, Y.; YIN, D.; DAWOOD, D. H.; LIU, X.; CHEN, Y.; MA, Z. Functional characterization of FgERG3 and FgERG5 associated with ergosterol biosynthesis, vegetative differentiation and virulence of *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**, 68, p. 60 – 70, 2014.

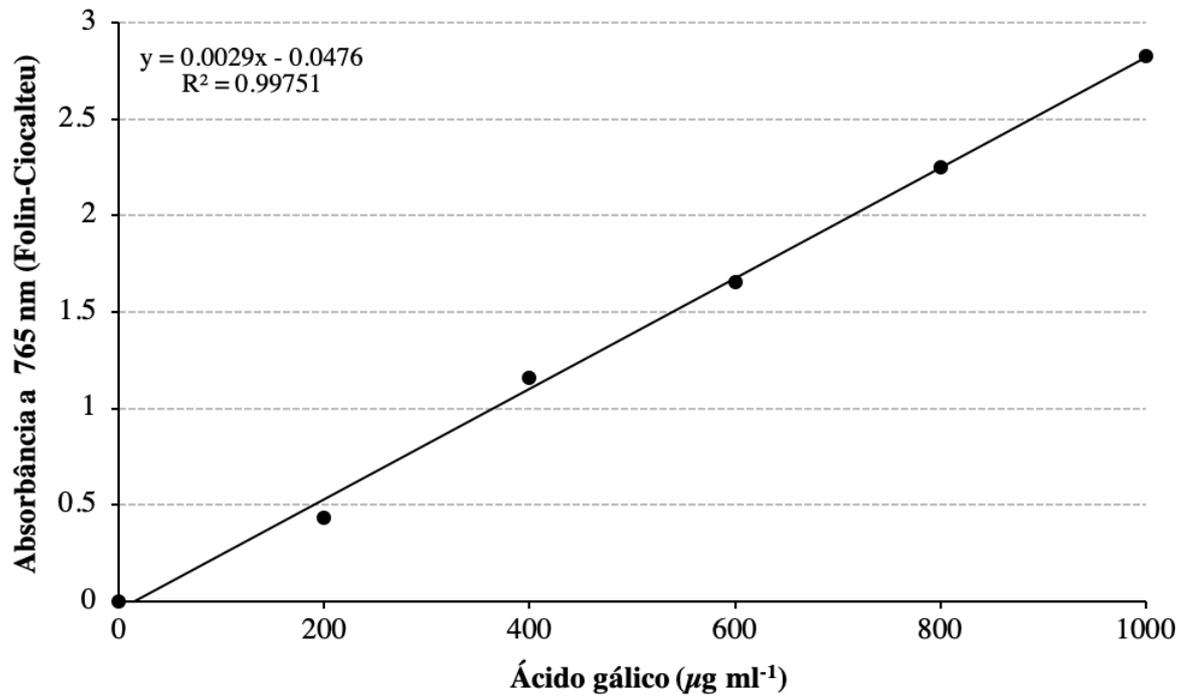
ZAMBOLIM, L.; VIEIRA, C.; ARAUJO, G.A.A.; CHAGAS, J.M.N; SILVA, C.C. Ocorrência de murcha de *Fusarium* em feijoeiros na zona da mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.3, p.287-288, 1987.

ZVIRIN, T. et al. Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1-2. **Plant Pathology**, v. 59, n. 3, p.576-585, 2010.

