



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**ASPECTOS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS
DO FEIJÃO-CAUPI INFECTADO POR *Fusarium oxysporum* f.
sp. *tracheiphilum* e USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
COBRE NO MANEJO DA MURCHA DE FUSARIUM**

RISONEIDE DE CÁSSIA ZEFERINO SILVA

Recife-PE

2022

RISONEIDE DE CÁSSIA ZEFERINO SILVA

**ASPECTOS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS
DO FEIJÃO-CAUPI INFECTADO POR *Fusarium oxysporum* f.
sp. *tracheiphilum* e USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
COBRE NO MANEJO DA MURCHA DE FUSARIUM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof^o.Dr^o. Jonas Alberto Rios

Coorientador: Prof^o. Dr^o. Alessandro Nicole

RECIFE- PE

2022

**ASPECTOS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS
DO FEIJÃO-CAUPI INFECTADO POR *Fusarium oxysporum* f.
sp. *tracheiphilum* e USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
COBRE NO MANEJO DA MURCHA DE FUSARIUM**

RISONEIDE DE CÁSSIA ZEFERINO SILVA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 31/08/2022

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios

EXAMINADORES:

Dr. Antônio Félix da Costa

Dr. Sérgio Rogério Alves de Santana

Prof^ª. Dr^ª. Elineide Barbosa de Souza

Prof^ª. Dr^ª. Rosana Blawid

**RECIFE-PE
AGOSTO- 2022**

A Deus, por sua compaixão e amor.
À minha mãe Luzia Adelaide (In Memoriam), ao meu tio e pai Nivaldo da Hora por todo amor,
apoio, incentivo e cuidado que sempre teve por mim.
A Rezanio, meu esposo.
À Lorena, minha filha por todos os sorrisos e abraços apertado, nos momentos de cansaço e
angústia o teu amor me fez mais forte.
Porque família é tudo!
Dedico

Agradecimentos

A **Deus**, pela sua misericórdia, por me dar forças nos momentos mais difíceis e permitir a bênção da realização de mais um sonho.

Aos **meus tios e tias, Nivaldo da Hora, Vania mendes da Hora, Edeilson da Hora e Marileide Fonseca**, por estarem sempre presente na minha vida.

Ao meu esposo **Rezanio Martins carvalho**, por toda compreensão amor e cuidado.

A minha Filha **Lorena Zeferino** por todo amor, por ser nossa inspiração e razão de nunca desistirmos.

À Professora **Dr^a. Rosana Blawid**, pelo cuidado, por ser um ser de luz.

Ao Professor **Dr. Alessandro Nicoli** pelos valiosos ensinamentos e por toda ajuda.

Ao **Dr. Antônio Félix**, pelos esclarecimentos, ensinamentos e amizade.

Aos estagiários **Rodrigo Lobo, Keyla e Walter** por toda força por se fazerem presente quando mais precisei, vocês foram anjos na minha vida.

Ao meu orientador Professor Dr **Jonas Alberto Rios**, minha eterna gratidão, pela confiança pela paciência e pelos valorosos ensinamentos.

Ao professor **Edivan Rodrigues de Souza** e sua pós doutoranda Monalisa pela disponibilidade de apoio técnico e de equipamentos para análises fisiológicas.

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)**, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Doutorado e à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A **Roselane Alves, Larissa, e Lucas Correia**, pela preciosa amizade, conselhos e ajuda na condução dos trabalhos.

À Clínica Fitossanitária de Pernambuco (CLIFIPE) pela disponibilidade dos equipamentos para realização dos testes bioquímicos.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
GENERAL ABSTRACT	9
CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. cultura do feijão-caupi [<i>vigna unguiculata</i> (l.) walp.]	12
1.2. Murcha de Fusário em feijão-caupi	14
1.3. Estudos de herança da resistência	18
1.4. Estresse oxidativo	19
1.5. Uso da nanotecnologia na agricultura	21
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II - Herança da resistência do feijão-caupi à murcha de <i>Fusarium</i>	30
CAPÍTULO III- Aspectos Bioquímicos e Fisiológicos Do Feijão-Caupi Infectados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	52
CAPITULO IV - Efeito de nanopartículas de cobre e prata sobre a murcha de <i>Fusarium</i> em feijão-caupi.	85
CAPÍTULO V- CONCLUSÕES GERAIS	109

RESUMO GERAL

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa cultivada e consumida em todo o mundo, mas predominantemente em regiões tropicais. Dentre os diversos fatores bióticos que podem prejudicar a sua produção, a murcha causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (*Fot*) é considerada de grande importância. Esse fungo de solo penetra nas raízes causando vários sintomas na planta, como redução da altura, clorose, descoloração vascular, murcha e queda prematura das folhas. Assim, este estudo teve como objetivos: *i*) avaliar a herança da resistência da cultivar Miranda IPA 207 e BR-17 Gurguéia ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* visando sua utilização no desenvolvimento de novas variedades resistentes; *ii*) elucidar os possíveis mecanismos de defesa envolvidos na resistência ; *iii*) avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em cultivares de feijão-caupi com diferentes níveis de resistência à *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *iv*) verificar o potencial de uso de nanopartículas de prata e cobre no controle da murcha de fusarium.

Para estudar a herança dois genótipos parentais Miranda IPA 207 (resistente) e a cultivar BR-17 Gurguéia (suscetível) foram cruzados obtendo-se as populações F₁ e F₂. Posteriormente as gerações e os genitores foram inoculados com uma suspensão de conídios de *Fot* (10⁶ conídios/mL) pela metodologia de imersão de raízes em suspensão de conídios. A avaliação da intensidade da murcha de fusarium foi realizada 21 dias após a inoculação, com auxílio de uma escala descritiva. Conforme visualizado no teste do qui-quadrado na geração F₂ foi aceita a proporção 9:7 (resistente:suscetível), considerando a hipótese de que a herança genética da resistência a *Fot* é controlada por dois genes dominantes complementares. As atividades de SOD, CAT, POX e APX aumentaram nas folhas e raízes infectadas de plantas em comparação com os pares não inoculadas, sendo que a magnitude da atividade foi maior nas plantas resistentes. Para as raízes de plantas resistentes, a atividade da FAL foi significativamente maior em comparação às raízes de BR 17 Gurguéia. Para examinar a sensibilidade de *Fot* às crescentes doses de AgNPs e CuNPs, testes *in vitro* foram realizados para verificar o crescimento de *Fot* em placas de Petri com doses crescentes de ambas as NPs. Posteriormente, um experimento *in vivo* foi instalado em casa de vegetação, sendo utilizada a cultivar de feijão-caupi BR17 Gurguéia. Os tratamentos utilizados foram: controle inoculado, Acibenzolar-S-Metil (ASM), AgNPs (5 µL L⁻¹) e CuNPs (5 µL L⁻¹). Estes tratamentos foram aplicados pelos métodos de inundação e pulverização. Para

o teste *in vitro*, os ajustes de regressão linear para o índice de velocidade de crescimento micelial e o diâmetro micelial de *Fot* demonstraram uma redução destes parâmetros a medida que as doses de CuNPs e AgNPs aumentaram. A severidade da doença foi significativamente reduzida em 65% em plantas tratadas pelo método de inundação com CuNPs. Para o método de pulverização, houve uma redução significativa para a severidade de 30, 28 e 72% para os tratamentos CuNPs, ASM e AgNPs, respectivamente.

Palavras-chaves: *Vigna unguiculata*, murcha de fusarium, herança genética, melhoramento de plantas, nanotecnologia.

GENERAL ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is a legume cultivated and consumed worldwide, but predominantly in tropical regions. Among the various biotic factors that can impair its production, the wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (*Fot*) and considered of great importance. This soil fungus penetrates the roots causing various plant symptoms such as reduced height, chlorosis, vascular discoloration, wilting and premature leaf drop. Thus, this study aimed to evaluate the physiological performance (chlorophyll (Chl) *a* fluorescence, vegetative vigor, water potential and the concentration of photosynthetic pigments), the activities of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD),) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in roots and leaves of susceptible plants (BR 17 Gurguéia) and resistant plants (Miranda IPA 207 and MNCO1-649F-2-1). The effect of preventive application of Copper and Silver Nanoparticles (NPs) on cowpea fusarium wilt and to determine the inheritance of cowpea resistance (named by the genotype Miranda IPA 207) to fusarium wilt. Wilt severity was significantly lower for resistant plants compared to susceptible plants. This result showed higher concentrations of chlorophyll (Chl) *a*, Chl *b* and carotenoids, in addition to a greater water potential in these plants. Additionally, due to its lower severity, the functionality of the photosynthetic apparatus was preserved in the leaves. SOD, CAT, POX and APX activities increased in the leaves and roots of infected plants compared to uninoculated pairs, with the magnitude of increase higher in resistant plants. For the roots of resistant plants, PAL activity was significantly higher compared to the BR 17 Gurguéia roots. To examine the sensitivity of *Fot* to increasing doses of AgNPs and CuNPs, *in vitro* tests were performed to verify the growth of *Fot* in Petri dishes with increasing doses of both NPs. Subsequently, one in experiment was carried greenhouse conditions in a completely randomized design in experiment with five replications, being used cultivars BR17 Gurguéia plants. The treatments were: control treatment inoculated, Acibenzolar-S-Methyl (ASM), SiNPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$) and CoNPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$). These treatments were applied or by soil flooding in the region close to the plant or by spraying the leaves. Inoculation with *Fot* was performed 24 hours after application of treatments using a concentration of 1×10^6 conidia mL^{-1} . The mycelial growth index and mycelial diameter were lower with increasing doses of both NPs. Compared to control, the wilt disease was significantly reduced by 65% in plants treated by the soil

flooding method with CoNPs. For the spray method, there were a significant reduction for the severity of 30, 28 and 72% for the treatments CoNPs, ASM and SiNPs, respectively. To study inheritance, two parental genotypes Miranda IPA 207 (resistant) and the cultivar BR-17 Gurguéia (susceptible) were crossed, obtaining populations F1 and F2. Subsequently, the generations and parents were inoculated with a conidia suspension of *Fot* (10^6 conidia/mL) by the method of immersion in conidia roots. The evaluation of the intensity of fusarium wilt was performed 21 days after inoculation, with the aid of a descriptive scale. As visualized in the chi-square test in the F₂ generation accepted the 9:7 ratio (resistant: susceptible), considering the hypothesis that inheritance *Fot* resistance genetics is controlled by two complementary dominant genes.

Keywords: *Vigna unguiculata*, *Fusarium wilt*, genetic inheritance, plant breeding, nanotechnology.

CAPÍTULO I



INTRODUÇÃO GERAL

ASPECTOS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO FEIJÃO-CAUPI INFECTADOS POR *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE NO MANEJO DA MURCHA DE FUSARIUM

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. cultura do feijão-caupi [*vigna unguiculata* (L.) walp.]

O feijão-caupi é uma planta da família Fabaceae, gênero *Vigna* e espécie (*V. unguiculata* (L.) Walp), a qual é de origem africana. Foi introduzida no Brasil no século XVI, pelos colonizadores portugueses e passou a ser cultivada em todo o país (FREIRE FILHO, 1988). A cultura passou a ter destaque devido ao fato de ser uma leguminosa que tem ampla capacidade de adaptação, rusticidade, nutrição, sendo fonte de proteína e base alimentar para regiões como, África, Ásia e América do Sul. Apresenta grande importância para o desenvolvimento socioeconômico da região Nordeste do Brasil (ARAÚJO, 2019; BEZERRA *et al.*, 2014; BURRIDGE *et al.*, 2017; FREIRE FILHO; COSTA, 2020).

É uma planta herbácea, autógama, de ciclo anual, possui propagação sexuada, crescimento morfológico diversificado, podendo ter porte desde ereto até prostrado e hábito de crescimento normalmente indeterminado. (CHAUKE; KRITZINGER, 2020; FREIRE FILHO *et al.*, 2011a). As flores apresentam órgãos masculino e feminino apresentando mecanismos de cleistogâmia com coloração que pode variar de branca-lilás, branca com tons amarelo e branca, dependendo da variedade, possuem cinco pétalas, um estandarte, duas asas e uma quilha, formada por duas pétalas que protegem as partes sexuais (BARBOSA; SOUSA, 2016).

Por apresentar ampla distribuição entre os estados brasileiros possui uma série de nomes em nosso país como: feijão macassar; feijão-de-corda, na região Nordeste; feijão-de-praia, feijão-da-colônia, feijão-de-estrada e manteiguinha na região Norte; e feijão-miúdo na região Sul. Além desses há ainda o feijão-fradinho conhecido assim pelo seu tegumento branco com um grande halo preto nos estados de Sergipe, Bahia e Rio de Janeiro (FREIRE FILHO; CARDOSO; ARAÚJO, 1983; FREIRE FILHO *et al.*, 2011a).

Segundo a FAO (2021), o continente africano é o maior produtor mundial de feijão-caupi, seguido pela Ásia, América do Sul e Europa. O principal país produtor de

é a Nigéria, seguido pelo Níger e Burkina Faso com 49%, 24% e 8% da produção mundial respectivamente, que corresponde 81% da produção mundial de feijão-caupi seco.

O Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial de maior produção, na última safra 2021/2022, com uma área de 1.279,2 mil hectares (ha), uma produção estimada em 677,4 mil toneladas e com produtividade média de 535 kg/ha (CONAB, 2022).

O Nordeste é o maior produtor de feijão-caupi com cerca de 1.046,6 mil hectares plantados e uma produção média de 457,1 mil toneladas. Nessa região os maiores produtores, são os estados do Ceará (144,5 mil ton), Bahia (114,4 mil ton) e Piauí (83,5 mil ton) (CONAB, 2022). Além de grande produtor, o Nordeste também é considerado um dos maiores consumidores do caupi, tendo grande apreço ao produto na culinária local (SANTOS *et al.*, 2009). Nessa região predominam populações carentes, com baixa renda, que têm a cultura como principal forma de subsistência. (LIMA *et al.*, 2020).

No estado de Pernambuco, a área cultivada com feijão-caupi na safra 2021/2022 foi de 121,3 mil hectares e a produção foi de 34,4 mil toneladas (CONAB, 2022).

O feijão-caupi é cultivado nas regiões Norte e Nordeste, porém tem se expandido para outras regiões como Centro-Oeste tendo seu plantio incorporado no período de entressafra de outras culturas. (FREIRE FILHO, 2011a; SILVA; ROCHA; MENEZES JÚNIOR, 2016).

É uma cultura que tem um papel importante, gerando renda para pequenos agricultores familiares e amenizando o efeito da desnutrição, devido a seus componentes nutricionais (LINHARES *et al.*, 2014). Rico em proteína (23-25% em média), aminoácidos essenciais, carboidratos (62%), vitaminas e sais minerais, possui baixa quantidade de gordura e alta quantidade de fibras dietéticas (SALGADO *et al.*, 2008), além de possuir uma molécula BTCI (Black eyed-pea Trypsin Chymotripsin Inhibitor) que tem capacidade de danificar células cancerígenas humanas sem que haja danos as células saudáveis, o que torna ela importante também para saúde pública (SOUZA *et al.*, 2014).

No entanto, apesar da grande importância do feijão-caupi, a baixa produtividade dessa cultura principalmente no Nordeste é reflexo da atuação de uma série de fatores. Pode-se destacar, uso de sementes crioulas baixa disponibilidade de nutrientes no solo, ocorrência de precipitações pluviométricas irregulares a falta do emprego de tecnologias adequadas, como variedades melhoradas geneticamente, mecanização, e o surgimento de pragas e doenças (MENDES *et al.*, 2007; NODARI; GUERRA, 2015).

É uma planta comprovadamente tolerante a solos de baixa fertilidade e que se adapta bem a diferentes condições edafoclimáticas e é altamente rustica, mas apesar dessa rusticidade, diversas doenças vêm afetando a sua produção, chegando até a limitar seu cultivo (SILVA *et al.*, 2016). Dessa forma, a ocorrência de doenças na cultura, acarreta, muitas vezes, um aumento significativo no custo de produção, e ao mesmo tempo maior contaminação do meio ambiente causada pelo uso excessivo e indiscriminado de insumos agrícolas visando controlar os patógenos.

Nesse sentido várias doenças incidem sobre o feijão-caupi entre as principais destacam-se as viroses *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), os quais causam mosaicos (BARROS *et al.*, 2013); os nematoides-das-galhas como *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919), os quais possuem extensa disseminação em áreas de cultivo de feijão-caupi.

Os nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus* Filipjev 1936) e os nematoides-reniformes da espécie *Rotylenchulus reniformis* (Linford & Oliveira, 1940) (PONTE, 1988; SILVA, 2005). A mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*) Nayudu Dye e a pústula-bacteriana com maior importância no Estado do Piauí.

Cercosporioses (*Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deigtom); antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.); a mela (*Rhizoctonia solani* Kühn); e murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*) (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS 2005; NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006), ocorrendo com maior magnitude no sertão pernambucano, acarretando maiores impactos econômicos (COELHO, 2001; RODRIGUES; MENEZES, 2006).

Essa doença é considerada um dos grandes problemas fitossanitários para o feijão-caupi, pois quando ocorre com grande frequência e agressividade sobre a cultura, resulta em perdas significativas e evasão da atividade em áreas infestadas pelo patógeno (ASSUNÇÃO *et al.*, 2006).

1.2. Murcha de Fusário em feijão-caupi

O gênero *Fusarium* foi descrito no ano de 1808 por Link, pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Hypocreales e família Nectriaceae. A espécie *F. oxysporum*, apresenta uma ampla gama de hospedeiro e alguns possuem especificidade na interação com o hospedeiro. São fungos causadores de murcha

vascular, possuem mais de 120 diferentes formaes especiais dentre as quais destaca-se *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (LESLIE; SUMMERREL, 2006; MICHELSE; REP, 2009).

O agente etiológico da murcha de fusarium é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (*Fot*) e até o momento já foram descritas quatro raças fisiológicas, (EHLERS, 2001). As raças 1 e 2 descritas na Carolina do Sul, sendo a raça 1 restrita na Nigéria (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1950; RIGERT; FOSTER, 1987). A raça 3 é amplamente distribuída (HARE, 1957) e a raça 4 detectada na Califórnia (SMITH *et al.*, 1999). Embora a doença exista no Brasil ainda não se teve relato dessas raças. Além do feijão-caupi, já se tem relatos de *Fot* raça 1 causando doença em soja e crisântemo (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1965; HOLLIDAY, 1970), e em gérbera (TROIISI; GULLINO; GARIBALDI, 2010).

A caracterização morfológica que identifica a espécie *F. oxysporum* são micélio e conidióforos hialinos, que podem ser ramificados e terminados em tufos ou esporodóquios de fiálides, com produção de esporos nomeados, de macroconídios, microconídios e clamidósporos.

Os macroconídios são lançados em fiálides curtas, situados diretamente nas hifas ou ramos finais dos conidióforos, são fusiformes, arqueado com extremidade fina ou reto, com vários septados de três a cinco septos. Os microconídios são elípticos ou ovoides, geralmente mais numerosos que os macroconídios, eles não são septados ou têm exclusivamente um septo por microconídios. Os clamidósporos são hialinos, intercalares ou terminais (GORDON, 2017; LESLIE; SUMMERREL, 2006; METSENA *et al.*, 2021).

O fungo apresenta elevado grau de agressividade e tem a capacidade de sobrevive no solo por meio de estruturas de resistência do tipo clamidósporos mesmo na ausência da planta hospedeira e, na presença de um hospedeiro suscetível, multiplica-se rapidamente sobre os tecidos tenros do hospedeiro, tornando-se patogênico (SILVA, 2011).

O patógeno penetra através do sistema radicular, como também no hipocótilo e em tecidos radiculares mais velhos, geralmente por ferimentos ou aberturas naturais e coloniza o tecido vascular inter e intracelularmente, comprometendo os vasos do xilema. Por último ele move-se para outros tecidos e inicia o processo de esporulação na superfície da planta morta (SCHWARTZ; STEADMAN, 2015). Após a penetração do fungo pelo sistema radicular, quando em plântulas, os sintomas surgem nas folhas

jovens, assim como nas folhas desenvolvidas. A murcha de fusarium caracteriza-se em plântulas de caupi, pela presença de folhas flácidas e amareladas, seguida por rápida murcha e morte da planta. (SEETHAPATHY, 2017).

Plantas mais velhas são raquíticas, com folhas amarelas, que caem progressivamente, seguida por murcha gradual e necrose do tecido vascular (SEETHAPATHY, 2017). Os tecidos vasculares apresentam coloração castanho-escura, podendo ser observada ao realizar cortes longitudinais no caule (ATHAYDE SOBRINHO *et al.*, 2000; ASSUNÇÃO *et al.*, 2003b; PORTTORFF *et al.*, 2012). Nesta região pode-se ter uma maior precisão na mensuração da severidade da murcha-de-fusário do caupi que os sintomas foliares (NECHET; VIEIRA, 2006). Uma vez infectados a translocação de nutrientes é impedida, reduzindo assim a capacidade fotossintética e a produção (TAIZ; ZAIGER, 2017).

De todas as doenças que incidem a cultura, a murcha de fusário é uma das mais importantes, dadas as elevadas perdas econômicas que provoca quando a incidência na área é alta (NECHET; VIEIRA, 2006). Em regiões secas e com altas temperaturas a doença ocorre com maior frequência. (ALLEN, 1983). A infecção pode ocorrer em qualquer fase do ciclo da cultura, sendo os sintomas são mais severos em temperatura em torno de 27° C (SWANSON; VAN GUNDY, 1985).

Estudos realizados por Pinheiro *et al.* (2012) comprovam que a temperatura influenciou o crescimento micelial do fungo, determinado pelo diâmetro da colônia. O fungo teve crescimento ideal nas condições de temperaturas elevadas de 30° C, sendo que para a maioria das espécies de *Fusarium*, a temperatura ótima para a produção de esporos fica em torno de 25°C a 35°C (DESAI *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2010).

A doença pode reduzir em até 50 % a população de plantas, como relatado na Nigéria em um campo naturalmente infestado, conseqüentemente refletindo na queda produtiva (OYEKAN, 1977). Eloy e Michereff (2003), relataram que esta doença pode provocar perdas de até 75% na produtividade, tendo sido observada na Índia de 50% de perdas e no Brasil 86%, em campo infestado artificialmente pelo patógeno (ASSUNÇÃO *et al.*, 2006; ALLEN, 1983).

Fot é um fungo de solo e sobrevive em restos orgânicos ou através de estruturas de resistências (Clamidósporos) por muitos anos (AGRIOS, 2005) A disseminação do patógeno se dá principalmente por sementes infectadas, de um campo para outro, vento e água de irrigação contaminada (COELHO, 2001). Em novas áreas de cultivo a introdução do fungo é facilitada por meio de sementes infestadas, vento e água de

irrigação, que transportam conídios e solos infestados a partir de plantas mortas ou ainda por implementos agrícolas contaminados. (TOLEDO-SOUZA *et al.*, 2012).

Doenças causadas por patógenos habitantes do solo são de difícil manejo, em razão da baixa eficiência do controle químico e das constantes formas de adaptação destes fitopatógenos (CORREIA; MICHEREFF, 2018). É de extrema importância considera o manejo integrado de doenças, utilizando várias técnicas de cultivo como: escolha da área isenta do patógeno, definição adequada da época do plantio para se evitar o plantio sob condição de encharcamento, e rotação de cultura com espécies de plantas não hospedeiras (OLIVEIRA, 1981).

Entretanto, tendo em vista a capacidade do patógeno sobreviver no solo por muitos anos, e até o momento não existir nenhum fungicida regulamentados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2022), o controle mais eficaz para a murcha de fusário em feijão-caupi é o uso do controle genético por meio de cultivares resistentes (RODRIGUES; COELHO, 2004).

Na literatura alguns trabalhos foram desenvolvidos para identificação de genótipos resistentes, como os de Armstrong e Armstrong (1980), que observaram que as cultivares Magnólia, Iron PI 293520, Iron Tvu 1990, Iron Tvu 1072 e Iron Tvu 1611 apresentaram resistência às raças 1, 2 e 3. Rodrigues e Coelho (2004), utilizando 30 linhagens e cultivares verificaram que cerca de 50% destas apresentaram resistência ao fungo, destacando-se as linhagens L-288004 e L-190004 como altamente resistentes.

Noronha *et al.* (2013), avaliaram 36 genótipos e dois mostraram-se altamente resistente (MNC01-649F-2-1 e MNC01-649F-2-11), enquanto seis foram moderadamente resistentes. Silva *et al.* (2021), avaliaram 38 genótipos dos quais 14 apresentaram-se como resistentes entre eles MNCO1-649F-2-1 e Miranda IPA 207 e cinco como moderadamente resistentes.

Embora exista pesquisas para identificação de genótipos resistentes e essa alternativa seja a mais desejável o número de cultivares com características de interesse comercial regional é limitada (NORONHA *et al.*, 2013). Devido à falta de produtos fitossanitários e a redução de cultivares resistentes pesquisadores buscam alternativas de controle a esse patossistema.

Uma alternativa promissora é a indução de resistência, a qual ativa mecanismos de defesa em grande parte das espécies estudadas (OLIVEIRA *et al.*, 2016) Dentre os vários eliciadores o indutor Acibenzolar-S-methyl (ASM, BION), permite aumentar a

resistência sistêmica adquirida (RSA) das plantas reduzindo a doença em até 68,90 % (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Considerado um indutor de resistência comercial, é um análogo estrutural e funcional do ácido salicílico, capaz de induzir resistência nas plantas contra bactérias, fungos e nematoides (DIETRICH *et al.*, 2005). Pesquisas realizadas comprovam a ação do ASM para uma vasta gama de patógenos em patossistemas diferentes, *Hemileia vastatrix* em mudas de cafeeiro (GUZZO *et al.*, 2001; MARCHI *et al.*, 2002). *Colletotrichum destructivum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2019) e *Lycopersicon esculentum* em tomateiro (GURGEL *et al.*, 2005).

Uma alternativa é o uso de nanopartículas (NP) que representam a aplicação da nanotecnologia verde no manejo de fungos, tais como nanopartículas de prata e cobre. Diversos estudos comprovam a eficiência de NPs para diferentes patógenos. A exemplo de *B. sorokiniana* e *Magnaporthe grisea* (JO *et al.*, 2009); *Fusarium culmorum* (KASPROWICZ *et al.*, 2010); *Colletotrichum* spp. (LAMSAL *et al.*, 2011), *Botrytis cinerea* (KRISHNARAJ *et al.*, 2012) e *Phytophthora* spp. (ALI *et al.*, 2015).

1.3. Estudos de herança da resistência

O estudo de herança genética é estabelecido por uma série de estimativas que fornecem informações sobre a forma que características de interesse são herdadas, fornecendo subsídios para a escolha de metodologia mais adequadas no melhoramento. Em um programa de melhoramento o estudo de herança é a segunda etapa após a identificação de genótipos resistentes a doença. O estudo de herança tem fundamental importância para se realizar a recomendação do método mais adequado a ser utilizado no programa de melhoramento de espécie, visando a incorporação da resistência em genótipos comerciais que apresentam suscetibilidade a determinada doença (BORÉM; MIRANDA, 2009; BATISTA *et al.*, 2017; CAIXETA; ZAMBOLIM, 2014).

Primeiramente é comum verificar se as ações gênicas nucleares sofrem efeito citoplasmático, ou seja, se existe efeito materno no controle do caráter. Em seguida, realiza-se um estudo do controle genético do caráter para fins de identificar a natureza oligogênica ou poligênica do caráter e definir as contribuições e tipos de efeitos gênicos envolvidos na expressão dele.

O estudo de controle genético de caracteres em espécies autógamas é efetivado por meio da avaliação de populações obtidas de cruzamentos. É essencial que os genitores sejam homocigóticos, ou seja, não estejam sob segregação, e que sejam bastante divergentes quanto as características em estudo (BORÉM; MIRANDA, 2013; RAMALHO *et al.*, 2012). As populações obtidas para este intuito são as gerações F₁, F₂ e retrocruzamentos RC1 e RC2, além de genitores e híbridos, as gerações segregantes são avaliadas em condições experimentais para a verificação da segregação fenotípica (RAMALHO *et al.*, 2012)

Para testar as proporções fenotípicas nessas gerações segregantes, a metodologia comumente utilizada é o teste não paramétrico do qui-quadrado (X^2). Essa metodologia baseia-se nas frequências observadas e nas frequências esperadas para gerar um valor calculado e esse valor é comparado com outro valor já tabelado. A hipótese (H₀) é aceita quando o valor calculado for menor que o valor tabelado, ao contrário, rejeita-se a hipótese testada, o que significa que os desvios das frequências observadas em relação às frequências esperadas não foram devido ao acaso (H₁) (VIANA *et al.*, 2012)

Silva *et al.* (2021) ao avaliarem a herança da resistência à murcha de fusarium causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em cruzamentos e retrocruzamentos entre MNCO1-649F-2-1 (resistente) e Gurgueia (suscetível), empregando o teste do qui-quadrado (X^2), observaram na geração F₂ uma proporção 3:1 (três planta resistente para uma planta suscetível), indicando que a herança que controla a resistência é do tipo monogênica dominante. No mesmo patossistema com outros parentais, Rigert e Foster (1987), relatam resistência monogênica dominante identificada em relação às raças 1, 2 e 3 de *Fot* com a segregação de dois genes dominantes para resistência às raças 2 e 3 (HARE, 1953), ou ainda com dois genes de resistência independentes, sendo um deles com efeito epistático dominante (13 R: 3 S), como relatado por (RODRIGUES e COELHO, 2004).

Lucky *et al.* (2018) investigando a herança da resistência em linhagens de feijão-caupi, encontraram um padrão de segregação que se encaixa na proporção 3:1, indicando que a resistência é conferida por um único gene de dominante.

1.4. Estresse oxidativo

O ataque de patógenos, incluindo os fungos, induz a planta a defender-se inicialmente através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em

estresse oxidativo em plantas (AYBEKE, 2017), e ativando o sistema de defesa antioxidante a exemplo de enzimas SOD, CAT, POX e APX (KANG et al., 2014).

Em plantas expostas ao estresse abiótico e biótico é comum a produção de EROs, o patógeno ao romper a célula vegetal faz com que cátions e ânions sejam liberados no meio, quando os ânions entram em contato com oxigênio ocorre a formação de superóxido (O_2^-), que se transformam em radical hidroxila (OH), pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GILL; TUTEJA, 2010).

O excesso de radicais livres gerados durante a infecção por patógenos é nocivo as plantas, no entanto, para se proteger contra esses tóxicos, as células das plantas e suas organelas empregam um sistema de defesa antioxidante. Entre estes mecanismos antioxidantes destacam-se as enzimas peroxidases (POX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (DAVAR *et al.*, 2013; UARROTA *et al.*, 2014). A primeira enzima envolvida no sistema de defesa da planta é a SOD a qual pode ser formada tanto a nível de membrana, cloroplasto e mitocôndria, ela converte o radical superóxido O_2^- em peróxido de hidrogênio H_2O_2 . (GILL; TUTEJA, 2010).

Após a conversão a POX atua convertendo o peróxido de hidrogênio em água, bem como a APX e a CAT.

Plantas de trigo infectadas por *Bipolaris sorokiniana* apresentaram acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam estresse oxidativo, e aumentaram as atividades de enzimas antioxidantes (RIOS *et al.*, 2017).

Essas EROs devem ser efetivamente eliminadas, para evitar danos oxidativos às células vegetais, levando à peroxidação lipídica e à destruição de macromoléculas como lipídios, ácidos nucleicos, pigmentos e proteínas (APEL *et al.*, 2004). Aliado ao seu efeito fungicida, as folhas de trigo pulverizadas com azoxistrobina apresentaram maiores atividades de SOD, POX e CAT, que foram associadas à menor concentração de EROS, retardando a senescência foliar e prolongando a duração da fotossíntese (WU; VON-TIEDEMANN, 2001; ZHANG *et al.*, 2010).

Ataques de patógenos resultam em redução da fotossíntese nas folhas (BASSANEZI *et al.*, 2002; BASTIAANS, 1993), e como consequência perda de produtividade (BASSANEZI *et al.*, 2002). Estudos recentes usando fluorescência de Chla permitiu compreender as mudanças no potencial fotossintético em plantas infectas por patógenos (BAKER *et al.* 2001; ROLFE *et al.*, 2010).

1.5. Uso da nanotecnologia na agricultura

Em 1959, o físico norte americano Richard Feynman foi o primeiro cientista a descrever a possibilidade de manipular a matéria em escala manométrica e desenhou a ideia de construir objetos *bottom-up*. Feynman, criando o conceito de nanotecnologia na comunidade científica. (DE MORAIS *et al.*, 2014)

Nanotecnologia é definida como a ciência e a engenharia envolvidas na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos cuja menor organização funcional em pelo menos uma dimensão está na escala nanométrica (10^{-9} m = 1nm) (CLARK; PAZDERNIK, 2016; FERREIRA; RANGEL, 2009).

As nanopartículas podem ser sintetizadas por vários métodos, de início elas eram produzidas por métodos físicos e químicos. Atualmente elas podem ser sintetizadas por meio biológico, também conhecida como micosíntese, método este que tem sido o mais intensificado e é baseado na formulação de nano sistemas metálicos por meio da redução de um metal utilizando-se organismos biológicos ou parte deles (IRAVANI, 2011; JEYARAJ *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

Dentre os organismos biológicos utilizados para produzir nanopartículas pode-se citar bactérias do gênero *Bacillus* sp. (SUNKAR; NACHIYAR, 2012) e *Pseudomonas* sp. (BAKER *et al.*, 2015), diversas espécies de *Fusarium* spp. como, *Trichoderma* sp. e *Alternaria* sp. (BALAKUMARAN *et al.*, 2015; HALKAI *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017) e dentro da biossíntese verde as proteínas oriundas de fungos e plantas são as mais utilizadas (RAI, 2012).

Na fitopatologia a aplicação da nanopartícula comparada a outras áreas é um tanto quanto recente. Dessa forma várias oportunidades podem ser exploradas, como o desenvolvimento de produtos com características bactericidas, fungicidas, nematicidas e viricidas e o desenvolvimento de sensores sensíveis e seletivos. Estudos tem confirmado a eficiência de NPs de metais contra patógenos de plantas, insetos e pragas. (CHOUDHURY *et al.*, 2010; RAI; INGLE, 2012).

Nos últimos anos, produtos de nanofertilizantes ou nanopesticidas contendo nanomateriais foram desenvolvidos em práticas agrícolas, e comercializados para uso de forma controlada (FURLANETO, 2011). De modo recente, materiais biológicos como microrganismos, extratos de plantas, organismos marinhos e microfluidos têm sido usados para sintetizar nanopartículas (principalmente as metálicas) (BANERJEE *et al.*, 2014; ROBERTO *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2018) porém as produzidas por

bioextratos de plantas são mais estáveis, econômicas e ecológicas quando comparadas com outros organismos (BEGUM *et al.*,2018).

O objetivo do trabalho foi *i)* avaliar a herança da resistência da cultivar Miranda IPA 207 e BR-17 Gurguéia ao *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* visando sua utilização no desenvolvimento de novas variedades resistentes; *ii)* elucidar os possíveis mecanismos de defesa envolvidos na resistência ; *iii)* avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em cultivares de feijão-caupi com diferentes níveis de resistência à *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *iv)* verificar o potencial de uso de nanopartículas de prata e cobre no controle da murcha de fusarium.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5. ed. Oxford, UK: Academic Press Publications, 2005.
- ALI, G. S.; EL SAYED, A. S.; PATEL, J. S.; GREEN, K. B.; ALI, M.; BRENNAN, M.; NORMAN, D. Ex vivo application of secreted metabolites produced by soil-inhabiting *Bacillus* spp: efficiently controls foliar diseases caused by *Alternaria* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 2, p. 478-490, 2015.
- ALLEN, D. J. **The pathology of tropical food legumes: disease resistance in crop improvement**. New York: John Wiley Sons, 1983. 413 p.
- APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55 p. 373-399, 2004.
- ARAÚJO, L. B. R.; PINHEIRO, M. S.; FIEGE, L. B. C.; BERTINI, C. H. C. M.; DOVALE, J. C. Agronomic potential and genetic diversity of landraces of cowpea of the state of Ceará. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, p. 698-708, 2019.
- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Cowpea wilt *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race I from Nigeria. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 954–955, 1980.
- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Biological races of *Fusarium* causing wilt of cowpea and soybeans. **Phytopathology**, Lancaster, v. 40, n. 2, p. 181-193, 1950.
- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Wilt of chrysanthemum caused by Race 1 of the cowpea *Fusarium*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 49, n. 7, p. 673–676, 1965.
- ASSUNÇÃO, I. P.; MICHEREFF, S. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BROMMONSCHENKEL, S. H. Influência da intensidade da murcha de fusário no rendimento do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 615–619, 2003b.
- ASSUNÇÃO, I. P.; MICHEREFF, S. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BROMMONSCHENKEL, S. H. Influence of *Fusarium* wilt intensity on cowpea yield. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 615–619, 2006.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; ARAUJO LIMA, J. A.; RIBEIRO, V. Q (Ed.). **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2005. p. 461-484.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças do feijão-caupi. In: CARDOSO, M. J (2000) (Org.) **A Cultura do Feijão-caupi no Meio-Norte do Brasil**, Embrapa Meio-Norte 28 Circular Técnica (Embrapa Meio-Norte) Teresina pp. 157-183.
- AYBEKE, M. *Fusarium* infection causes genotoxic disorders and antioxidant-based damages in Orobanche spp. **Microbiological Research**, v. 201, p. 46–51, 2017.
- BAKER, N. R.; OXBOROUGH, K.; LAWSON, T.; MORISON, J. I. High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cell and chloroplast in leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 615-621, 2001.
- BAKER, S.; KUMAR, K. M.; SANTOSH, P.; RAKSHITH, D.; SATISH, S. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by novel *Pseudomonas veronii* AS41G inhabiting *Annona squamosa* L. and their bactericidal activity. **Spectrochim Acta a Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.136, p.1434–1440, 2015.
- BALAKUMARAN, M. D.; RAMACHANDRAN, R.; KALAICHELVAN, P. T. Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their *in vitro* biological activities. **Microbiological Research**, v. 178, p. 09-17, 2015.
- BANERJEE, P.; SATAPATHY, M.; MUKHOPAHAYAY, A.; DAS, P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: Synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. **Bioresour. Bioprocess**, v. 1, p. 3-10, 2014.
- BARBOSA, M. V; SOUSA, E. M.L. Biologia floral, ecologia da polinização e eficiência na produção de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. em sistemas agrícolas. **Gaia Scientia**, v. 10, p. 272-283, 2016.

- BARROS, G. B.; NOGUEIRA, M. S. R.; OLIVEIRA, C. R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; VEIGA, C. F. M.; BRIOSSO, P. S. T.; EIRAS, M. Obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao Cowpea severe mosaic virus e ao Cowpea aphid-borne mosaic virus. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 39, p. 130-136, 2013.
- BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; BERGERV, R. D. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. **Journal Phytopathol**, v. 150, p. 37-47, 2002.
- Bastiaans, L.; Kropff, M. J. Effects of leaf blast on photosynthesis of rice. 2. Canopy photosynthesis Netherlands **Journal of Plant Pathology**, v. 99, p. 205-217 1993
- BATISTA, R. O.; SILVA, L. C.; MOURA, L. M.; SOUZA, M. H, CARNEIRO, P.C.S.; CARVALHO-FILHO, J.L.S.; CARNEIRO, J.E.S Inheritance of resistance to fusarium wilt in common bean. **Euphytica**, Wageningen, p. 213:133, 2017.
- BEGUM, A. S.; KUMAR, S. S.; GOTTAPU, S.; HIRA, K.; O-Glucoside of natural cleomiscosin-A: An attenuator of pro-inflammatory cytokine production; **Phytochemistry Letter**, v. 26, p.83-87, 2018.
- BEZERRA, M. A. F.; OLIVEIRA, F. A. de; BEZERRA, F. T. C.; PEREIRA, W. E.; DA SILVA, S. A. Cultivo de feijão-caupi em Latossolos sob o efeito residual da adubação fosfatada. *Revista Caatinga*, v. 27, n. 1, p. 109-115, 2014.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5.ed. Viçosa: UFV, 2009.
- BORÉM, A.E.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 6 ed. Viçosa: UFV, 2013. 523p.
- BURRIDGE, J. D.; SCHNEIDER, H. M.; HUYNH, B. L.; ROBERTS, P. A.; BUCKSCH, A.; LYNCH, J. P. Genome-wide association mapping and agronomic impact of cowpea root architecture. **Theoretical and applied genetics**, v. 130, p. 419-431, 2017.
- CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M. Melhoramento genético de plantas visando resistência a doenças. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS-JÚNIOR, W.C.; RODRIGUES, F.A (Eds.). **O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2014. p. 553-576.
- CHAUKE, S. H.; KRITZINGER, Q. *Vigna unguiculata*. In: LALL, N. (ed.). **Under explored medicinal plants from Sub-Saharan Africa**. Cambridge: Academic Press, 2020. p. 287-293.
- CHOUDHURY, S. R.; NAIR, K. K.; KUMAR, R.; GOGOI, R.; SRIVASTAVA, C.; GOPAL, M.; SUBHRAMANYAM, B. S.; DEVAKUMAR, C.; GOSWAMI, A. Nanosulfur: a potent fungicide against food pathogen, *Aspergillus niger*. **AIP Conference Proceedings**, 2010. p. 154-157
- CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. **Nanobiotechnology**. *Biotechnology*, p. 219–248, 2016.
- COELHO, R. S. B. Doenças fúngicas do caupi. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001, Teresina. **Anais...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p. 321–322.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/22, n. 10 décimo levantamento, Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 30 de julho de 2022.
- CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. In: Lopes, U. P.; Michereff, S. J. (Org.). *Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos*. 1ed. Recife: EDUFRPE, v. 1, p. 1-16. 2018.
- DAVAR, R.; DARVISHZADEH, R.; MAJD, A. Changes in antioxidant systems in wheat plants. **Ecotoxicol. Environ**, v. 89, p.150–157, 2013.
- DE MORAIS, M. G.; MARTINS, V. G.; STEFFENS, D.; PRANKE, P.; DA COSTA, J. A. V. Biological applications of nanobiotechnology. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, p. 1007–17, 2014.