10. APÊNDICES

10.1. Apêndice A

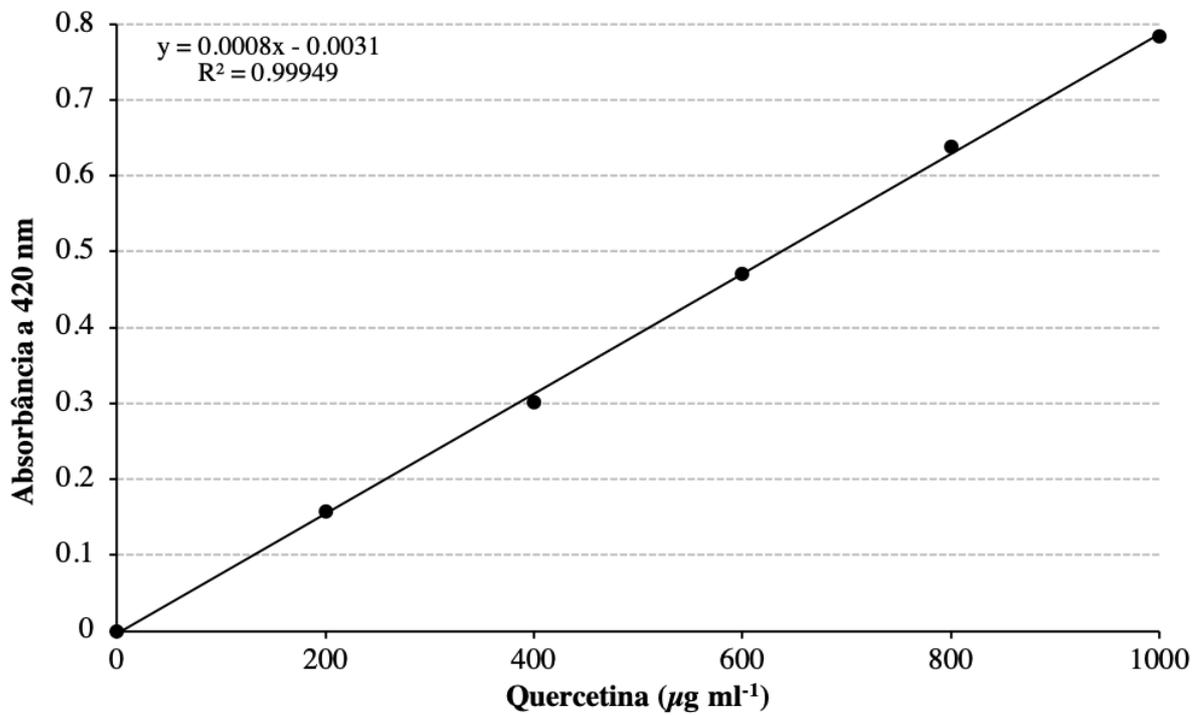
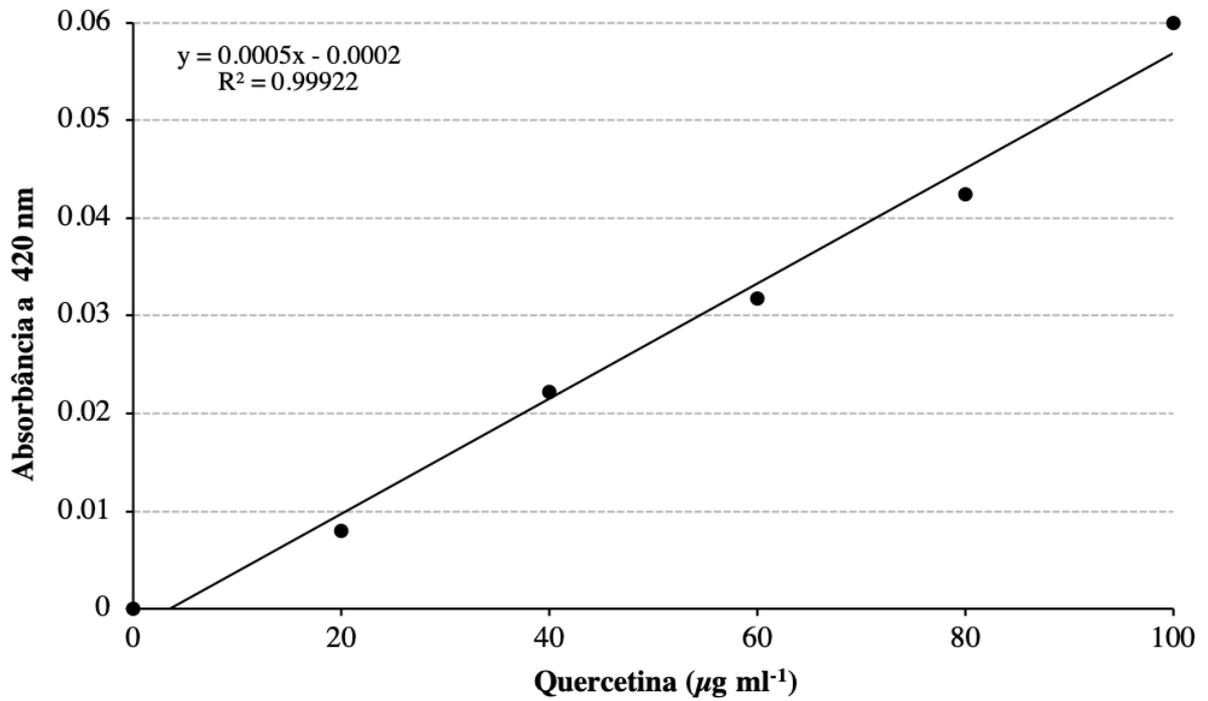
Curva padrão de ácido gálico



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

10.2. Apêndice B

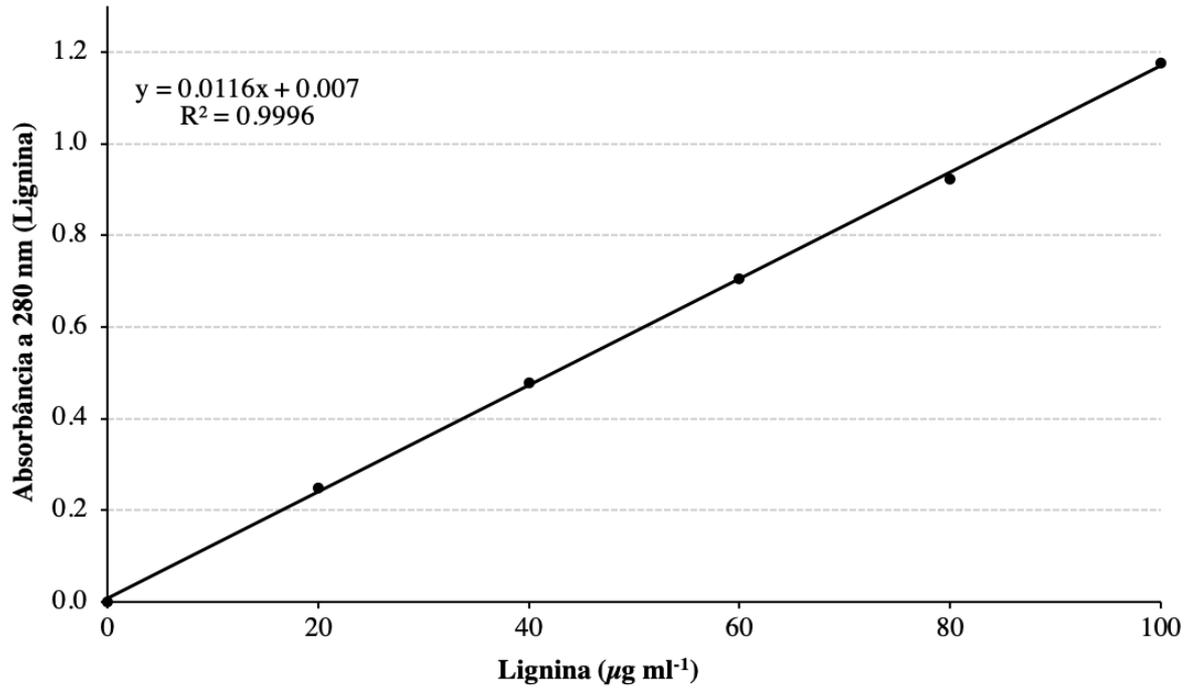
Curva padrão de quercetina



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

10.3. Apêndice C

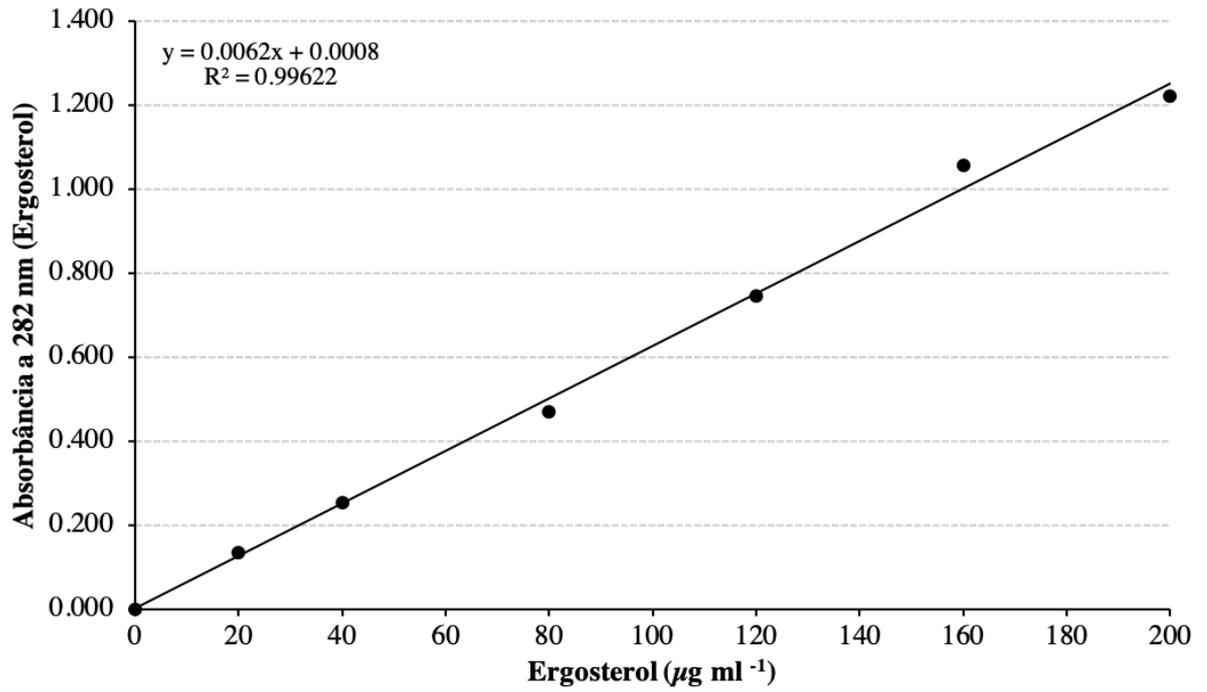
Curva padrão de lignina



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

10.4. Apêndice D

Curva padrão de ergosterol



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

10.5. Apêndice E

Conteúdo de fenólicos totais ($\mu\text{g EAG g}^{-1}$ peso fresco) em raízes e hipocótilo de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Conteúdo de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g EAG g}^{-1}$ peso fresco)								
Tecido vegetal	Raiz				Hipocótilo			