- DESAI, A.G.; DANGE S. R. S.; PATEL, D. S.; PATEL, D. B. Variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini* causing wilt of castor. **Journal Mycology Plant Pathology**, Udaipur, v. 33, p. 37–41, 2003.
- DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Growth responses and fitness cost after induction of pathogen resistance depend on environmental condition. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, p. 211-222, 2005.
- EHLERS, J. Production and genetic improvement of dry grain cowpea in the USA. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, n. 5, 2001, Teresina. **Anais ...Teresina: Embrapa Meio-Norte**, 2001. p. 334-338. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 56).
- ELOY, A. P.; MICHEREFF, S. J. Redução no rendimento do caupi em duas épocas de plantio devido à murcha-de-fusário. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 4, p. 330–333, 2003.
- FAO- Fao-Food and Agriculture Organization. Faostat. Crops. Cow peas, dry. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 28 abr. 2021
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1860-1870, 2009.
- FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. de. Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.18, n. 12, p. 1369-1372, 1983.
- FREIRE FILHO, F. R.; COSTA A. F. Feijão-caupi: classificação botânica e Importância. **Cadernos do Semiárido- riquezas e oportunidades**, Recife: Editora UFRPE, 2020. p.17-20.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.
- FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Revista Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, 2011.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stresstolerance in crop plants. **Plant Physiol Biochem.**, v. 48, n. 12, p. 909-30, 2010.
- GORDON, R. T. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 23-39, 2017
- GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; GAUR, R. K. Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* l. in Índia. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 50, n. 4, p. 452-462, 2010.
- GURGEL, L.M.S., OLIVEIRA, S.M.A., COÊLHO, R.S.B. & SILVA, R.L.X. Proteção à murcha de fusário do tomateiro com acibenzolar-S-metil e ácido â-aminobutírico. **Fitopatologia Brasileira** v. 30, p. 655-657, 2005.
- GUZZO, S. D.; DE CASTRO, R. M.; KIDA, K.; MARTINS, E. M. F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, p. 89-94. 2001.
- HALKAI, K. R.; MUDDA, J. A.; SHIVANNA, V.; RATHOD, V.; HALKAI, R. S. Biosynthesis, characterization and antibacterial efficacy of silver nanoparticles derived from endophytic fungi against *P. gingivalis*. **Journal of Clinical Diagnostic Research**, v.11, p.92, 2017.
- HARE, W. W. A new race of *Fusarium* causing wilt of cowpea. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 47, n. 3, p. 457-465, 1957.
- HARE WW. A new race of *Fusarium* causing wilt of cowpea. **Phytopathology**, v.4, p, 291. 1953.
- HOLLIDAY, P. *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Kew. **Commonwealth Mycological Institute**. 1970.(C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 220).
- IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, p. 2638-2650, 2011.
- JEYARAJ, M.; SATHISHKUMAR, G.; SIVANANDHAN, G.; MUBARAKALI, D.; RAJESH, M.; ARUN, R.; KAPILDEV, G.; MANICKAVASAGAM, M.; THAJUDDIN, N.; PREMKUMAR, K.; GANAPATHI, A.

- Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 1, p.86–92, 2013.
- JO, Y. K.; KIM, B. H.; JUNG, G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. **Plant Disease**, v. 10, p. 1037-1043, 2009.
- KANG, G.; LI, G.; GUO, T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stresstolerance in higher plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p. 2287–2297, 2014.
- KASPROWICZ, M. J.; KOZIOL, M.; GORCZYCA, A. O efeito das nanopartículas de prata sobre os esporos fitopatogênicos de *Fusarium culmorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 247-253, 2010.
- KRISHNARAJ, C.; JAGAN, E. G.; RAMACHANDRAN, R.; ABIRAMI, S. M.; MOHAN, N.; KALAICHELVAN, P. T. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 651-658, 2012.
- LAMSAL, K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim YS, Lee YS. Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species *in vitro* and pepper anthracnose disease in field. **Mycobiology**, v. 3, p. 194-199, 2011.
- LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, n. 5, p. 199-208, 2001
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p.
- LIMA, L. P. de A.; GAIO, D. C.; ROSA, L. L. da; ANJOS, M. R. dos; DE MUSIS, C. R.; SANCHES, L.; NOGUEIRA, J. S. Lisímetros de pesagem de pequeno porte na investigação de transpiração de plantas de feijão. **Nativa**, v. 8, n. 2, p. 192-197, 2020.
- LINHARES, C. M. S.; DE FREITAS, F. C. L.; SILVA, K. S.; DE LIMA, M.; DOMBROSKI, J. L. D. Crescimento do feijão-caupi sob efeito dos herbicidas fomesa-fen e bentazon+imazamox. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 1, p. 41 – 49, 2014.
- LUCKY O. O.; DANMAIGONA, C. C. KAMARA, A. Y.; EKEFAN, E. J.; TIMKO, M. P. Genetic analysis of Fusarium wilt resistance in cowpea (*Vigna unguiculata*Walp.). **Plant Breeding**, v. 137, P. 773–781, 2018.
- MARCHI, C.E., BORGES, M.F.& RESENDE, M.L.V. Proteção induzida por benzotriazolone contra a ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 1103-1106, 2002.
- MENDES, R. M. S.; TÁVORA, F. J. A. F.; PINHO, J. L. N.; PITOMBEIRA, J. B. Relações fonte-dreno em feijão-de-corda submetido à deficiência hídrica. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.38, p.95-103, 2007.
- METSENA, P; SOBDA, G; PHILIPPE, K; FANKOU D. M. Y; LAZARE, N. Identification of *Fusarium oxysporum* sf *tracheiphilum* strains responsible of cowpea wilt in Far-north region of Cameroon. **Journal of Applied Biosciences**, v. 164, 2021. <https://doi.org/10.35759/JABs.164.7>
- MICHIELSE, C.B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Mol Plant Pathol**. V.10(3), p.311–24.2009.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Brasília; MAPA, 2022. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons . Acesso em: 20 julho 2022.
- NECHET, K. L.; HALFED-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 505-508, 2006.
- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. A agroecologia: estratégias de pesquisa e valores. **Estud. av.** [online], v. 29, p. 183-207, 2015.DOI 10.1590/s0103-40142015000100010
- NORONHA, M. A.; LOPES, C. L. R. B. P. ; OLIVEIRA, B. M. M. ; VENTURA, H. P. ; TORRES, R. J. A. ; MICHEREFF, S. J. ; SILVA, K. J. D. E. . Reação de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp.

tracheiphilum, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. In: III Congresso Nacional de Feijão-caupi, 2013, Recife. **Anais do III Congresso Nacional de Feijão-caupi**, 2013.

OLIVEIRA, M. Z. A. **Fungos associados a sementes de caupi: Identificação, patogenicidade e controle**. 1981. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 1981.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 152-158, 2016.

OYEKAN, P. O Occurrence of cowpea wilt cause dby *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* in Nigéria. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 59, n. 6, p. 488- 490, 1977.

PONTE, J. J. Nematoides do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Org.). O caupi no Brasil. Brasília: IITA/Embrapa, 1988, p. 591-601.

POTTORFF, M.; WANAMAKER, S.; MA, Y. Q.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A.; CLOSE, T. J. Genetic and Physical Mapping of Candidate Genes for Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 3 in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **PLoS ONE**.v.7, n.7. 2012.

PINHEIRO, G. S.; BARBOSA, L. G.; ANGELOTTI, F.; MAGALHÃES, E. E. de; FERNANDES, H. A.; ZUCAL, M. P. M. Impacto de alterações de temperatura no crescimento e esporulação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. WORKSHOP SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICA E PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS, Jaguariúna, **Anais...** São Paulo, 2012. 5p. (Embrapa meio ambiente.).

RAI, M.; INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 287–293, 2012.

RAMALHO APR, ABREU AFB, SANTOS JB AND NUNES JAR. **Aplicações de genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**, Editora UFLA, Lavras-MG, 2012. 522p.

RIGERT, R. S.; FOSTER, K. W. Inheritance of resistance to two races of *Fusarium* wilt in three cowpea cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 2, p. 220-224, 1987.

RIOS, J. A.; AUCIQUE-PEREZ, C. E.; DEBONA, D.; NETO, C. L. B. M.; RIOS, V. S.; RODRIGUES, F. A. Changes in leaf gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence and antioxidant metabolism within wheat leaves infected by *Bipolaris sorokiniana*. **Ann Appl Biol**, v. 170, p. 189-203, 2017.

ROBERTO, S.R.; YOUSSEF, K.; HASHIM, A.F.; IPPOLITO, A. Nanomaterials as Alternative Control Means Against Postharvest Diseases in Fruit Crops. **Nanomaterials**, v. 9, p. 1752 2019.

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

RODRIGUES, A. C.; MENEZES, M. Identificação e caracterização patogênica de espécies endofíticas de *Fusarium* de sementes de caupi. **Anais...** Recife: Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, 2006. p. 203–215.

ROLFE, S. A.; SCHOLE, J. D. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. **Protoplasma**, v. 247, p. 163-175, 2010.

RODRIGUES, A. A.; COELHO, R. S. B. Murcha de fusário do caupi: métodos de inoculação, reação de germoplasma e controle genético da resistência. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, p.23-30, 2004.

SANTOS, J. F.; GRANGEIRO, J. I. T.; BRITO, C. H.; SANTOS, M. C. C. A. Produção e componentes produtivos de variedades de feijão-caupi na microrregião Cariri Paraibano. **Engenharia Ambiental**, São Paulo, v. 6, n.1, p.214-222, 2009.

SALGADO, S. M.; OLIVEIRA, A. V. S; Guerra N. B. Aspectos alimentares. In: Brito ES (Ed.) **Feijão-caupi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. p.25-38.

- SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 68, p. 383-388, 2015.
- SEETHAPATHY, P.; KURUSAMY, R.; KUPPUSAMY, P. Soil borne diseases of major pulses and their biological management. **Innovative Farming**, v. 2, p. 1-11, 2017.
- SILVA RCZ, SILVA AC, CARVALHO RM, COSTA AF, NICOLI A, RIOS JÁ. Identification of cowpea genotypes resistant to fusarium wilt. **Revista Caatinga**, v. 34, p. 957-964, 2021
- SILVA, G. C.; MAGALHÃES, R. C.; SOBREIRA, A. C., SCHMITZ, R.; SILVA, L. C. Rendimento de grãos secos e componentes de produção de genótipos de feijão-caupi em cultivo irrigado e de sequeiro. **Revista Agro ambiente** (On-line), v. 10, p. 342-350, 2016.
- SILVA, G. S. Nematoides. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (ed.). **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 487-497.
- SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; MENEZES JÚNIOR, J. A. N. **Socioeconomia**. In: BASTOS, E. A. (Coord.). **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2016. p. 6-12.
- SILVA, L. P.; REIS, I. G.; BONATTO, C. C. Green Synthesis of Metal Nanoparticles by Plants: Current Trends and Challenges. In: Basiuk, V.A.; Basiuk, E.V. (Org.). **Green processes for Nanotechnology**, Springer International Publishing, 1. ed., v. 1, p. 259-275, 2015.
- SILVA, W. C. **Influência de sucessão de cultivos na severidade da murcha-de fusário do caupi**. 2011. Dissertação de Mestrado (Mestrado em produção vegetal e proteção de plantas) Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, Alagoas, 2011.
- SINGH, J.; DUTTA, T.; KIM, K.-H.; RAWAT, M.; SAMDDAR, P.; KUMAR, P. Green synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. **Journal Nanobiotechnol**, 2018, 16, 84 DOI 10.1186/s12951-018-0408-4
- SINGH, T.; JYOTI, K.; PATNAIK, A.; SINGH, A.; CHAUHAN, R.; CHANDEL, S. Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles using an endophytic fungal supernatant of *Raphanus sativus*. **Journal of Genetics Engineering Biotechnology**, v.15, n.1, p.31–3, 2017.
- SIQUEIRA, I.T.D.; CRUZ, L.R.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MEDEIROS, E.V.; MOREIRA, K.A. Indução de resistência por acibenzolar-S-metil em feijão-caupino controle da antracnose. **Summa Phytopathologica**, v.45, p.76-82, 2019.
- SMITH, S. N.; HELMS, D. M.; TEMPLE, S. R. The distribution of Fusarium wilt of blackeyed cowpeas within California caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 4. **Plant Disease**, Sait Paul, v. 83, n. 7, p. 694, 1999.
- SUNKAR, S.; NACHIYAR, C. V. Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, p.953–959, 2012.
- SWANSON, T. A.; VAN GUNDY, S. D. Influences of temperature and plant age on differentiation of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* on cowpea. **Plant Disease**, Sait Paul, v. 69, n. 7, p. 779-781, 1985.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed. 2017. 954 p.
- TOLEDO-SOUZA, E. D.; SILVEIRA, P. M.; CAFÉ-FILHO, A. C.; LOBO JÚNIOR, M. Fusarium wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1031-1037, 2012.
- TROISI, M.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. *Gerbera jamesonii*, a new host of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 1, p. 8–14, 2010.
- UARROTA, V. G.; MORESCO, R.; COELHO, B.; NUNES, E. C.; PERUCH LAM, E. O.; ROCHA, M.; MARASCHIN, M. Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for

screening cassava (*Manihot esculenta Crantz*) roots during postharvest physiological deterioration. **Food Chemistry**, v. 161, p. 67–78, 2014.

VIANA JMS, CRUZ CD e BARROS EG **Genética Vol 2 – Fundamentos**. Editora UFV, Viçosa, 2012, 326p.

WU, Y. X.; VON TIEDEMANN, A. Physiologiical effects of azoxystrobina and epoxiconazole on senescence and the oxidative status of wheat. **Pesticid Biochemical Physiology**, v. 71, p. 11-10, 2001.

ZHANG, Y. J.; ZHANG, X.; CHEN, C. J.; ZHOU, M. G.; WANG, H. C. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 151–157, 2010.

CAPÍTULO II



Herança da resistência do feijão-caupi à murcha de Fusarium

1 **Herança da resistência do feijão-caupi à murcha de fusarium**

2

3 **Risoneide de Cássia Zeferino Silva¹, Keyla Walescka Lopes da Silva¹, Alessandro Nicoli**
4 **², Walter Wagner do Nascimento Carneiro, Sérgio Rogério Alves de Santana⁴, Jonas**
5 **Alberto Rios*^{1,3}**

6

7 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Fitopatologia.

8 ² Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, *Campus Unai-MG*.

9 ³ Universidade Federal de Viçosa, *Campus Florestal, Florestal-MG*.

10 * Autor para correspondência:

11

1 RESUMO

2 A murcha de fusarium, causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (*Fot*), é
3 relatada em muitas regiões produtoras provocando perdas na produção e produtividade no
4 Brasil e no mundo. O uso de cultivares resistentes é o método mais eficiente de controlar esta
5 doença. Para desenvolver novas cultivares é imprescindível que se realize o estudo da herança
6 da resistência, a fim de se obter informações necessárias para o correto planejamento e execução
7 do programa de melhoramento genético. O objetivo com esta pesquisa foi avaliar a herança da
8 resistência do feijão-caupi Miranda IPA 207 e BR-17 Gurguéia ao *Fot* visando sua utilização
9 no desenvolvimento de novas variedades resistentes. O experimento foi realizado em casa de
10 vegetação, sendo analisados os genitores Miranda IPA 207 (resistente) e BR-17 Gurguéia
11 (suscetível) e as gerações F₁ e F₂ os quais foram semeados e as plantas inoculadas e avaliadas
12 quanto à resistência de *Fot*. No parental resistente 93,55% das plantas não apresentaram
13 sintomas da doença enquanto 6,45% de plantas apresentaram sintomas leves (notas 3,0). No
14 entanto, todas as plantas do parental BR-17 Gurguéia foram suscetíveis com 100% das plantas
15 com notas 3,0, 4,0 e mortas. Na geração F₂, 57,7% das plantas foram resistentes e 42,3%
16 suscetíveis. Estes resultados foram analisados pelo teste do qui -quadrado e sugerem que a
17 herança da resistência a *Fot*, é controlada por dois genes com efeito epistático recessivo duplo.

18

19 **Palavras-chaves:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Vigna unguiculata*,
20 Melhoramento Genético.

1 **ABSTRACT**

2 Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum f.sp. tracheiphilum* (Fot), is reported in many
3 producing regions causing losses in production and productivity in Brazil and in the world. The
4 use of resistant cultivars is the most efficient method of controlling this disease. In order to
5 develop new cultivars, it is essential to carry out the study of the inheritance of resistance, in
6 order to obtain the necessary information for the correct planning and execution of the genetic
7 improvement program. The objective of this research was to evaluate the inheritance of
8 resistance of the cowpea Miranda IPA 207 and BR-17 Gurguéia to Fot, aiming its use in the
9 development of new resistant varieties. The experiment was carried out in a greenhouse, being
10 analyzed the parents Miranda IPA 207 (resistant) and BR-17 Gurguéia (susceptible) and the
11 generations F1 and F2 which were sown and the plants inoculated and evaluated for the
12 resistance of Fot. In the resistant parent, 93.55% of the plants showed no symptoms of the
13 disease while 6.45% of the plants showed mild symptoms (grades 3.0). However, all plants of
14 the parental BR-17 Gurguéia were susceptible with 100% of the plants with scores 3.0, 4.0 and
15 dead. In the F2 generation, 57.7% of the plants were resistant and 42.3% were susceptible.
16 These results were analyzed by the chi-square test and suggest that the inheritance of Fot
17 resistance is controlled by two genes with double recessive epistatic effect.

18

19 **Keywords:** *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*, *Vigna unguiculata*, Genetic
20 Improvement.

1 INTRODUÇÃO

2 O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido como “feijão-de-
3 corda” e “feijão-macassar”, é uma leguminosa de elevada importância econômica social e
4 cultural, sendo um dos principais componentes da dieta alimentar da população nas regiões
5 Norte e Nordeste do Brasil, especialmente na zona rural (Araújo et al. 2019). É uma cultura de
6 grande importância devido ao seu valor nutricional, sendo rica em proteínas, carboidratos,
7 vitaminas. Adicionalmente, o seu cultivo é capaz de gerar emprego e renda aos agricultores
8 dessas regiões brasileiras (Andrade Júnior et al. 2002; Philips et al. 2003; Jayathilake et al.
9 2018).

10 No Brasil a área plantada na safra de 2021/2022, foi superior a 1.279,2 mil hectares,
11 com uma produção de 677,4 mil toneladas (Conab, 2022). O Nordeste é o maior produtor de
12 feijão-caupi com cerca de 1.046,6 mil hectares plantados e uma produção média de 457,1 mil
13 toneladas (Conab, 2022). Apesar de sua rusticidade, o feijão-caupi ainda apresenta baixos
14 índices de produtividade devido à baixa tecnificação de cultivo, solos com pouca fertilidade,
15 chuvas irregulares e a ocorrência de pragas e doenças (Freire-Filho et al. 2011; Castro 2012;
16 Dias et al. 2016).

17 Dentre as doenças, a murcha de fusarium, causada pelo fungo de solo *Fusarium*
18 *oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (*Fot*) merece destaque por ocorrer principalmente nas regiões
19 semiáridas do Nordeste brasileiro, ocasionando danos significativos na sua produção. Esse
20 fungo coloniza as raízes e o xilema das plantas, impedindo a condução de água e levando à
21 murcha e posterior morte dos indivíduos (Schmidt et al. 2016). Há relatos de perdas de produção
22 de até 50% da área plantada em países como a Nigéria, de 75% na Índia, chegando até 98% em
23 campo artificialmente infestado no Brasil (Oyekan, 1977; Allen 1983; Michereff et al. 2005). O
24 principal sintoma decorrente da infecção por *Fot* é a murcha que é sucedida com sintomas de
25 clorose das folhas velhas, senescência prematura das folhas situadas no terço inferior e por fim
26 morte da planta. (Bianchini et al. 2005; Sampaio et al. 2020). A murcha de fusarium é de difícil

1 controle, por se tratar de um patógeno de solo que sobrevive pela produção de clamidósporos,
2 sendo o emprego da resistência genética o método mais eficiente de manejo para essa doença
3 (Oliveira 1981; Rodrigues e Coelho 2004).

4 Diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de identificar a resistência em
5 genótipos, como: Magnólia, Iron PI 293520, Iron Tvu 1990, Iron Tvu 1072 e Iron Tvu 1611
6 (Armstrong e Armstrong 1980), as linhagens L-288004 e L-190004 (Rodrigues e Coelho 2004),
7 MNC01-649F-2-1, MNC01-649F-2-11 (Noronha et al. 2013), TVu 347 (Fawole, 1989; Araújo
8 2017), TVu 984 e TVu 109 (Araújo 2017), além de California Blackeye 27, California Blackeye
9 46, California Blackeye 50, e IT93K-503-1 (Ehlers et al. 2000; Ehlers et al. 2009; Pottorff et
10 al. 2012; Pottorff et al. 2014). No entanto, novos estudos envolvendo a descoberta de fontes de
11 resistência genotípica e estudos de herança associados são de fundamentais importância para o
12 desenvolvimento de programa de melhoramento genético visando à resistência.

13 Os estudos existentes têm apresentado resultados diversos indicando que a herança é
14 monogênica, condicionada por um único gene dominância (Rigert e Foster 1987; Lucky et al.
15 2018; Silva et al. 2021); por dois genes dominantes (Hare 1957) e por dois genes independentes,
16 um recessivo e outro dominante (Rodrigues e Coelho 2004).

17 Silva et al. (2021), utilizando a cultivar resistentes MNC01-649F-2-1, cruzando com a
18 cultivar suscetível BR-17 Gurguéia observaram que a herança da resistência à murcha de
19 fusarium era controlada por um gene dominante, assim como, Lucky et al. (2018) investigando
20 a herança da resistência à *Fot* em linhagens de feijão-caupi, encontraram um padrão de
21 segregação que se encaixa na proporção 3:1, indicando que a resistência é conferida por um
22 único gene dominante. No mesmo patossistema com os parentais CB5 (susceptível) e CB3 e
23 7964 (resistentes), foi relatada a ocorrência de resistência monogênica dominante em relação
24 às raças 1, 2 e 3 de *Fot*, com a segregação de dois genes dominantes para resistência às raças 2

1 e 3 (Rigert e Foster 1987; Hare 1953), ou ainda com dois genes de resistência independentes,
2 dominante e recessivo (13R: 3S), como relatado por Rodrigues e Coelho (2004).

3 Em estudos prévios envolvendo diferentes genótipos de feijão-caupi foi identificado um
4 alto nível de resistência genética da cultivar Miranda IPA 207 à murcha de fusarium (Silva et
5 al. 2021). Assim, é de fundamental importância o conhecimento sobre o tipo de herança
6 genética da resistência ao *Fot*, presente na variedade Miranda IPA 207, essa cultivar, apresenta
7 resultados expressivos para as regiões de cultivo, podendo ser indicada tanto para a Mesorregião
8 da Mata quanto para o Agreste e o Sertão, nos sistemas sequeiro e irrigado. Pode-se ainda
9 estender sua indicação aos demais estados do Nordeste (Costa et al. 2013).

10 Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar a herança da resistência da cultivar
11 Miranda IPA 207 (resistente), ao *Fot* visando sua utilização no desenvolvimento de novas
12 variedades resistentes de feijão-caupi.

13 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

14 **2.1. Desenho experimental**

15 Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC),
16 com três repetições, sendo cada repetição constituída por três plantas por vaso. Os experimentos
17 foram conduzidos em casa de vegetação situada na latitude 8° 1'1.16" S e longitude
18 34°56'38.70" O, localizada no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de
19 Pernambuco (UFRPE) Recife-PE.

20 **2.2. Genótipos de Feijão-caupi**

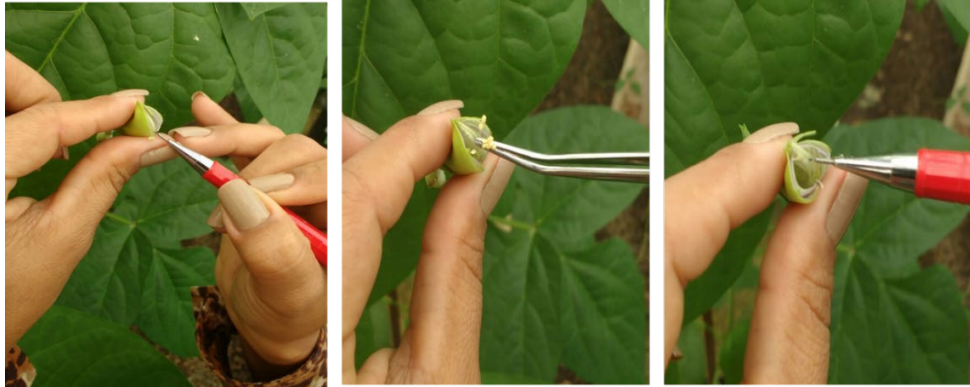
21 O estudo foi realizado a partir do cruzamento entre o genótipo Miranda IPA 207
22 (parental resistente) e BR-17 Gurguéia (parental suscetível), ambos obtidos junto ao Banco
23 Ativo de Germoplasma de feijão-caupi do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Os
24 parentais apresentam flores roxas sendo o resistente usado como receptor feminino e o
25 suscetível como doador masculino.

1 2.3. Ensaio de Cruzamento

2 Após a realização do cruzamento entre os parentais, as sementes F₁ foram obtidas e
3 posteriormente semeadas dando origem às plantas F₁ que, por autofecundação originaram a
4 população F₂. Semanalmente, após a emergência das folhas primárias foram realizadas
5 fertirrigações com solução nutritiva contendo 6,4 g L⁻¹ de KCl; 3,48 g L⁻¹ de K₂SO₄; 5,01 g L⁻¹
6 de MgSO₄.7H₂O; 2,03 g L⁻¹ de (NH₂)₂CO; 0,009 g L⁻¹ de NH₄MO₇O₂₄.4H₂O; 0,054 g L⁻¹
7 de H₃BO₃; 0,222 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 0,058 g L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O; 0,137 g L⁻¹ de
8 MnCl₂.4H₂O; 0,27 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 0,37 g L⁻¹ de EDTA bisódico (Xavier Filha et al.
9 2011), sendo aplicado um volume de 50 mL de solução nutritiva por vaso.

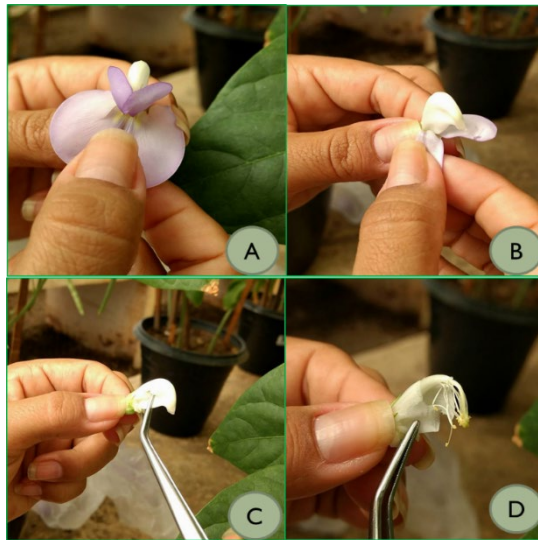
10 Para realizar os cruzamentos foram utilizadas flores do genitor masculino sendo
11 coletadas no início da manhã e em seguida essas flores foram conservadas em refrigerador
12 conforme metodologia de Rachie; Rawal e Franckowiak (1975). A emasculação e polinização
13 das flores do genitor feminino foram realizadas no final da tarde, a fim de aproveitar a baixa
14 temperatura e alta umidade relativa do ar a técnica de emasculação foi realizada segundo
15 Kheradnam e Niknejad (1971), realizando-se a abertura do botão floral pela parte ventral, com
16 um leve corte longitudinal das pétalas, sem removê-las usando uma pinça curva para remoção
17 da antera (Figura 1).

18 Para a exposição do estigma da flor doadora do pólen, forçou-se o estandarte para trás,
19 comprimindo a quilha sobre a base da flor, expondo o estigma através da abertura da parte
20 superior da quilha, removendo as pétalas (Figura 2). A polinização foi realizada friccionando-
21 se o estigma da flor doadora de pólen (masculina) sobre o estigma da flor receptora (feminina),
22 a qual estava emasculada. Ao término do processo, o botão floral polinizado foi identificado
23 com uma etiqueta presa por um fio de lã com a data do cruzamento e o nome do genitor
24 (Figura3) (Freire Filho et al. 2014).



1

2 **Figura 1.** Processo de emasculação em flores de planta de feijão-caupi, mostrando a abertura
3 do botão floral pela parte ventral.



4

5 **Figura 2.** Preparação da flor masculina para emasculação A) remoção do estandarte; B)
6 remoção das asas; C) remoção de parte da quilha; D) flor com estigma exposto recoberto de
7 pólen.

8



9

1 **Figura 3.** Processo de polinização mostrando o cruzamento (A), a etiqueta(B), e uma vagem
2 cruzada no início da maturidade (C).

3

4 **2.4. Teste de resistência ao *Fot***

5 Após o cruzamento e obtenção das gerações F₁ e F₂, as plantas das gerações parentais
6 P₁ (Resistente), P₂ (suscetível), F₁ (híbridos) e F₂ (população segregante) foram inoculadas com
7 o isolado CMM-732 de *Fot* (Figura 4) que apresenta alto nível de agressividade (Veloso 2013;
8 Noronha et al. 2013; Silva et al. 2021). Esse isolado foi obtido junto à Coleção de Culturas de
9 Fungos Fitopatogênicos “Prof.^a Maria Menezes” – CMM, da Universidade Federal Rural de
10 Pernambuco (Recife- PE). Após a semeadura as plântulas com o primeiro par de folhas
11 trifoliolada expandidas (aproximadamente 14 dias), foram inoculadas utilizando a metodologia
12 de imersão de raiz em suspensão de conídios (Pastor-Corrales e Abawi 1987). As raízes das
13 plantas de feijão-caupi foram cuidadosamente retiradas dos copos e lavadas com água até a
14 retirada do substrato. Após o corte do terço final, a raiz foi imersa por cinco minutos em becker
15 plástico com 200 mL de suspensão contendo 1x10⁶ conídios/mL. Imediatamente após a
16 inoculação, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3 dm³ de
17 substrato previamente descrito. O controle consistiu em plantas com raízes cortadas e imersas
18 em água destilada por cinco minutos.

19 A avaliação da severidade da murcha de fusarium nas plantas foi realizada aos 21 dias
20 após a inoculação, com o auxílio de uma escala de notas adaptada de Schoonhoven e Pastor-
21 Corrales (1987), onde: 0 = planta sem sintomas externos; 1 = menos de 10% da folhagem com
22 clorose e/ou murcha; 2 = aproximadamente 25% de folhas com clorose e/ou murcha; 3 =
23 aproximadamente 50% das folhas e ramos com clorose e/ou murcha, com as plantas
24 manifestando nanismo; 4 = aproximadamente 75% ou mais das folhas e ramos com murcha,
25 nanismo severo e desfolha prematura, frequentemente resultando na morte da planta. O valor
26 da nota foi dado em cada planta dos genitores, híbridos e populações segregantes de cada

1 cruzamento (P_1 , P_2 , F_1 e F_2). O valor médio das notas considerando as três repetições em cada
2 genótipo foi utilizado para discriminar os genótipos em classes de reação, sendo: 0 a 1,0 =
3 resistente (R) e 2,1 a 4,0 = suscetível (S).

4 A partir da classificação fenotípica das plantas nas gerações segregantes, a análise foi
5 realizada por meio do Teste-qui-quadrado (χ^2) para estimar o número de genes envolvidos no
6 controle da resistência, utilizando o programa GENES (Cruz 2013).

7 **3. RESULTADOS**

8 De acordo com os resultados das avaliações da murcha de fusarium (Tabela 1), o
9 parental resistente masculino apresentou nota média de 0,87, sendo 93,55% de plantas
10 resistentes sem sintomas da doença e o parental suscetível 6,45% de plantas com sintomas. No
11 entanto, todas as plantas do parental BR-17 Gurguéia foram suscetíveis, com 100% das plantas
12 com notas 3, 4 e mortas. Na geração F_1 (Miranda IPA 207 x BR 17 Gurguéia) das 34 plantas
13 avaliadas 23 foram resistentes e 11 suscetíveis, com média de notas da murcha de fusarium de
14 1,56, sendo mais próxima da média do parental resistente (0,87) em relação ao parental
15 suscetível (3,68). Na geração F_2 , das 246 plantas analisadas 142 apresentaram resistência
16 (57,7%) e 104, suscetibilidade (42,3%), quando a média das notas da murcha dessa geração foi
17 1,26, também mais próxima do parental resistente. Conforme pode ser visualizado no teste do
18 qui-quadrado (Tabela 1), na geração F_1 foi aceita a proporção 2:1 (resistente:suscetível), e na
19 geração F_2 aceita a proporção 9:7 (resistente:suscetível), corroborando com a hipótese de que a
20 herança genética da resistência à *Fot* é controlada por dois genes dominantes complementares.
21 Este resultado revela que há uma interação gênica do tipo epistasia envolvida na expressão da
22 resistência.

23 **4. DISCUSSÃO**

24 O uso da resistência genética caracteriza-se por ser um método de controle eficiente e
25 diminui a utilização de defensivos químicos. Particularmente, para a murcha de fusarium esta

1 é a principal forma de manejo, uma vez que o controle químico não é recomendado. Apesar de
2 estudos realizados previamente mostrando a eficiência de genótipos (Noronha et al. 2013;
3 Pottorff et al. 2014; Silva et al. 2021b) e estudos de herança (Silva et al. 2021a), novos estudos
4 são necessários para identificar genótipos resistentes e determinar a sua herança pertinente.
5 Segundo Silva et al. (2021a), estes estudos visam à recomendação para plantios comerciais e
6 auxiliam a incorporação da resistência em cultivares suscetíveis pelos programas de
7 melhoramento genético. O presente estudo, até o nosso conhecimento, é o primeiro que
8 demonstra a herança da resistência à murcha de fusarium nas variedades de feijão-caupi
9 Miranda IPA 207 e BR-17 Gurguéia, sendo a resistência expressa por dois genes dominantes
10 com efeito de epistasia recessiva dupla.

11 A avaliação da geração F₂, mostrou que 142 plantas das 246 inoculadas, comportaram-
12 se como resistentes enquanto 104 plantas, como suscetíveis, apresentando uma proporção
13 fenotípica de nove plantas resistentes para sete plantas suscetíveis (9:7). A análise do teste qui-
14 quadrado nessa população confirmou a hipótese de que a resistência do genótipo Miranda IPA
15 207 à murcha de fusarium é controlada por dois genes dominantes complementares. Este
16 resultado se assemelha ao encontrado por Batista (2017), que, ao avaliar a população F₂
17 proveniente do cruzamento entre os genitores VC13 x RC-1-8 em feijão comum, observaram
18 uma segregação fenotípica de nove plantas resistentes para sete plantas suscetíveis (9:7),
19 chegando à conclusão de que a herança da resistência de plantas de feijão ao fungo *F.*
20 *oxysporum* f. sp. *phaseoli* é controlada por dois genes dominantes complementares.

21 Pastor-Corrales e Frederick (2008), ao analisarem a segregação da resistência a
22 *Phakopsora pachyrhizi* (FAS) em 241 plantas de feijão-comum na geração F₂, provenientes do
23 cruzamento entre a cultivar suscetível Mexico 309 e Compuesto Negro Chimaltenengo CNC,
24 concluíram que a resistência na cultivar CNC é controlada pela interação de dois genes
25 dominantes complementares. Resultados semelhantes também foram obtidos por Hare (1953),

1 quando realizou estudos com outros parentais resistentes nesse patossistema, encontrou uma
2 herança de dois genes dominantes para resistência às raças 2 e 3 do *Fot*. No entanto, alguns
3 resultados encontrados diferem do presente estudo, como o de Silva et al. (2021a) que ao avaliar
4 a herança da resistência à murcha de fusarium em cruzamentos e retrocruzamentos entre
5 MNCO1-649F-2-1 (resistente) e BR-17 Gurgueia (suscetível), empregando o teste do qui-
6 quadrado, observaram a segregação de três plantas resistentes para uma planta suscetível na
7 população F₂, indicando que a herança da resistência é controlada por um gene monogênico
8 dominante. No mesmo patossistema com os parentais CB5 (suscetível) e CB3 e 7964
9 (resistentes) Rigert e Foster (1987), identificaram que a herança da resistência é do tipo
10 monogênica dominante em relação às raças 1, 2 e 3 de *Fot*. Resultados semelhantes foram
11 obtidos por Lucky et al. (2018) investigando a herança da resistência à *Fot* em linhagens de
12 feijão-caupi encontraram um padrão de segregação que se encaixa na proporção três plantas
13 resistentes para uma planta suscetível (3:1), indicando que a resistência é conferida por um
14 único gene dominante. Há ainda resultados que apontam que a herança da resistência ao
15 fusarium é conferida por dois genes de resistência independentes, dominante e recessivo (13R:
16 3S), como relatado por Rodrigues e Coelho (2004).

17 O estudo da herança da resistência está diretamente interligado com a recomendação do
18 método de melhoramento genético de plantas a ser utilizado no programa de melhoramento da
19 cultura, pois através de retrocruzamentos já se torna possível à incorporação da resistência à
20 doença em cultivares suscetíveis (Castro et al. 2003; Borém e Miranda 2009; Capucho et al.
21 2009; Nkalubo et al. 2009; Musoni et al. 2010; Caixeta e Zambolim 2014; Batista et al. 2017.
22 Após a realização do cruzamento entre o doador e o recorrente, o híbrido F₁ é retrocruzado com
23 o recorrente e somente os indivíduos que apresentarem resistência à doença, juntamente com
24 as características agronômicas requeridas serão retrocruzados com o recorrente em vários ciclos

1 até obter o genótipo com as características agronômicas do recorrente e o gene de resistência
2 do parental doador (Borém e Miranda 2009; Caixeta e Zambolim 2014).

3 Provavelmente, este é um dos poucos relatos sobre resistência conferida por dois genes
4 complementares, sendo um deles com efeito epistático recessivo duplo. Diante disto é
5 importante o desenvolvimento de novos estudos que possibilitem a identificação da localização
6 desses genes no cariótipo da cultura. O mapeamento genético é uma ferramenta que pode ser
7 utilizada na identificação de possíveis marcadores moleculares ligados ao gene de resistência,
8 tendo potencial de se aplicar em melhoramento com seleção assistida por marcadores
9 moleculares, como relatado em diversas pesquisas (Rajpurohit et al. 2011; Yamanaka et al.
10 2015; Hanson et al. 2016; Luo et al. 2017). A seleção assistida por marcadores tem como
11 vantagens, a redução do tempo de obtenção de cultivares comerciais resistente, além de facilitar
12 na piramidação de outros genes de resistência que forem identificados, tendo em vista o manejo
13 e maior durabilidade da resistência no campo (McDonald e Linde 2002; McDonald 2014).

14 De acordo com Pottorff et al. (2012) e Pottorff et al. (2014), é extremamente importante
15 considerarem as raças de *Fot*, pois cultivares antes resistentes podem apresentar a murcha de
16 fusarium em determinados campos devido à presença de outras raças do patógeno. Diante disso,
17 pesquisas devem ser realizadas para identificar as raças predominantes e mais distribuídas de
18 *Fot* no Brasil, pois esse tipo de conhecimento acarreta uma melhor recomendação de cultivares
19 para o plantio.

20

21 **AGRADECIMENTOS**

22 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da
23 bolsa de Doutorado a Risoneide de Cássia Z. Silva. Ao pesquisador Dr Antônio Félix da Costa
24 do Instituto Agrônomo de Pernambuco pelo fornecimento dos genótipos e ao Prof. Dr Sami
25 Jorge Michereff pelo isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (CMM-732).