Tratamento	1 dai	3 dai	6 dai	9 dai	1 dai	3 dai	6 dai	9 dai
Uirapuru não inoculado	21,74 \pm 2,59 ¹	17,51 \pm 2,45	13,70 \pm 2,68	8,17 \pm 1,37	43,33 \pm 3,63	41,77 \pm 4,23	40,20 \pm 4,23	33,29 \pm 5,28
UFSC-01 não inoculado	20,28 \pm 2,76	16,48 \pm 2,84	9,99 \pm 2,83	8,67 \pm 1,83	49,40 \pm 4,35	44,90 \pm 3,79	41,19 \pm 2,76	39,32 \pm 6,62
Uirapuru + <i>Fop</i>	22,80 \pm 3,52	22,02 \pm 3,58	14,89 \pm 3,55	10,42 \pm 2,40	41,35 \pm 5,46	39,77 \pm 1,96	37,90 \pm 2,16	33,65 \pm 2,46
UFSC-01 + <i>Fop</i>	20,94 \pm 5,45	19,47 \pm 2,41	12,95 \pm 3,21	9,75 \pm 2,38	49,73 \pm 5,70	44,53 \pm 3,84	38,02 \pm 2,87	37,42 \pm 2,80
Média geral	21,44 \pm 1,08	18,87 \pm 2,44	12,88 \pm 2,09	9,25 \pm 1,02	49,95 \pm 4,25	42,74 \pm 2,43	39,33 \pm 1,63	35,92 \pm 2,94