1 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 Allen, D. J. (1983) The pathology of tropical food legumes: disease resistance in crop
3 improvement. New York: John Wiley e Sons, p. 413
- 4 Andrade Júnior ASde, Rodrigues BHN, Frizzone JÁ, Cardoso MJ, Bastos EA, Melo FDEB
5 (2002) Níveis de irrigação na cultura do feijão-caupi. Revista Brasileira de Engenharia
6 Agrícola, 6: 17-20
- 7 Araújo BA, Queiroz TRG, Torres WLW, Moreira FJC (2019) Veranicos na produtividade de
8 feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no município de Crateús, Ceará. Revista verde de
9 agroecologia e desenvolvimento sustentável 14:312-316
- 10 Araújo LBR (2017) Potencial genético de variedades tradicionais de feijão-caupi e avaliação
11 para resistência à murcha de fusarium. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do
12 Ceará. Fortaleza, Brasil.
- 13 Armstrong GM, Armstrong JK (1980) Cowpea wilt *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum*
14 race I from Nigeria. Plant Disease 64:954–955
- 15 Costa AF, Souza MCM, Couto VTB, Coitinho LBC, Tavares JA, Fonseca MAC (2013)
16 Miranda IPA 207, Nova Cultivar de Feijão-Caupi para o Nordeste Brasileiro. Pesquisa
17 Agropecuaria Pernambucana, 18: 39-43
- 18 Batista RO, Silva LC, Moura LM, Souza MH, Carneiro PCS, Carvalho-Filho JLS, Carneiro
19 JES (2017) Inheritance of resistance to fusarium wilt in common bean. Euphytica 213: 1-12,
20 2017
- 21 Bianchini A, Maringoni AC, Carneiro SMTPG (Eds.) (2005) Manual de fitopatologia. Vol. 2.
22 Doenças das plantas cultivadas. 4. Ed. São Paulo
- 23 Borém A, Miranda GV. (2009) Melhoramento de plantas. 5.ed. UFV, Viçosa

- 1 Caixeta ET, Zambolim EM. Melhoramento genético de plantas visando resistência a doenças.
2 In: Zambolim L, Jesus-Júnior WC, Rodrigues FA (2014) (Eds.). O essencial da fitopatologia:
3 controle de doenças de plantas. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, p. 553-576
- 4 Capucho AS, Caixeta ET, Zambolim EM Zambolim L (2009) Herança da resistência do Híbrido
5 de Timor UFV 443–03 à ferrugem-do-cafeeiro. Pesquisa agropecuária Brasileira 44
- 6 Castro CN (2012) A agricultura no nordeste brasileiro: oportunidades e limitações ao
7 desenvolvimento. 1. ed. Rio de Janeiro, RJ: IPEA.
- 8 Castro NR, Menezes GC, Coelho RSB (2003) Herança da resistência genética do caupi à
9 cercosporiose. Fitopatologia Brasileira 28:552-554.
- 10 CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra
11 Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/22, n. 10 décimo levantamento, Disponível
12 em: [https://](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos) <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.
13 Acesso em: 30 de julho de 2022
- 14 Dias FTC, Bertini CHC M, Freire filho FR (2016) Genetic effects and potential parents in
15 cowpea. Crop Breeding and Applied Biotechnology 16: 315–320
- 16 Ehlers JD, Hall AE, Patel PN, Roberts PA, Matthews WC (2000) Registration of 'California
17 Blackeye 27' cowpea. Crop Science 40: 854-855
- 18 Ehlers JD, Sanden BL, Frate CA, Hall AE, Roberts PA (2009) Registration of 'California
19 Blackeye 27' cowpea. Journal Plant Registrations 3: 236-240.
- 20 Fawole EA (1989) Evaluation of cowpea lines for resistance to wilt of cowpea caused by
21 *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Fitopatologia Brasileira 14: 232-234.
- 22 Freire Filho FR, Ribeiro VQ, Cardoso MJ, Santos AA, Nogueira MSR, Vieira PFMJ, Rocha
23 MM, Silva KJD (2014) Cruzamentos de feijão- caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] realizados

- 1 na Embrapa Meio-Norte, no período de 1982 a 2012. Embrapa Meio Norte. Teresina.
2 Documentos, 226- 121
- 3 Freire-Filho FR, Ribeiro VQ, Rocha MM, Silva KJD, Nogueira MSR, Rodrigues EV (2011)
4 Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. 1. ed. Teresina,
5 PI: Embrapa Meio-Norte.
- 6 Hanson P, Lu S, Wang JF, Chen W, Kenyon L, Tan CW, Tee KL, Wang YY, Hsu YC,
7 Schafleitner R, Ledesma D, Yang RY (2016) Conventional and molecular marker-assisted
8 selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia*
9 *Horticulturae* 201: 346–354
- 10 Hare WW (1953) A new race of *Fusarium* causing wilt of cowpea. *Phytopathology* 43:291.
- 11 Hare WW (1957) A new race of *Fusarium* causing wilt of cowpea. *Phytopathology*, Saint Paul,
12 47: 457-465
- 13 Jayathilake C, Visvanathan R, Deen A, Bangamuwage R, Jayawardana CB, Nammi S, Liyanage
14 R (2018) Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. *Journal of the Science*
15 *of Food and Agriculture* 98: 4793-4806
- 16 Kheradnam M, Niknejad M (1971) Crossing Technique in Cowpeas. *Iranian Journal*
17 *Agriculture Research Teheran*1:57-58
- 18 Lucky OO, Danmaigona CC, Kamara AY, Ekefan EJ, Timko MP (2018) Genetic analysis of
19 *Fusarium* wilt resistance in cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.). *Plant Breeding* 137:773–781
- 20 Luo Y, Ma T, Zhang A, Ong KH, Luo Z, Li Z, Yang J, Yin Z (2017) Marker-assisted breeding
21 of Chinese elite rice cultivar 9311 for disease resistance to rice blast and bacterial blight and
22 tolerance to submergence. *Molecular Breeding* 37: 106

- 1 Mcdonald BA (2014) Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in
2 agricultural ecosystems. *Tropical Plant Pathology* 39: 191-196
- 3 Mcdonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and
4 durable resistance. *Annual Review Phytopathology* 40: 349-379
- 5 Michereff S J (2005) Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais.
6 In: Michereff SJ, Andrade DEGT, Menezes M (Eds.). *Ecologia e Manejo de Patógenos*
7 *Radiculares em Solos Tropicais*. 1. ed. Recife, PE: UFRPE - Imprensa Universitária, p. 1–18.
- 8 Musoni A, Kimani P, Narla RD, Buruchara R, Kelly J (2010) Inheritance of fusarium wilt
9 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) resistance in climbing beans. *African Journal of*
10 *Agricultural Research* 5:399-404.
- 11 Nkalubo ST, Melis R, Derera J, Laing MD, Opio F (2009) Genetic analysis of anthracnose
12 resistance in common bean breeding source germplasm. *Euphytica* 167:303–312.
- 13 Noronha MA, Lopes CLRBP, Oliveira BMM, Ventura HP, Tôrres RJA, Michereff SJ, Silva
14 KJD (2013) Resistência de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp.
15 *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* In: Congresso Nacional de Feijão-caupi,
16 Recife-PE, 3p.
- 17 Oliveira MZA Fungos associados a sementes de caupi: Identificação, patogenicidade e controle.
18 1981, 41f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 1981.
- 19 Oyekan PO (1977) Reactions of some cowpea varieties to *Fusarium oxysporum* f.sp.
20 *tracheiphilum* in Nigeria. *Tropical Grain Legume Bulletin*, Ibadan 8:47-49
- 21 Pastor-Corrales MA, Frederick RD (2008) Resistance to the soybean rust pathogen
22 (*Phakopsora pachyrhizi*) in common bean cultivar CNC. *Annual Report of The Bean*
23 *Improvement Cooperative* 51: 20-21

- 1 Philips RD, McWatters KH, Chinnan MS, Hung Y, Beucha LR, Sefa-Dedeh S, Sakyi-Dawson
2 E, Ngoddy P, Nnanyelugo D, Enwere J, Komey NS, Liu K, Mensa-Wilmot Y, Nnanna IA,
3 Okeke C, Prinyawiwatkul W, FK Saalia FK (2003) Utilization of cowpeas for human food.
4 *Field Crops Research* 82:193-213
- 5 Pottorff M, Wanamaker S, Ma YQ, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ (2012) Genetic and
6 Physical Mapping of Candidate Genes for Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp.
7 *Tracheiphilum* race 3 in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *PLoS one* 7:1-12.
- 8 Pottorff MO, Li G, Ehlers JD, Close TJ, Roberts PA (2014) Genetic mapping, synteny, and
9 physical location of two loci for *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 4 resistance in
10 cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp] *Mol Breeding* 33:749-791
- 11 Rachie K, Rawal KM, Franckowiak JDA (1975) rapid method of hand crossing cowpeas.
12 Ibadan, Nigéria: Institute of Tropical Agriculture 5p.
- 13 Rajpurohit D, Kumar R, Kumar M, Paul P, Awasthi A, Basha PO, Puri A, Jhang T, Singh K,
14 Dhaliwal HS (2011). Pyramiding of two bacterial blight resistance and a semidwarfing gene in
15 Type 3 Basmati using marker-assisted selection. *Euphytica* 178:111–126
- 16 Rigert RS, Foster KW (1987) Inheritance of resistance to two races of *Fusarium* wilt in three
17 cowpea cultivars. *Crop Science* 27:220-224
- 18 Rodrigues AA, Coelho RSB (2004) Murcha de fusário do caupi: métodos de inoculação, reação
19 de germoplasma e controle genético da resistência. *Summa Phytopathologica* 30: 23-30
- 20 Sampaio AM, Araújo SS, Rubiales D, Patto MCV (2020) *Fusarium* Wilt Management in
21 Legume Crops *Agronomy* (10): 1073
- 22 Schmidt SM, Lukasiewicz J, Farrer R, Dam PV, Bertoldo C, Rep M (2016) Comparative
23 genomics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* reveals the secreted protein recognized by the
24 Fom-2 resistance gene in melon. *New Phytologist* 209: 307–318

- 1 Schoonhoven AV, Pastor-corrales MA (1987) Standard system for the evaluation of bean
2 germplasm. Cali: CIAT. 53P.
- 3 Silva RCZ, Lôbo RA, Nicoli A, Batista RO, Filho JLSC, Costa AF, Rios JA (2021a) Inheritance
4 of genetic resistance to fusarium wilt in cowpea. *Tropical Plant Pathology* 46:481-486
- 5 Silva RCZ, Silva AC, Carvalho RM, Costa AF, Nicoli A, Rios JA (2021b) Identification of
6 cowpea genotypes resistant to fusarium wilt. *Revista Caatinga* 34: 957-964
- 7 Veloso JS (2013) Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium*
8 *oxysporum* associados à murcha em feijão- caupi. 43f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) -
9 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- 10 Xavier filha MS, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR (2011)
11 Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian. Plant Pathology* 40:28-38
- 12 Yamanaka N, Morishita M, Mori T, Lemos NG, Hossain MM, Akamatsu H, Kato M, Yamaoka
13 Y (2015) Multiple Rpp-gene pyramiding confers resistance to Asian soybean rust isolates that
14 are virulent on each of the pyramided genes. *Tropical Plant Pathology* 40:283-290

Tabela 1. Avaliação da segregação fenotípica para resistência ao *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Fot) (isolado CMM-732) inoculado em plantas de feijão-caupi das variedades Miranda IPA 207 e BR17-Gurguéia. Recife-PE, 2022.

Genótipo ou Cruzamento	Número de Plantas		Taxa esperada	χ^2	Probabilidade (%)
	R	S	R:S		
Miranda IPA 207	29	2	1:0	-	-
BR-17 Gurgueia	0	31	0:1	-	-
F ₁	23	11	2:1	3.55*	-
F ₂	142	104	9:7	0.21*	64,12

* Aceita-se a hipótese ao nível de 5% de significância (χ^2 calculado menor que o tabelado = grau de liberdade a 1, X² tabelado 3,84).



2 **Figura 4.** Plantas dos parentais (P₁, P₂) e gerações (F₁ e F₂) inoculadas com *Fusarium*
3 *oxysporum* f. sp. *tracheophilum*.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

CAPÍTULO III



ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO FEIJÃO-CAUPI INFECTADOS

POR *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*

1 **Aspectos Bioquímicos e Fisiológicos do Feijão-Caupi Infectados por**

2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

3

4 **Risoneide de Cássia Zeferino Silva¹, Keyla Walescka Lopes da Silva¹, Edivan Rodrigues**
5 **de Souza², Larissa Cavalcante Almeida¹, Monaliza Alves dos Santos², Jonas Alberto**
6 **Rios*^{1,3}**

7

8 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Fitopatologia.

9 ² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Solos.

10 ³ Universidade Federal de Viçosa, *Campus Florestal*, Florestal-MG.

11 * Autor para correspondência:

12

1. RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa cultivada e consumida em todo o mundo, predominantemente em regiões tropicais. Dentre os diversos fatores bióticos que podem prejudicar a sua produção, a murcha causada pelo fungo *F oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (*Fot*) e considerada de grande importância. Esse fungo de solo penetra nas raízes causando sintomas na planta, como redução da altura, clorose foliar, descoloração vascular, murcha e queda prematura das folhas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho fisiológico (fluorescência da clorofila (Chl) *a*, vigor vegetativo, potencial hídrico e concentração de pigmentos fotossintéticos), as atividades de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD),) e atividade da fenilalanina amônia liase (FAL)) em raízes e folhas de plantas suscetível (BR 17 Gurguéia) e de plantas resistentes (Miranda IPA 207 e MNCO1-649F-2-1). A severidade da murcha foi menor para plantas resistentes em comparação com as plantas suscetíveis. Este resultado evidenciou maiores concentrações de clorofila (Chl) *a*, Chl *b* e carotenoides, além de um maior potencial hídrico nestas plantas. Adicionalmente, por apresentar menor severidade a funcionalidade do aparato fotossintético foi preservada nas folhas. As atividades de SOD, CAT, POX e APX aumentaram nas folhas e raízes infectadas em comparação com os pares não inoculadas, sendo a magnitude de aumento foi superior nas plantas resistentes. Para as raízes de plantas resistentes, a atividade da FAL foi significativamente maior em comparação às raízes de BR 17 Gurguéia. Com base nos dados do presente estudo, pode-se concluir que a fotossíntese foi menos prejudicada em plantas resistentes e infectadas por *Fot*. Houve uma maior efetividade das enzimas sequestrantes de espécies reativas de oxigênio nas folhas e raízes de plantas resistentes, sugerindo uma menor infecção por *Fot*. Além disso, a severidade da murcha foi reduzida nas raízes dos genótipos resistentes devido ao aumento da atividade da FAL.

Palavras chaves: Estresse biótico, enzimas oxidativas, fotossíntese, *Vigna unguiculata*.

1 ABSTRACT

2 Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is a legume cultivated and consumed worldwide, but
3 predominantly in tropical regions. Among the various biotic factors that can impair its
4 production, the wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Fot) and
5 considered of great importance. This soil fungus penetrates the roots causing various plant
6 symptoms such as reduced height, chlorosis, vascular discoloration, wilting and premature leaf
7 drop. Thus, this study aimed to evaluate the physiological performance (chlorophyll (Chl) a
8 fluorescence, vegetative vigor, water potential and concentration of photosynthetic pigments),
9 the activities of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase
10 (POX), superoxide dismutase (SOD),) and phenylalanine ammonia lyase (FAL) activity in roots
11 and leaves of susceptible plants (BR 17 Gurguéia) and resistant plants (Miranda IPA 207 and
12 MNCO1-649F-2-1). Wilt severity was significantly lower for resistant plants compared to
13 susceptible plants. This result showed higher concentrations of chlorophyll (Chl) a, Chl b and
14 carotenoids, in addition to a greater water potential in these plants. Additionally, due to its lower
15 severity, the functionality of the photosynthetic apparatus was preserved in the leaves. SOD,
16 CAT, POX and APX activities increased in infected leaves and roots compared to uninoculated
17 pairs, and the magnitude of increase was higher in resistant plants. For the roots of resistant
18 plants, the activity of FAL was significantly higher compared to the roots of BR 17 Gurguéia.
19 Based on the data of the present study, it can be concluded that photosynthesis was less impaired
20 in resistant and Fot-infected plants. There was a greater effectiveness of the enzymes
21 scavenging reactive oxygen species in the leaves and roots of resistant plants, suggesting a
22 lower infection by Fot. Furthermore, wilt severity was reduced in the roots of resistant
23 genotypes due to increased FAL activity.

24 **Keywords:** Biotic stress, oxidative enzymes, photosynthesis, *Vigna unguiculata*

1 2. INTRODUÇÃO

2 O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa cultivada e consumida
3 em todo o mundo, mas predominantemente em regiões tropicais onde predomina a agricultura
4 de sequeiro. No Brasil, a produção de feijão-caupi é de 677,4 mil toneladas, sendo cultivado
5 em 1.279,2 mil hectares, com produtividade de 530kg hectares (Conab 2022). Os maiores
6 produtores no Nordeste, são os estados do Ceará, Piauí e Bahia (Conab 2022). Devido ao seu
7 alto valor nutricional, principalmente por se tratar de uma leguminosa rica em proteínas,
8 carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e com baixo teor de gordura, o feijão-caupi é um dos
9 principais componentes da dieta de diversas populações de baixa renda no mundo (Philips et
10 al. 2003; Chathuni et al. 2018). O feijão-caupi é suscetível a inúmeras doenças sendo a murcha
11 causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (*Fot*) (E.F. Smith), a mais
12 importante (Nechet e Vieira 2006). O fungo penetra através do sistema radicular causando
13 vários sintomas na planta, como redução da altura, clorose, descoloração vascular, murcha e
14 queda prematura das folhas (Armstrong e Armstrong 1980; Assunção et al. 2003b; Pottorff et
15 al. 2012). Os sintomas externos normalmente se tornam evidentes no estágio de plântula ou
16 durante a floração e o desenvolvimento inicial das vagens, resultando em alta mortalidade das
17 plantas nas áreas afetadas com perda significativa de rendimento geral (Pottorff et al. 2012).
18 *Fot* é um fitopatógeno de solo de difícil controle, sendo importante estudos envolvendo métodos
19 de manejo efetivos e sustentáveis como o emprego da resistência genética (Gordon 2017)

20 O excesso de radicais livres gerados durante a infecção por patógenos é nocivo às
21 plantas, sendo importante a atuação do sistema antioxidante. Entre estes mecanismos
22 antioxidantes destacam-se as enzimas peroxidases (POX), superóxido dismutase (SOD),
23 catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (Davar et al. 2013; Uarrota et al. 2014).
24 Plantas de trigo infectadas por *Bipolaris sorokiniana* apresentaram acúmulo de espécies
25 reativas de oxigênio (EROs), que causam estresse oxidativo, e aumentam as atividades de

1 enzimas antioxidantes (Rios et al. 2017). As ROS incluem radicais livres como o ânion
2 superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH), bem como moléculas não radicais, como o
3 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sharma et al. 2012). Essas EROs devem ser efetivamente
4 eliminadas, para evitar danos oxidativos às células vegetais, levando à peroxidação lipídica e à
5 destruição de macromoléculas como lipídios, ácidos nucleicos, pigmentos e proteínas (Apel et
6 al. 2004). Aliado ao seu efeito fungicida, as folhas de trigo pulverizadas com azoxistrobina
7 apresentaram maiores atividades de SOD, POX e CAT, que foram associadas à menor
8 concentração de ROS, retardando a senescência foliar e prolongando a duração da fotossíntese
9 (Wu e Von-Tiedemann 2001; Zhang et al. 2010). Ataques de patógenos resultam em redução
10 da fotossíntese nas folhas (Bassanezi et al. 2002; Bastiaans 1993), e, como consequência perda
11 de produtividade (Bassanezi et al. 2002). Estudos recentes usando fluorescência de Chl a
12 permitiram compreender as mudanças no potencial fotossintético em plantas infectas por
13 patógenos (Baker et al. 2001; Rolfe et al. 2010).

14 Apesar de inúmeros estudos envolvendo enzimas do sistema antioxidativo e parâmetros
15 fisiológicos, poucos são os relatos envolvendo efeito de patógenos de solo. Assim, o presente
16 estudo objetivou avaliar o efeito de *Fot* sobre os processos bioquímicos e fisiológicos de
17 genótipos feijão-caupi com diferentes níveis de resistência. Adicionalmente, este trabalho busca
18 elucidar os mecanismos bioquímicos de defesa que operam em genótipos resistentes de feijão-
19 caupi durante o processo de infecção por *Fot*.

20 **3. MATERIAL E MÉTODOS**

21 **3.1 Implantação do experimento**

22 Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Universidade Federal
23 Rural de Pernambuco Recife-PE, localizado nas coordenadas geográficas 08° 00' 59,9'' S e 34°
24 56' 38,6'' W. Foram utilizados três genótipos de feijão-caupi BR-17 Gurguéia (padrão de
25 suscetibilidade), Miranda IPA 207 e MNCO1-649F-2-1 (consideradas resistentes e altamente

1 resistente à murcha de fusarium, respectivamente) (Silva et al. 2021). Um total de 30 sementes
2 de cada genótipo foram semeadas em copos plásticos contendo substrato composto de uma
3 mistura de 1: 1: 1 de casca de pinheiro, turfa e vermiculita expandida ((Basaplant ®, Artur
4 Nogueira, São Paulo, Brazil). O substrato em cada vaso foi fertilizado com uma solução
5 nutritiva contendo 6,4 g L⁻¹ de KCl; 3,48 g L⁻¹ de K₂SO₄; 5,01 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 2,03 g L⁻¹
6 de (NH₂)₂CO; 0,009 g L⁻¹ de NH₄MO₇O₂₄.4H₂O; 0,054 g L⁻¹ de H₃BO₃; 0,222 g L⁻¹ de
7 ZnSO₄.7H₂O; 0,058 g L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O; 0,137 g L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O; 0,27 g L⁻¹ de
8 FeSO₄.7H₂O e 0,37 g L⁻¹ de EDTA bisódico (Xavier filha et al. 2011). Um volume de 25 mL
9 de solução nutritiva foi aplicado semanalmente após a emergência das mudas.

10 **3.2 Procedimento de inoculação**

11 A produção do inóculo de *Fot* foi conduzida por meio do cultivo do isolado CMM-732,
12 o qual apresenta alto nível de agressividade (Veloso 2013; Noronha et al. 2013). Esse isolado
13 foi obtido junto à Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof.^a Maria Menezes” –
14 CMM, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O fungo foi cultivado por sete dias em
15 meio BDA (Batata Dextrose Ágar) e a suspensão de esporos ajustada para 1x10⁶ conídios/mL⁻¹.
16 A inoculação foi realizada seguindo a metodologia de imersão de raízes em suspensão de
17 conídios (Pastor-Corrales e Abawi 1987). As plantas foram cuidadosamente retiradas dos
18 copos, suas raízes foram lavadas e 1/3 do seu comprimento foi cortado e imediatamente após o
19 corte, o sistema radicular das plantas foi imerso na suspensão de conídios durante cinco
20 minutos. Em seguida, três plantas de cada genótipo foram transplantadas por vaso (repetição)
21 com capacidade de três litros de solo. As testemunhas foram constituídas de plantas com raízes
22 cortadas e imersas em água.

23 **3.3 Avaliação da severidade da murcha**

24 A avaliação da severidade da murcha de fusarium nas plantas foi realizada aos 9 e 15 dias após
25 a inoculação (dai), com o auxílio de uma escala de notas adaptada de Schoonhoven e Pastor-
26 Corrales (1987), onde: 0 = planta sem sintomas externos; 1 = menos de 10% da folhagem com

1 clorose e/ou murcha; 2 = aproximadamente 25% de folhas com clorose e/ou murcha; 3 =
2 aproximadamente 50% das folhas e ramos com clorose e/ou murcha, com as plantas
3 manifestando nanismo; 4 = aproximadamente 75% ou mais das folhas e ramos com murcha,
4 nanismo severo e desfolha prematura, frequentemente resultando na morte da planta. O valor
5 médio das notas considerando as três repetições em cada genótipo foi utilizado para discriminar
6 os genótipos em classes de reação, sendo: 0 a 1,0 = resistente (R); 2,1 a 4,0 = suscetível (S).

7 **3.4 Avaliação do vigor vegetativo das plantas**

8 A mensuração do vigor vegetativo foi realizada em todas as plantas de cada tratamento
9 aos 9 e 15 dias após a inoculação (DAI). O diâmetro do caule foi aferido a uma altura de 1 cm
10 da superfície do solo com auxílio de paquímetro digital (Digimess®). A determinação da altura
11 da planta (cm) foi mensurada utilizando-se fita métrica a partir do nível do solo até a base da
12 inserção do broto terminal. A contagem do número de folíolos por planta foi realizada em todas
13 as folhas de cada planta.

14 **3.5 Determinação da fluorescência**

15 As avaliações de emissão de fluorescência pela clorofila *a* foram realizadas com
16 fluorômetro portátil (FluorPen FP100 PSI) na primeira folha expandida de cada planta, aos 9 e
17 15 DAI. As leituras foram realizadas das 8:00 às 11:00 horas da manhã. Primeiramente, todas
18 as folhas analisadas foram parcialmente cobertas com uma pinça de metal proporcionando uma
19 condição de escuro durante 30 minutos. Posteriormente, foi determinado os valores de máxima
20 eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) nestes tecidos.

21 **3.6 Pigmentos fotossintéticos**

22 Após a avaliação da fluorescência da clorofila *a* as folhas utilizadas foram cortadas,
23 embrulhadas em papel alumínio e armazenadas em recipiente à baixa temperatura e conduzidas
24 ao laboratório. Para a extração dos pigmentos, cinco discos foliares (0,5 cm de diâmetro) foram
25 obtidos da primeira folha expandida de cada repetição em cada tratamento aos 9 e 15 DAI. Os
26 discos recolhidos foram imersos em tubos de centrífuga de 5 mL, contendo 2,5 ml de solução

1 saturada de DMSO (Wellburn 1994) e mantidos no escuro à temperatura ambiente durante 24
2 h. Os tubos foram revestidos com papel alumínio de modo a evitar a incidência de luz em seu
3 interior. As absorvâncias dos extratos foram determinadas a, 665,1 649,1 e 480 nm para
4 determinação da absorvância da clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, respectivamente.

5 **3.7 Potencial hídrico (ψ_w)**

6 Para avaliar o potencial hídrico das folhas foi utilizado uma câmara de pressão de
7 Scholander (Model 1515D Pressure Chamber Instrument) uma folha trifoliolada foi coletada
8 em cada repetição de cada tratamento aos 9 e 15 DAI. Para a medição do potencial hídrico
9 foliar, as folhas foram coletadas às 4h da manhã, sendo envolvidas em papel alumínio e
10 armazenadas em geladeira para posterior leitura. As leituras foram realizadas entre 7 e 9h da
11 manhã, utilizando-se uma câmara de pressão tipo Scholander (modelo 1515D Pressure
12 Chamber Instrument (EUA). A escolha do horário se deve ao fato de que o potencial hídrico
13 foliar medido na antemã é um indicativo do estado hídrico das plantas. A folha foi inserida
14 na câmara da bomba deixando-se a base do pecíolo aparente sendo aplicada uma pressão em
15 carga crescente e gradual até a seiva xilemática começar a surgir na superfície do pecíolo, cuja
16 observação foi feita com auxílio de luz artificial e lente de aumento (lupa). Nesse momento,
17 realizou-se a leitura do manômetro e a pressão observada corresponde ao potencial hídrico da
18 seiva xilemática.

19 **3.8 Análises bioquímicas**

20 Amostras de folhas e raízes foram coletadas nos dias 9, e 15 DAI, levadas para o
21 laboratório, pesadas (0,2 g) e maceradas em nitrogênio líquido em almofariz até a obtenção de
22 um pó fino, que foi homogeneizado em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8)
23 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico
24 (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (m/v). Posteriormente o material foi
25 centrifugado a 12000 rpm por 15 min, a 4 ° C transferindo-se o sobrenadante para tubos de

1 Eppendorf, armazenados a -20 °C, até a prática das atividades enzimáticas. Os sobrenadantes
2 foram utilizados para determinar a atividade das enzimas SOD, CAT, POX e APX.

3 A atividade da SOD foi determinada pela adição de 60 µL do extrato em 1,94 mL de
4 mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM,
5 azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al.
6 1993). A reação ocorreu a 25 °C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de
7 exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela foto redução
8 do NBT, foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc.,
9 Massachusetts - EUA), a 560 nm (Giannopolitis e Ries 1977).

10 As amostras controle tiveram suas absorbâncias medidas a 560 nm utilizando-se
11 mistura de reação mantida no escuro por 10 min. Os valores obtidos foram subtraídos das
12 leituras das amostras das repetições dos tratamentos que receberam iluminação. Uma unidade
13 da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto redução
14 do NBT

15 A atividade da CAT foi determinada pelo método de (Cakmak e Marschner 1992). A
16 mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e de peróxido
17 de hidrogênio H₂O₂ 25 mM em um volume de 250 µL. A reação foi iniciada pela adição de 5
18 µL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm, durante 1
19 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ Anderson et al. (1995), foi usado
20 para determinar a atividade das CAT, a qual foi expressa em mmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

21 A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a
22 metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). A mistura de reação foi constituída de tampão
23 fosfato de potássio 63 mM (pH 6,8), pirogalol 50 mM e H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL.
24 A reação foi iniciada pela adição de 2 µL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo
25 consumo de H₂O₂ a 420 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,47

1 mM⁻¹ cm⁻¹ Chance e Maehley (1955), foi usado para calcular a atividade da POX, a qual foi
2 expressa em μmol de purpurogalina produzida em min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3 A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). A mistura
4 de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), H₂O₂ 5 mM e
5 ascorbato 4 mM, em um volume de 250 microlitros. A reação foi iniciada pela adição de 10 μL
6 do extrato foliar e a atividade foi medida pela oxidação do ascorbato a 290 nm, durante 1 min,
7 a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ Nakano e Asada (1981), foi usado
8 para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

9 A atividade da PAL foi avaliada seguindo o método proposto por Guo et al. (2007) com
10 algumas modificações. Primeiro, a reação foi iniciada pela adição de 100 μL de extrato
11 enzimático bruto a 0,9 mL de uma mistura de reação contendo tampão borato de sódio 40 mM
12 (pH 8,8) e L-fenilalanina 20 mM. A mistura reação foi incubada a 30°C durante 1 h. Para as
13 amostras controle, o extrato foi substituído por tampão borato. A reação foi interrompida pela
14 adição de 50 μL de 6 N HCl. A absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi registrada
15 a 290 nm. A atividade da PAL foi estimada usando um coeficiente de extinção de 10 M/cm
16 (Zucker 1965). As atividades das enzimas foram expressas com base em proteínas. A
17 concentração de proteína em cada amostra foi determinada de acordo com (Bradford 1976).

18 **3.9. Análise estatística dos Dados**

19 Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente causalizado em
20 esquema fatorial 3x2 com (cinco) repetições. Os fatores estudados foram resistência de
21 cultivares (suscetível, e resistente) e inoculação de plantas (inoculado e não inoculado). Cada
22 unidade experimental correspondeu a um vaso plástico contendo três plantas de feijão. Os dados
23 das análises epidemiológicas, bioquímicas, e fisiológicas foram submetidos à análise de
24 variância e as médias dos tratamentos serão comparadas pelo teste de tukey ($P \leq 0,05$) e teste *t*
25 utilizando-se o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

26

1 4. RESULTADOS

2 Os sintomas de murcha de fusarium em feijão-caupi surgiram inicialmente como
3 murchas foliares nos períodos mais quentes do dia, evoluindo posteriormente para uma murcha
4 persistente, amarelecimento, necrose e desfolha, sendo estes sintomas em maior intensidade nas
5 plantas da cultivar BR-17 Gurguéia (75-100%) em relação às plantas das cultivares Miranda
6 IPA 207 (10-25%) e MNCO1 (0-10%) (Figura 1 A, B).

7 As folhas das plantas da cultivares Miranda IPA 207 e MNCO1 apresentaram,
8 respectivamente, níveis superiores em 29-31 % e 36-49 % para clorofila *a*, 29-30 % e 35-48 %
9 para clorofila *b* e 38-47 % e 31-66 % para carotenoides comparados à cultivar BR-17 Gurguéia
10 aos 9 e 15 DAI com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Para todos os pigmentos
11 analisados, foi observada uma redução significativa nas folhas inoculadas da cultivar -17
12 Gurguéia em relação ao controle não inoculado (Figura 2). Para os níveis de fluorescência,
13 houve um aumento significativo nos níveis de F_v/F_m somente aos 15 DAI sendo as cultivares
14 Miranda IPA 207 e MNCO1 inoculadas com *Fot* estatisticamente maiores em 22% e 28%,
15 respectivamente, quando comparadas a cultivar BR-17 Gurguéia. Para este mesmo período, o
16 nível de fluorescência foi reduzido em 30% em folhas inoculadas com *Fot* quando comparado
17 ao controle sem inoculação (Figura 3).

18 O potencial hídrico foi reduzido significativamente nas plantas inoculadas da cultivar
19 BR-17 Gurguéia, com reduções de 65-95 % comparado à cultivar Miranda IPA 207 e de 78-
20 93% comparado a MNCO1. Esse mesmo efeito foi percebido quando comparado às respectivas
21 plantas NI, com estas reduções de 75% aos 9 DAI e 95% aos 15 DAI. Similarmente, esse efeito
22 foi de 38 % para a cultivar Miranda IPA 207 aos 9 DAI. (Figura 4). A murcha de fusarium
23 também reduziu o vigor vegetativo de plantas de feijão-caupi. Esse fato se deve à redução
24 significativa do diâmetro do caule nas plantas da cultivar BR-17 Gurguéia, sendo uma redução
25 de 75% e 94% em relação às cultivares Miranda IPA 207 e MNCO1, respectivamente, aos 15
26 DAI. Similarmente essa redução também foi observada na altura das plantas em 70% e 89 % e

1 para número de folhas em 57% e 82 %. Somente a cultivar resistente MNCO1, por resistir à
2 doença manteve o diâmetro similar ao controle NI aos 15 DAI, tendo esse efeito não ocorrido
3 para à cultivar BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207 que tiveram suas alturas reduzidas,
4 respectivamente, em 75% e 95 % neste período. As plantas de feijão-caupi inoculadas
5 apresentam redução em altura aos 9 e 15 DAI, respectivamente, de 29,4- 48,3% para MNCO1,
6 32,9 -95,5% para BR-17 Gurguéia e 43,5-87,3% para Miranda IPA 207 quando comparadas
7 aos pares não inoculados. Essas reduções também foram observadas nos níveis de desfolha das
8 plantas inoculadas das cultivares BR-17 Gurguéia (70,5-86,5%) e Miranda IPA 207 (38,3-
9 57,2%) (Figura 5).

10 As atividades das enzimas do sistema antioxidativo foram influenciadas pelo nível de
11 intensidade da doença encontrada nas cultivares. Para a SOD houve nas plantas inoculadas
12 atividades significativamente maiores aos 9 DAI para a cultivar Miranda IPA 207 (33,1%) e
13 aos 15 DAI para a cultivar BR-17 Gurguéia (34,3%), Miranda IPA 207 (29,8%) em relação às
14 folhas inoculadas do genótipo MNCO1. Comparado as folhas NI, folhas inoculadas
15 apresentaram um aumento significativo de atividade da SOD para cultivares Miranda IPA 207
16 (33,8%) aos 9 DAI e Gurguéia (24,9%) ao 15 DAI. Comparado ao padrão suscetível, foi
17 observado um aumento significativo da atividade de POX (36,1%) e CAT (47,3%) aos 15 DAI,
18 da APX (33,9%) e CAT (48,9%) para MNCO1 aos 9 DAI. Similarmente para Miranda IPA
19 207, este efeito foi observado aos 15 DAI para a CAT (43%) (Figura 6). Em relação ao
20 Gurguéia, houve aumento significativo das atividades de enzimas antioxidantes APX (14,1%)
21 no genótipo MNCO1 aos 9 DAI e para a SOD (55,8%), POX (30,3%), CAT (51,7%) e APX
22 (20,3%) aos 15 DAI nas raízes. Similarmente para a Miranda IPA 207, esse aumento de
23 atividade ocorreu para APX (13,7%) aos 9 DAI e para a SOD (42,9%), POX (16,5%) aos 15
24 DAI. (Figura 7). De forma geral, foi observado um aumento das atividades destas enzimas em
25 folhas e raízes aos 9 e 15 DAI de plantas inoculadas quando comparadas aos respectivos pares

1 não inoculados, com destaque para a cultivar MNCO1 que apresentou aumento de atividades
2 de forma mais intensa diante da inoculação do patógeno (Figura 7, 8).

3 A atividade da FAL foi aumentada somente nas raízes de plantas de feijão-caupi,
4 ocorrendo um aumento significativo de 41,4 e 48,6% na atividade em raízes de MNCO1 e
5 Miranda IPA 207 aos 15 DAI em relação a atividade encontrada na cultivar Gurguéia. Em
6 relação ao efeito da inoculação, foi observado um aumento de 40% na atividade da FAL nas
7 folhas aos 9 DAI na cultivar Gurguéia quando comparado aos controles não inoculados.
8 Similarmente aos 15 DAI, este efeito foi de 45% para a Gurguéia e 54,8% para a MNCO1. Em
9 relação as raízes não inoculadas, houve aumento da PAL 30,8% e 35,6%, somente aos 15 DAI,
10 respectivamente para a cultivar MNCO1 e Miranda IPA 207 (Figura 8).

11 **5. DISCUSSÃO**

12 O presente estudo fornece, até o nosso conhecimento, as primeiras evidências de
13 mecanismos bioquímicos de resistência em raízes feijão-caupi operando contra a infecção de
14 *Fot*. De fato, o presente trabalho mostrou que as cultivares Miranda IPA 207, e principalmente,
15 a cultivar MNCO1 expressaram altas atividades das enzimas do sistema antioxidativo. Esta
16 última apresentou aumento significativo da atividade da enzima de defesa PAL, enzima chave
17 na rota de defesa das plantas. É bem reconhecida a importância das enzimas de defesa, como a
18 FAL, para a resistência de muitas espécies de plantas em resposta à infecção por patógenos
19 (Lozovaya et al. 2004; Sahoo et al. 2009; Gnanamangai et al. 2011; Leite et al. 2014;
20 Nascimento et al. 2016). Todos estes mecanismos contribuíram para uma menor intensidade de
21 sintomas de murchas e, conseqüentemente, uma maior eficiência fisiológica destas plantas (aqui
22 denotadas pelo potencial hídrico, pigmentos fotossintéticos, fluorescência clorofila *a*). Foi
23 verificado que o genótipo MNCO1-649F-2-1 apresentou um alto padrão de resistência em todos
24 os experimentos aqui realizados. O genótipo MNCO1-649F-2-1 também foi recentemente
25 identificado como um material promissor, com plantas sem sintomas da doença ou com menos
26 de 10% da folhagem apresentando clorose e/ou murcha (Noronha et al. 2013; Silva et al. 2021).

1 A capacidade fotossintética das folhas de feijão-caupi infectadas por *Fot* foi prejudicada
2 com base na menor eficiência do fotossistema II nestas plantas. As disfunções no nível
3 fotoquímico causadas pela murcha foram maiores para as folhas da cultivar Gurguéia. Os
4 valores de F_v/F_m foram próximos de 0,80 para as folhas infectadas de plantas dos genótipos
5 resistentes Miranda IPA 207 e, principalmente, MNCO1 sugerindo a ausência de fotoinibição
6 crônica à fotossíntese. Sabe-se que valores maiores de F_v/F_m indicam uma melhor capacidade
7 de fotoproteção das plantas infectadas devido à redução do dano fotooxidativo (Rolfe e Scholes
8 2010). Similar aos valores de F_v/F_m observados nas folhas das cultivares resistentes. De fato,
9 estas plantas sofreram menor perda de pigmentos fotossintéticos, especialmente clorofilas *a* e
10 *b*. Estes resultados indicam que o desempenho fotoquímico das plantas da cultivar Miranda IPA
11 207 e MNCO1, foram preservados mesmo após a infecção de *Fot*. Contribuindo para este efeito,
12 os níveis de carotenoides nestas plantas foram maiores refletindo em uma maior capacidade
13 destas plantas infectadas em regular seus mecanismos de fotoproteção (Rolfe e Scholes 2010),
14 resultando em menor dano fotooxidativo às folhas infectadas. O menor nível de perturbação
15 fotoquímico para folhas infectadas sugere uma maior oferta de ATP e, conseqüentemente,
16 maior poder de assimilação de CO₂ (Rolfe e Scholes 2010). A maior assimilação também foi
17 otimizada devido a manutenção da área foliar nestas plantas, permitindo a maior interceptação
18 de luz solar. A otimização de todos estes parâmetros fisiológicos nas plantas resistentes permitiu
19 a maior efetividade fotossintética e contribuíram para um maior vigor vegetativo destas plantas,
20 como verificado pela maior altura de plantas e diâmetro de caule.

21 As EROs desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra o ataque
22 de patógenos (Doke et al. 1996). Objetivando prevenir o dano celular induzido por EROs, as
23 plantas possuem uma ampla gama de mecanismos antioxidantes para regular o equilíbrio entre
24 sua produção e eliminação durante a infecção por patógenos de diferentes estilos de vida (Del
25 Río 2015). No presente estudo, folhas e, principalmente, as raízes infectadas de plantas de

1 feijão-caupi resistentes foram menos propensas a EROs em comparação as folhas da cultivar
2 suscetível. A SOD atua como a primeira linha de defesa contra ROS por dismutar O_2^- em H_2O_2
3 (Apel e Hirt 2004). A atividade da SOD aumentou nas folhas e raízes à medida que os sintomas
4 da murcha se desenvolveram (15 DAI), enquanto nas folhas das plantas não inoculadas sua
5 atividade se manteve menor ao longo do tempo avaliado. Além disso, a atividade da SOD
6 aumentou em menor magnitude nas folhas e raízes da cultivar suscetível, sugerindo a ocorrência
7 de menor concentração de O_2^- . Segundo Govrin e Levine (2000), as EROs podem beneficiar
8 alguns patógenos devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes nos sítios de infecção que
9 maximiza a colonização do tecido hospedeiro. A homeostase do H_2O_2 nas células vegetais é
10 mantida pelas enzimas CAT, APX, e POX na tentativa de remover as ROS geradas em resposta
11 ao ataque de patógenos (Magbanua et al. 2007). No presente estudo, folhas infectadas de plantas
12 resistentes Miranda IPA 207 e MNCO1 apresentaram aumentos proeminentes nas atividades
13 de CAT, APX, e POX em comparação as folhas oriundas de plantas suscetíveis.
14 Hipoteticamente, nestas plantas suscetíveis ocorreram um aumento na concentração de H_2O_2
15 em seus tecidos gerando uma perda do controle celular sobre os processos oxidativos nos sítios
16 de infecção, o que resultou em sintomas mais severos de murcha.

17 No presente estudo, a atividade da FAL aumentou em raízes das cultivares resistentes,
18 indicando a importância da via dos fenilpropanóides na resistência do feijão-caupi à murcha. A
19 alta atividade da FAL nestes genótipos foi observada nos estágios intermediários de infecção
20 fúngica. Aqui, a alta atividade da FAL foi de grande importância para a resistência, pois
21 converte a L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que é o precursor de vários fenólicos e
22 flavonóides com ação antimicrobiana (Dixon et al. 2002; Hao et al. 2011; Borges et al. 2012).
23 A FAL também é uma enzima chave para a biossíntese de ácido salicílico que está envolvida
24 na resistência sistêmica adquirida em plantas (Gruner et al. 2013; Malamy et al. 2014). Nossos
25 resultados são consistentes com relatos anteriores mostrando a importância do FAL para a

1 resistência de várias culturas a patógenos de diferentes estilos de vida (Sana et al. 2010; Giberti
2 et al. 2012; Gupta et al. 2012; Li et al. 2013; Zhang et al. 2013; Kim e Hwang 2014; Riaz et al.
3 2014; Bhat et al. 2014; Tatagiba et al. 2016). No presente estudo, pode-se sugerir que alta
4 atividade de FAL nas raízes dos genótipos resistentes resultou em maior produção de compostos
5 fenólicos e lignina, o que pode ter retardado o estabelecimento do patógeno. Sabe-se que a
6 deposição de lignina pode reforçar a parede celular vegetal proporcionando uma barreira
7 estrutural para retardar ou evitar a colonização de patógenos e o crescimento de patógenos pode
8 ser inibido por precursores fenólicos de lignina (Venere 1980; Ride 1983; Reimers e Leach
9 1991; Naoumkina et al. 2010). Além disso, a ligação covalente da lignina a polissacarídeos e
10 hemiceluloses na parede celular aumenta sua resistência mecânica, o que pode afetar a difusão
11 de enzimas hidrolíticas e toxinas não seletivas ao hospedeiro liberadas por patógenos durante o
12 processo de infecção (Chabannes et al. 2001).

13 Em conclusão, os resultados do presente estudo indicaram que a colonização de tecidos
14 radiculares de feijão-caupi por *Fot* foi reduzida nos genótipos Miranda IPA 207 e,
15 principalmente, MNOCO1 devido ao menor estresse oxidativo e maior atividade da FAL.
16 Conseqüentemente, menores danos radiculares permitiram a preservação do processo
17 fotossintético e, conseqüentemente, um maior desenvolvimento dessas plantas.