¹ Média \pm desvio padrão

10.6. Apêndice F

Conteúdo de flavonoides totais ($\mu\text{g EQ g}^{-1}$ peso fresco) em raízes e hipocótilo de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Conteúdo de flavonoides totais ($\mu\text{g EQg}^{-1}$ peso fresco)								
Tecido vegetal	Raiz				Hipocótilo			
Tratamento	1 dai	3 dai	6 dai	9 dai	1 dai	3 dai	6 dai	9 dai
Uirapuru não inoculado	10,84 \pm 5,17 ¹	7,46 \pm 4,67	5,54 \pm 2,71	4,99 \pm 2,99	26,66 \pm 4,60	30,31 \pm 3,82	37,02 \pm 7,63	40,63 \pm 7,56
UFSC-01 não inoculado	9,85 \pm 3,52	8,56 \pm 5,03	4,27 \pm 1,23	4,85 \pm 3,64	38,67 \pm 4,62	44,51 \pm 5,49	50,41 \pm 10,19	53,44 \pm 9,71
Uirapuru + <i>Fop</i>	9,12 \pm 5,76	6,72 \pm 5,56	6,43 \pm 2,84	3,67 \pm 1,94	26,78 \pm 5,05	28,30 \pm 3,81	38,28 \pm 8,85	41,84 \pm 12,95
UFSC-01 + <i>Fop</i>	8,35 \pm 3,72	7,19 \pm 4,37	4,73 \pm 0,95	2,81 \pm 1,81	33,01 \pm 7,81	41,50 \pm 3,65	44,15 \pm 5,65	46,06 \pm 8,55
Média geral	9,54 \pm 1,06	7,48 \pm 0,78	5,24 \pm 0,95	4,08 \pm 1,03	31,28 \pm 5,75	36,15 \pm 8,05	42,47 \pm 6,14	45,49 \pm 5,79

¹ Média \pm desvio padrão

10.7. Apêndice G

Conteúdo de faseolina (ABS g⁻¹ peso fresco) em raízes e hipocótilo de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01) 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Conteúdo de faseolina (ABS g ⁻¹ peso fresco)								
Tecido vegetal	Raiz				Hipocótilo			
Tratamento	1 dai	3 dai	6 dai	9 dai	1 dai	3 dai	6 dai	9 dai
Uirapuru não inoculado	2,54 ± 0,31 ¹	2,50 ± 0,42	2,17 ± 0,48	1,46 ± 0,24	2,17 ± 0,50	1,85 ± 0,26	1,55 ± 0,28	1,16 ± 0,19
UFSC-01 não inoculado	2,43 ± 0,26	2,07 ± 0,26	1,25 ± 0,41	1,13 ± 0,19	2,13 ± 0,38	1,71 ± 0,38	1,48 ± 0,07	1,20 ± 1,14
Uirapuru + <i>Fop</i>	2,68 ± 0,18	2,77 ± 0,48	2,10 ± 0,31	1,62 ± 0,55	2,46 ± 0,30	1,88 ± 0,23	1,57 ± 0,24	1,33 ± 0,24
UFSC-01 + <i>Fop</i>	2,65 ± 0,20	2,09 ± 0,13	1,33 ± 0,41	1,23 ± 0,12	2,08 ± 0,12	1,65 ± 0,44	1,49 ± 0,20	1,25 ± 0,19
Média geral	2,57 ± 0,11	2,36 ± 0,34	1,71 ± 0,49	1,36 ± 0,22	2,21 ± 0,17	1,77 ± 0,11	1,52 ± 0,05	1,24 ± 0,07

¹ Média ± desvio padrão