18

19

20

21 **6. AGRADECIMENTOS**

22 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da
23 bolsa de Doutorado. Ao Dr Antônio Félix da Costa pesquisador do Instituto Agrônomo de
24 Pernambuco (IPA), pelo fornecimento das sementes dos genótipos de feijão. À CLIFIPE-

1 UFRPE (apoio da FACEPE APQ-0519-5.01/19) pela disponibilidade dos equipamentos para
2 realização dos testes bioquímicos.

3 **7. REFERENCIAS**

4 Anderson MD, prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase,
5 peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize
6 seedlings. *Plant Physiology* 109: 1247-1257

7 Andrade LA (2013) Plantas Invasoras: espécies vegetais exóticas invasoras da caatinga e
8 ecossistema associados 1ª Ed. Areia: UFPB/CCA

9 Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal
10 transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399

11 Armstrong GM, Armstrong JK (1980) Cowpea wilt *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum*
12 race I from Nigeria. *Plant Disease* 64:954–955

13 Assunção IP, Michereff SJ, Mizubuti ESG, Brommonschenkel SH (2003b) Influência da
14 intensidade da murcha-de-fusário no rendimento do caupi. *Fitopatologia Brasileira* 28:615–619.

15 Baker NR, Oxborough K, Lawson T, Morison JI (2001) High resolution imaging of
16 photosynthetic activities of tissues, cell and chloroplast in leaves. *Journal of Experimental*
17 *Botany* 52: 615-621

18 Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A, Bergerv RD (2002) Gas exchange and emission
19 of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on
20 bean leaves as a function of their trophic characteristics. *Journal Phytopathol* 150: 37-47

21 Bastiaans L, Kropff MJ (1993) Effects of leaf blast on photosynthesis of rice. 2. Canopy
22 photosynthesis *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99: 205-217

- 1 Bhat WW, Razdan S, Rana S (2014) A phenylalanine ammonia lyase ortholog (PkPAL1) from
2 *Picrorhiza kurrooa* Royle ex. Benth: molecular cloning, promoter analysis and response to
3 biotic and abiotic elicitors. *Gene* 547: 245–256
- 4 Borges A, Melotto M, Tsai SM, Caldas DGG (2012) Changes in spatial and temporal gene
5 expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen.
6 *Journal Plant Physiological* 169: 1216–1220
- 7 Bradford MN (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities
8 of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
- 9 Cakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance
10 activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean
11 leaves. *Plant Physiology* 98: 1222-1227
- 12 Chabannes M, Ruel K, Yoshinaga A (2001) In situ analysis of lignins in transgenic tobacco
13 reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin
14 deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant Journal* 28: 271–282
- 15 Chan B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2:
16 764-775
- 17 Chathuni J, Rizliya V, Afka D, Ruksheela B, Barana C J, Srinivas N, Ruvini L (2018) Cowpea:
18 an overview on its nutritional facts and health benef. *Journal of the Science of Food and*
19 *Agriculture* 13 :4793-4806
- 20 CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra
21 Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/22, n. 10 décimo levantamento, Disponível
22 em: [https://](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos) <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.
23 Acesso em: 30 de julho de 2022

- 1 Davar R, Darvishzadeh R, Majd A (2013) Changes in antioxidant systems in wheat plants.
2 *Ecotoxicology Environ* 89: 150–157
- 3 Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant Defences under
4 Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with
5 Differential Sensitivity to Drought. *Plant and Cell Physiology* 34: 1023–1028
- 6 Del Río LA (2015) ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental*
7 *Botany* 66: 2827-2837
- 8 Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS, Wang L (2002) The phenylpropanoid
9 pathway and plant defense – a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371–390
- 10 Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park H-J, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K (1996) The
11 oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency
12 signal for plant biodefence - a review. *Gene* 179: 45-51
- 13 Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant*
14 *Physiology* 59: 309-314
- 15 Giberti S, Berteza CM, Narayana R (2012) Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are
16 involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*.
17 *Journal Plant Physiology* 169: 249–254
- 18 Gnanamangai BM, Ponmurugan P, Yazhini R, Pragadeesh SK (2011) PR enzyme activities of
19 *Cercospora theae* causing bird's eye spot disease in tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O.
20 kuntze). *Plant Pathology Journal* 10: 13–21
- 21 Gordon R Thomas (2017) *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. Annual
22 Review of Phytopathology, 55:23-39

- 1 Govrin EM, Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the
2 necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biology* 10: 751-757
- 3 Gruner K, Griebel T, Návarová H (2013) Reprogramming of plants during systemic acquired
4 resistance. *Front Plant Sci* 4: 1– 28
- 5 Guo Y, Liu L, Bi Y (2007) Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling
6 *Trichothecium roseum* postharvest rot in China cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *International*
7 *Journal of Food Science & Technology* 42: 1012–1018
- 8 Gupta SK, Rai AK, Kanwar SS (2012) The single functional blast resistance gene Pi54 activates
9 a complex defence mechanism in rice. *Journal of Experimental Botany* 2: 757–772
- 10 Hao Z, Wang L, He Y, Liang J, Tao R (2011) Expression of defense genes and activities of
11 antioxidant enzymes in rice resistance to rice stripe virus and small brown planthopper. *Plant*
12 *Physiol Biochem* 9: 744–751
- 13 Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice
14 leaf senescence. *Plant Physiol* 57: 315–319
- 15 Kim SD, Hwang BK (2014) An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase
16 gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial
17 pathogens *Journal of Experimental Botany* (65): 2295–2306
- 18 Leite ME, Santos JB, Ribeiro Junior PM, Souza DA, Castro LA, Resende MLV (2014)
19 Biochemical responses associated with common bean defence against *Sclerotinia sclerotiorum*.
20 *Eur J Plant Pathol* 138: 391–404
- 21 Li B, Liu B, Shan C (2013) Antibacterial activity of two chitosan solutions and their effect on
22 rice bacterial leaf blight and leaf streak. *Pest Management Science* 69: 312–320

- 1 Lozovaya VV, Lygin AV, Li S, Hartman GL, Widholm JM (2004) Biochemical response of
2 soybean roots to *Fusarium solani* f.sp. *glycines* infection. *Crop Sci* 44: 819–826
- 3 Magbanua ZV, De Moraes CM, Brooks TD, Williams WP, Luthe DS (2007) Is catalase activity
4 one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus* *Mol Plant-Microbe*
5 *Interact* 20: 697-706
- 6 Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (2014) Salicylic acid: a likely endogenous signal in
7 the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 80: 1002–1004
- 8 Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase
9 in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880
- 10 Naoumkina MA, Zhao Q, Gallego-giraldo L (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid
11 defence pathways. *Molecular Plant Pathology* 11: 829–846
- 12 Nascimento KJT, Araujo L, Resende RS, Schurt DA, Silva WL, Rodrigues FA (2016) Silicon,
13 acibenzolar-S-methyl and potassium phosphite in the control of brown spot in rice *Bragantia*.
14 *Plant Protection* 75: 212–221
- 15 NecheT K L, Halfeld-Vieira B A (2006) Caracterização de Isolados de *Rhizoctonia* spp.,
16 Associados à Mela do Feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), Coletados em Roraima. *Fitopatologia*
17 *Brasileira* 31:505-508
- 18 Nechet K.L, Halfeld-Vieira BA Doenças do feijão-caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa
19 Roraima, 2006. 16p. (Embrapa Roraima. CircularTécnica 2).
- 20 Noronha MA, Lopes CLRBP, Oliveira BMM, Ventura H P, Tôrres RJA, Michereff SJ, Silva
21 K.J D (2013) Resistência de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp.
22 *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* In: Congresso Nacional de Feijão-caupi,
23 Recife-PE, 3p.

- 1 Pastor-Corrales MA, Abawi GS (1987) Reactions of selected bean germplasms to infection by
2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Plant Disease 71:990-993.
- 3 Philips RD, McWatters KH, Chinnan MS, Hung Y, Beucha LR, Sefa-Dedeh S, Sakyi-Dawson
4 E, Ngoddy P, Nnanyelugo D, Enwere J, Komey NS, Liu K, Mensa-Wilmot Y, Nnanna IA,
5 Okeke C, Prinyawiwatkul W, FK Saalia FK (2003) Utilization of cowpeas for human food.
6 Field Crops Research 82:193-213.
- 7 Pottorff M, Wanamaker S, Ma YQ, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ (2012) Genetic and
8 Physical Mapping of Candidate Genes for Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp.
9 *Tracheiphilum* race 3 in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. PLoS one 7:1-12.
- 10 Reimers P, Leach JE (1991) Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
11 conferred by bacterial blight resistance gene *Xa-10* in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation
12 of a lignin like substance in host tissues. Physiological Molecular Plant Pathology 38: 39–55
- 13 Riaz A, Riaz A, Rattu AUR (2014) Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and peroxidase
14 activity in brown rust infected tissues of Pakistani wheat cultivars. Pak J Bot 46: 1101–1107.
- 15 Ride JP (1983) Cell walls and other structural barriers in defence. Biochem Plant Pathol
16 (Callow, JA, ed) 1: 215–236
- 17 Rios JA, Aucique-perez CE, Debona D, Neto CLBM, Rios VS, Rodrigues FA (2017) Changes
18 in leaf gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence and antioxidant metabolism within wheat
19 leaves infected by *Bipolaris sorokiniana*. Ann Appl Biol 170: 189-203
- 20 Rolfe SA, Scholes JD (2010) Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions.
21 Protoplasma 247: 163-175
- 22 Sahoo MR, Kole PC, Dasgupta M, Mukherjee A (2009) Changes in phenolics, polyphenol
23 oxidase and its isoenzyme patterns in relation to resistance in taro against *Phytophthora*
24 *colocasiae*. Journal of Phytopathology 157: 145–153

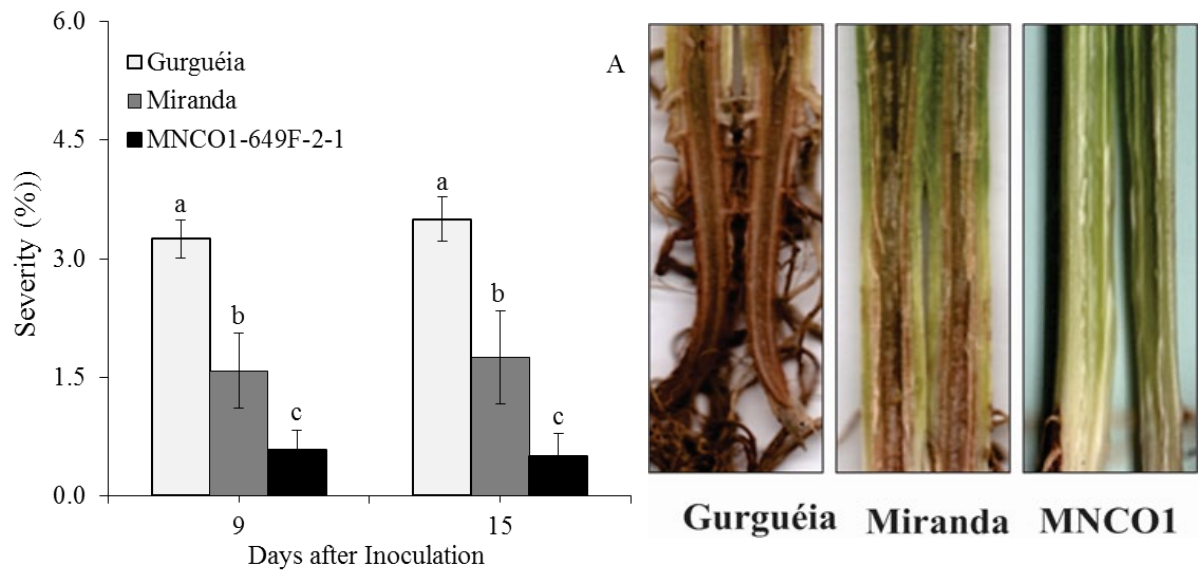
- 1 Sana TR, Fischer S, Wohlgemuth G, Katrekar A, Jung KH, Ronald PC, Fiehn O (2010)
2 Metabolomic and transcriptomic analysis of the rice response to the bacterial blight pathogen
3 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Metabolomics* (6) :451–465
- 4 Schoonhoven AV, Pastor-corrales MA (Eds.) (1987) Standard system for the evaluation of bean
5 germplasm. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropica 53p.
- 6 Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage,
7 and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*
8 2012: 1-26
- 9 Silva RCZ, Silva AC, Carvalho RM, Costa AF, Nicoli A, Rios JA (2021) Identification of
10 cowpea genotypes resistant to fusarium wilt. *Revista Caatinga* 34: 957-964
- 11 Souza CA, Figueiredo BP, Coelho CMM, Casa RT, Sang L (2013) Arquitetura de plantas e
12 produtividade da soja decorrente do uso de redutores de crescimento Biosciense. *Journal* (29)
13 634-643
- 14 Tatagiba SD, Rodrigues AF (2016) Magnesium decreases the symptoms of leaf scald on rice
15 leaves *Tropical Plant Pathology* 41: 132–137
- 16 Uarrota VG, Moresco R, Coelho B, Nunes EC, Peruch LAM, EO, Rocha M, Maraschin M
17 (2014) Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for
18 screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological
19 deterioration. *Food Chemistry* 161: 67–78
- 20 Veloso JS (2013) Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium*
21 *oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi. 43f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) -
22 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- 23 Venere RJ (1980) Role of peroxidase in cotton resistant to bacterial blight. *Plant Sci Lett* 20:
24 47–56

- 1 Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total
2 carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal
3 Plant Physiology 144: 307-313
- 4 Wu YX, Von Tiedemann A (2001) Physiological effects of azoxystrobin and epoxiconazole
5 on senescence and the oxidative status of wheat. Pesticid Biochemical Physiology 71:11-10
- 6 Xavier filha MS, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR (2011)
7 Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. Australasian. Plant Pathology 40:28-38
- 8 Zhang YJ, Zhang X, Chen CJ, Zhou MG, Wang HC (2010) Effects of fungicides JS399-19,
9 azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and
10 grain yield of winter wheat. Pesticide Biochemistry and Physiology 98:151–157
- 11 Zhang YL, Li DW, Gong ZH, Wang JE, Yin YX, Ji JJ (2013) Genetic determinants of the
12 defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with
13 *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythiaceae). Genetics Molecular Research 12: 3605–3621
- 14 Zhang Z, Li G, Gao H, Zhang L, Yang C, Liu P, Meng Q (2012) Characterization of
15 photosynthetic performance during senescence in stay-green and quick-leaf-senescence *Zea*
16 *mays* L. inbred lines. PLoS One 7: 42936
- 17 Zucker M (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic
18 acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiology 40: 779–784
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23

1 FIGURAS

2

3



4

5

6



7

8

9

10

Gurguéia

Miranda

MNCO1

11

12

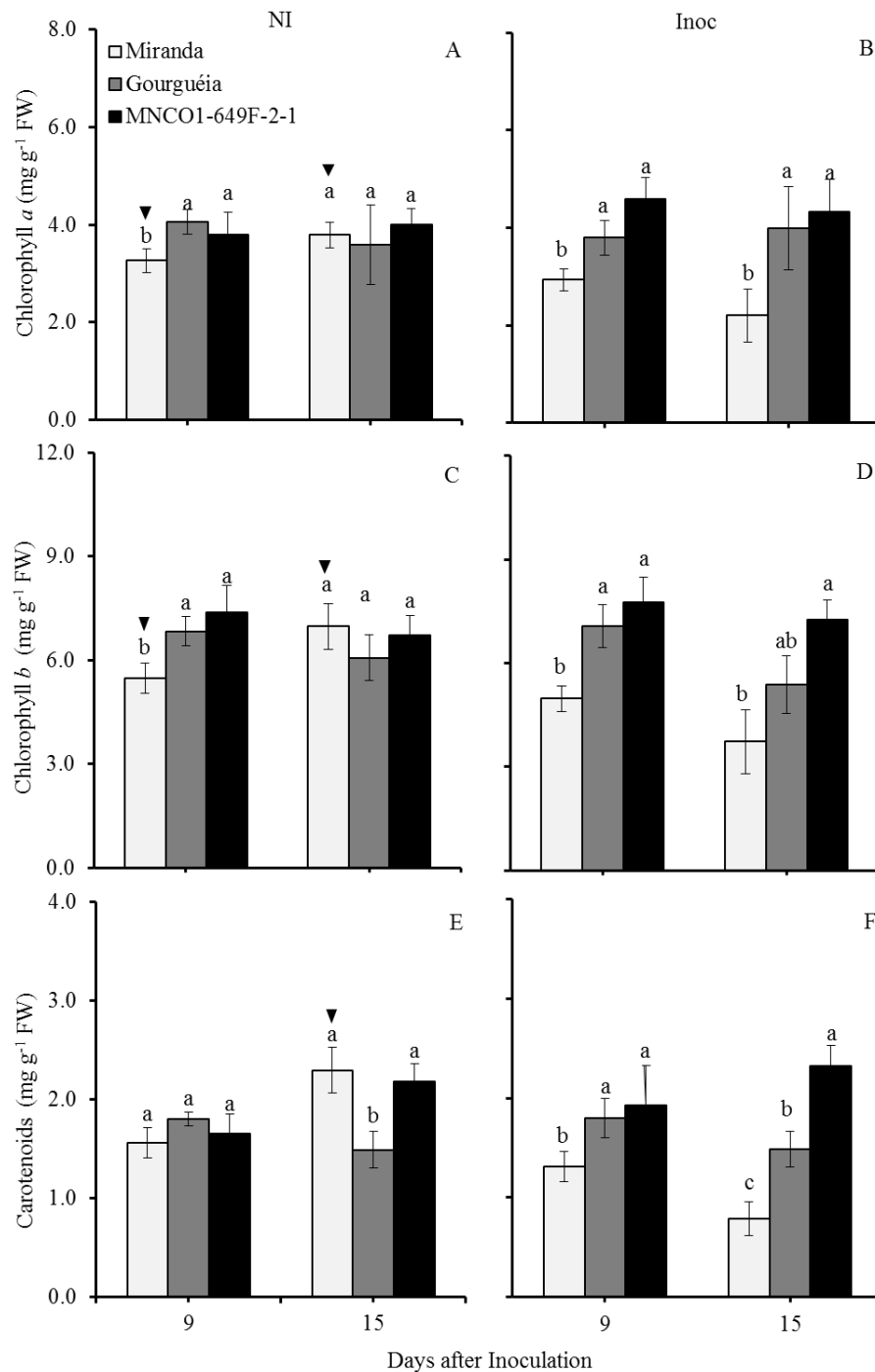
13

14

15

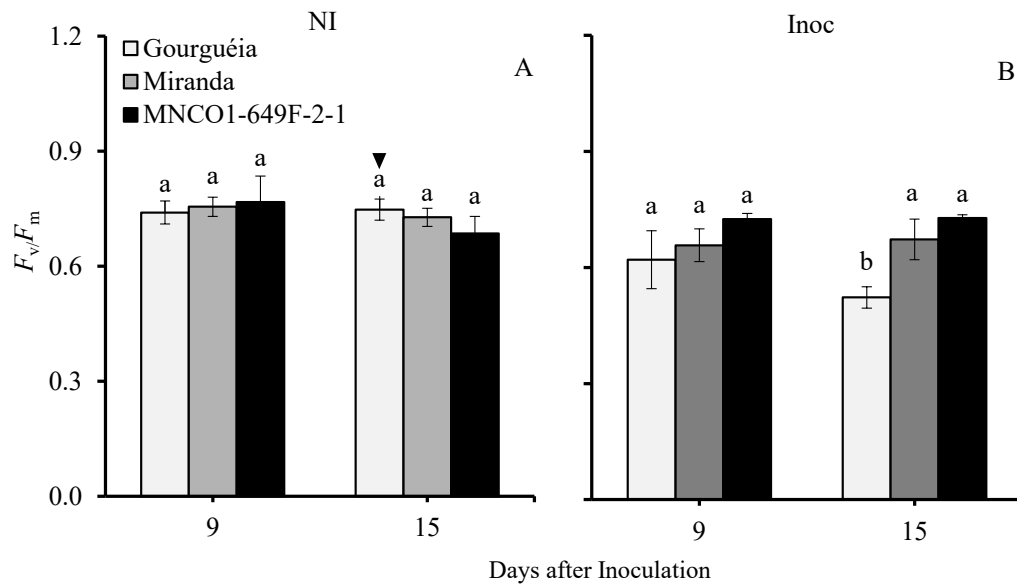
16

Figura 1. (A) Severidade da murcha de fusarium em feijão-caupi e sintomas da murcha no hipocótilo dos genótipos BR-17 Gurguéia, Miranda IPA 207 e MNCO1-649F-2-1 aos 15 dias após a inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. (B) Plantas de feijão-caupi não inoculadas e inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (indicada por setas pretas)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

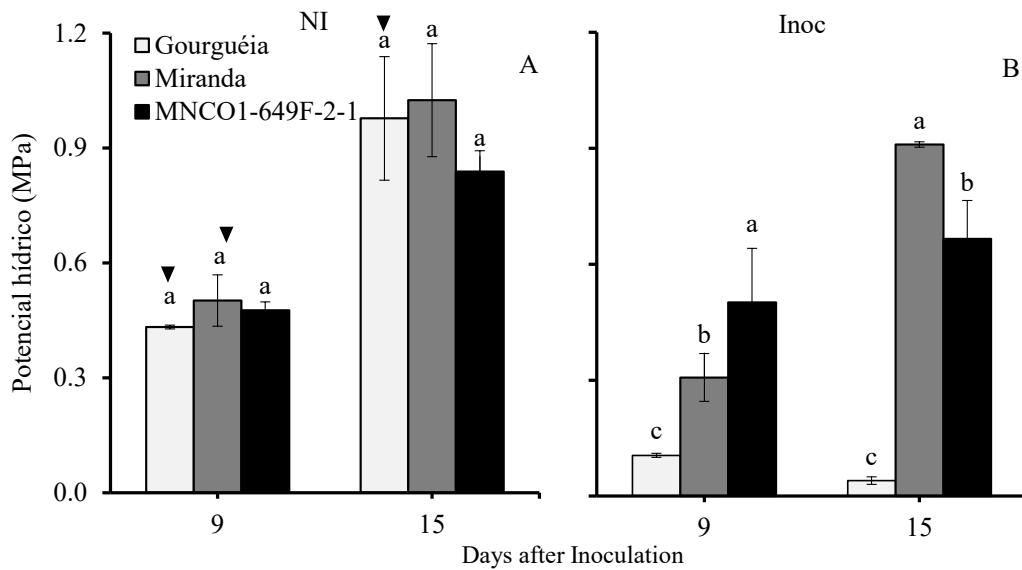
Figure 2. Concentração de clorofila (Chl) *a*, Chl *b* e carotenoides determinadas em folhas de genótipos de feijão-caupi (MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207). Plantas foram não inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. As médias dos tratamentos dos genótipos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de tukey. As médias dos tratamentos não inoculado e inoculado dentro de cada tempo de avaliação que são seguidos pelo símbolo (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste t. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$.



1
2

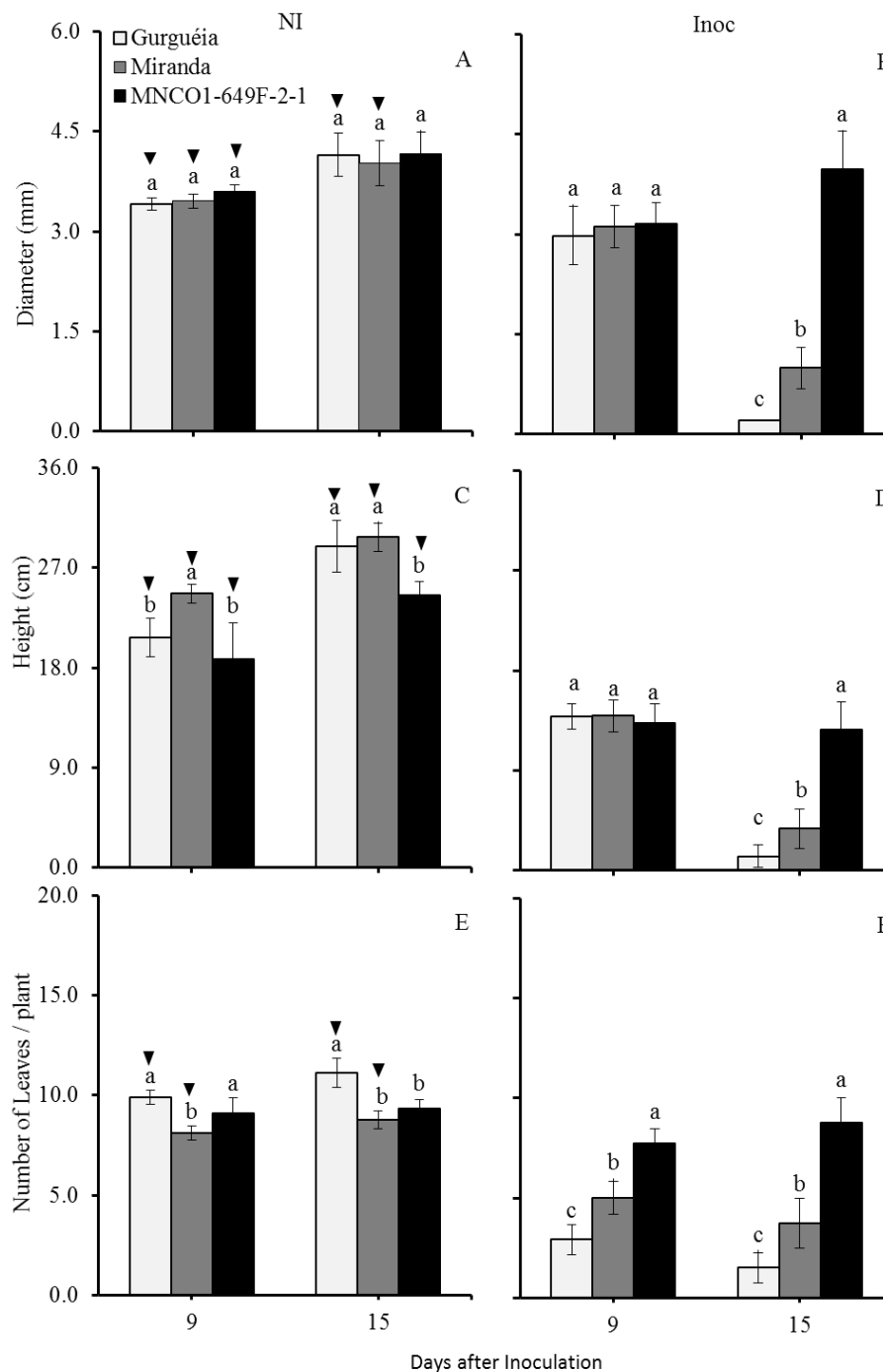
3 **Figure 3.** Valores de fluorescência (F_v/F_m) determinados em folhas de genótipos de feijão-
 4 caupi (MNC01-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207). Plantas foram não inoculados
 5 (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. As médias dos
 6 tratamentos dos genótipos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas de letras
 7 diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de tukey. As médias dos
 8 tratamentos não inoculado e inoculado dentro de cada tempo de avaliação que são seguidos
 9 pelo símbolo (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste t. As barras
 10 representam o desvio padrão das médias. $n = 5$.

11



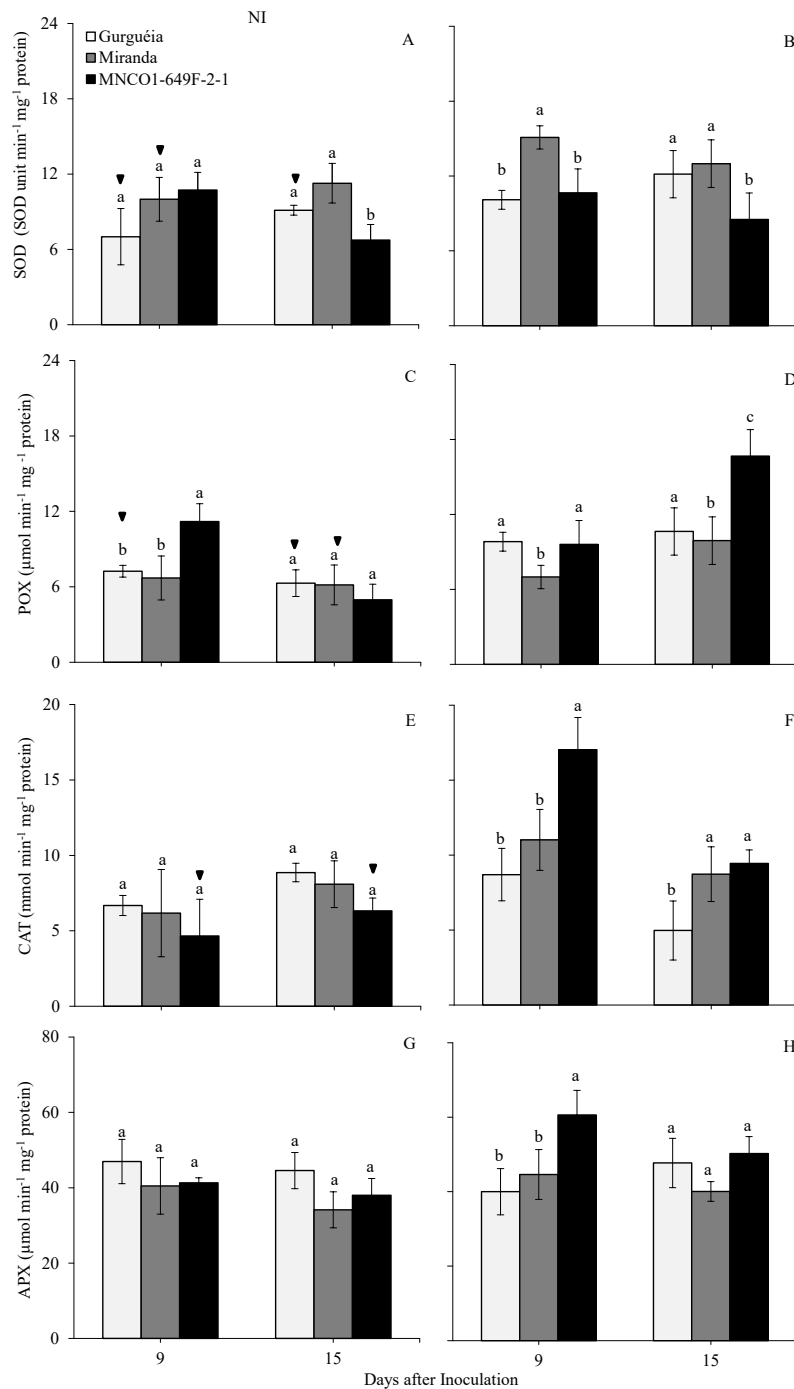
1
2 **Figura 4.** Potencial hídrico (Mpa) determinado em folhas de genótipos de feijão-caupi
3 (MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207)). Plantas foram não inoculados (NI)
4 ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. As médias dos tratamentos
5 dos genótipos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas de letras diferentes são
6 significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de tukey. As médias dos tratamentos não
7 inoculado e inoculado dentro de cada tempo de avaliação que são seguidos pelo símbolo (▼)
8 são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste t. As barras representam o desvio padrão
9 das médias. n = 5.

10
11



1
 2 **Figura 5.** Diâmetro do caule (A, B), Altura das plantas (C, D) e Número de folhas por planta
 3 (E, F) dos genótipos de feijão-caupi (MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207).
 4 Plantas foram não inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp.
 5 *tracheiphilum*. As médias dos tratamentos dos genótipos dentro de cada tempo de avaliação que
 6 são seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de tukey.
 7 As médias dos tratamentos não inoculado e inoculado dentro de cada tempo de avaliação que
 8 são seguidos pelo símbolo (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste t. As
 9 barras representam o desvio padrão das médias. n = 5.

1



2

3

Figura 6. Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A e B), peroxidase (POX) (C e D,

4

catalase (CAT) (E e F) e ascorbato peroxidase (APX) (G e H) determinadas a partir de folhas

5

de genótipos de feijão-caupi (MNCOI-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207) que não

6

foram inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *traheiphilum* foram

7

significativamente diferente ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. As médias dos tratamentos não

8

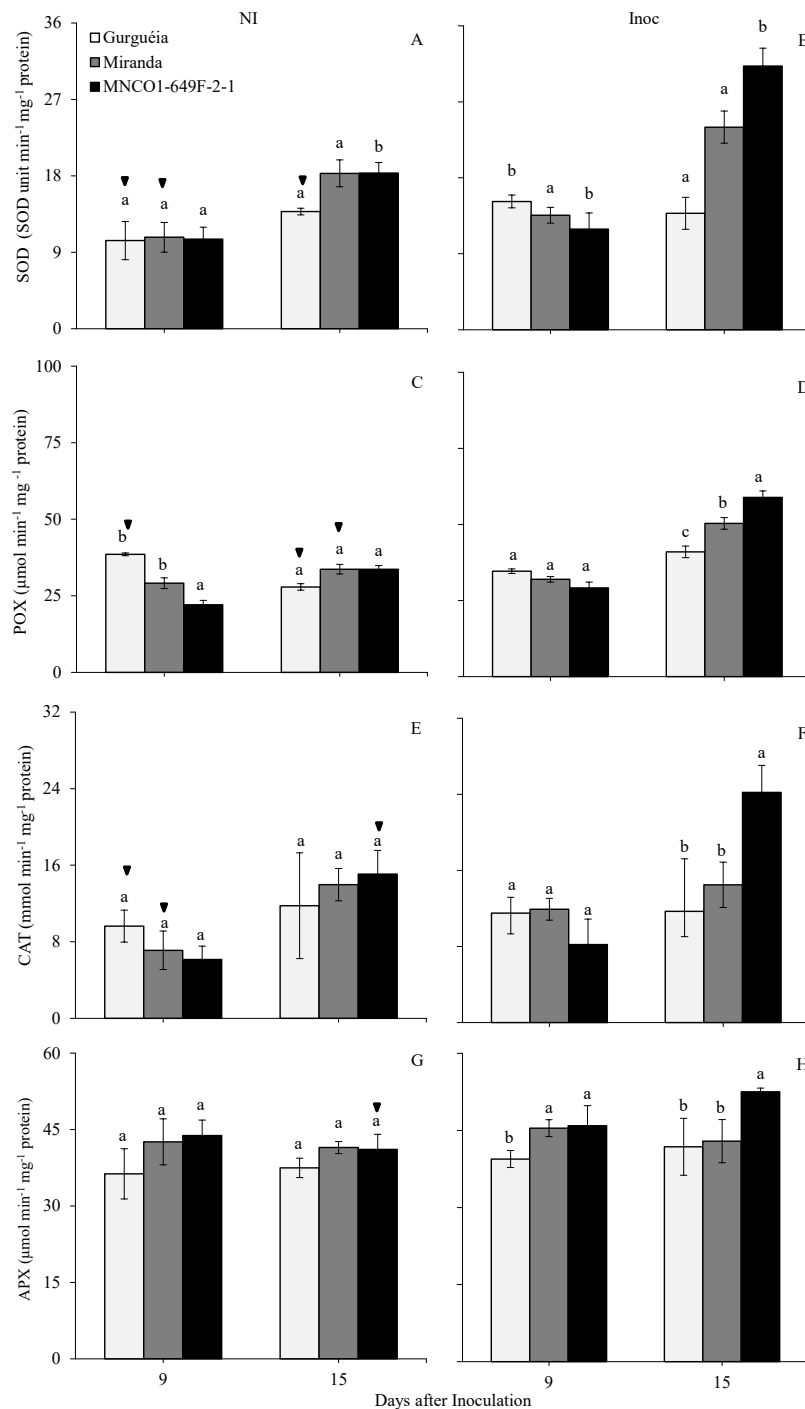
inoculados e inoculados dentro de cada tempo de avaliação que são seguidos pelo símbolo (▼)

9

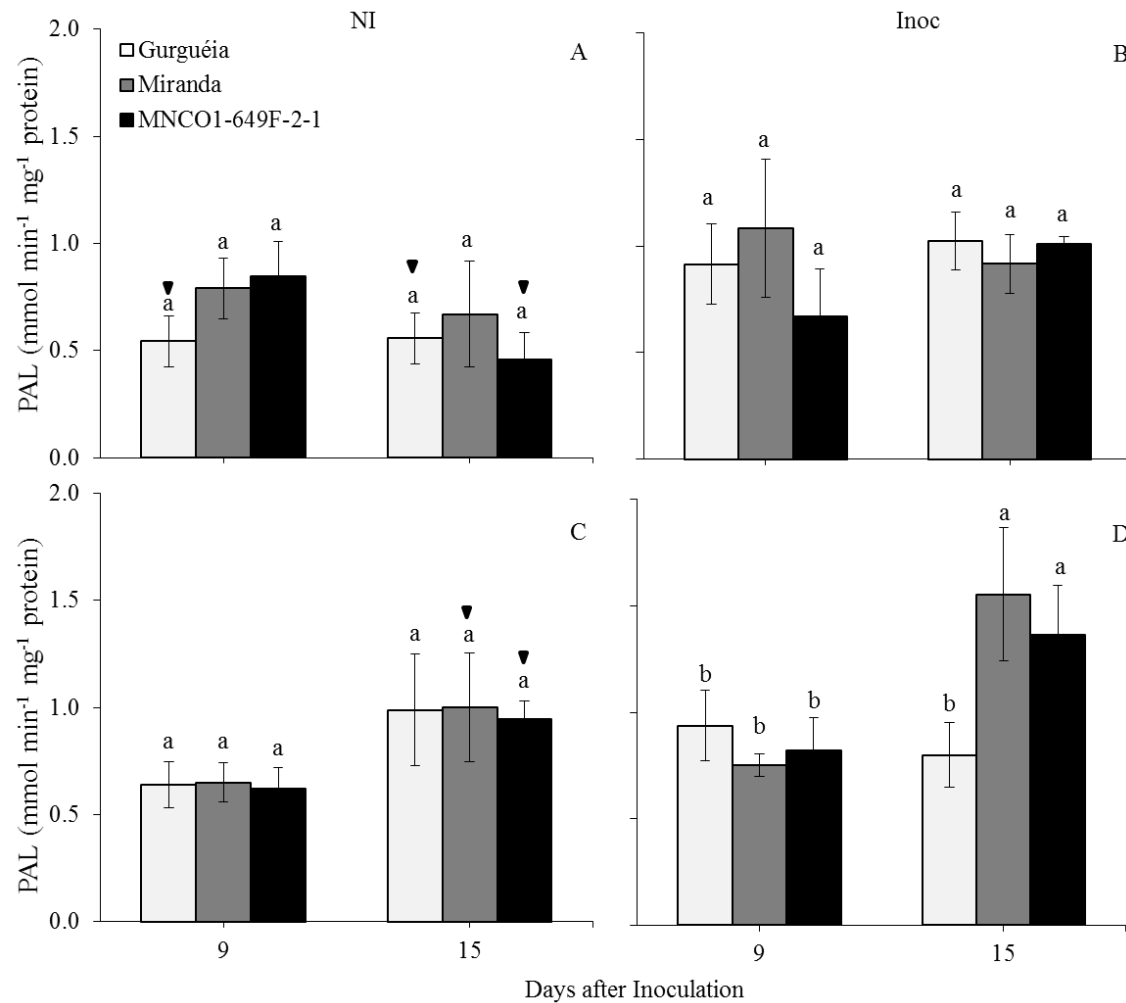
são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste t. As barras representam o desvio padrão

10

das médias. $n = 5$.



1
 2 **Figura 7.** Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A e B), peroxidase (POX) (C e D,
 3 catalase (CAT) (E e F) e ascorbato peroxidase (APX) (G e H) determinadas a partir de raízes
 4 de genótipos de feijão-caupi (MNC01-649F-2-1, Gurguéia e Miranda) que não foram
 5 inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *traheiphilum* foram
 6 significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. As médias dos tratamentos não
 7 inoculados e inoculados dentro de cada tempo de avaliação que são seguidos pelo símbolo (▼)
 8 são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste t. As barras representam o desvio padrão
 9 das médias. n = 5.



1
2 **Figura 8.** Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) em folhas de feijão-caupi (A, B) e
3 raízes de feijão-caupi (C, D) dos genótipos MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda
4 IPA207. Aqueles não foram inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f.
5 sp. *traheiphilum*. As médias dos tratamentos dos genótipos dentro de cada tempo de avaliação
6 que são seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de
7 tukey. As médias dos tratamentos não inoculado e inoculado dentro de cada tempo de avaliação
8 que são seguidos pelo símbolo (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste t. As
9 barras representam o desvio padrão das médias. n = 5

10
11
12
13
14
15
16
17
18

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

CAPITULO IV



Efeito de nanopartículas de cobre e prata sobre a murcha de *Fusarium* em feijão-caupi.

1 **Efeito de Nanopartículas de Cobre e Prata sobre a Murcha de Fusarium em Feijão-**
2 **Caupi**

3 **Risoneide de Cássia Zeferino Silva¹, Keyla Walescka Lopes da Silva¹, Walter Wagner**
4 **do Nascimento Carneiro¹, Adijailton José de Souza⁴, Maria Roselane Alves Oliveira¹,**
5 **Jonas Alberto Rios*^{1,3}**

6
7 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Fitopatologia.

8 ² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Solos.

9 ³ Universidade Federal de Vicosa, *Campus* Florestal, Florestal-MG.

10 ⁴ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, ESALQ-USP.

11 * Autor para correspondência:
12
13

1 RESUMO

2 A murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (Fot) é uma doença
3 considerada de grande importância para o feijão caupi, que afeta o rendimento e produtividade
4 desta cultura. No solo, *Fot* pode sobreviver inativo por longo período através de estruturas de
5 resistência. Considerando a dificuldade de se estabelecer medidas de controle para a murcha de
6 fusarium, este trabalho objetivou avaliar o efeito de Nanopartículas de Prata (AgNPs) e Cobre
7 (CuNPs) sobre essa doença. Primeiramente, testes *in vitro* foram realizados para verificar o
8 crescimento de *Fot* em placas de Petri com doses crescentes de ambas NPs. Posteriormente um
9 experimento *in vivo* foi instalado em casa de vegetação com delineamento inteiramente
10 casualizado em quatro repetições, sendo utilizadas a cultivar feijão-caupi BR17 Gurguéia. Os
11 tratamentos utilizados foram: água destilada (tratamento controle), Acibenzolar-S-Metil
12 (ASM), AgNPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$) e CuNPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$). Esses tratamentos foram aplicados pelos
13 métodos de inundação do solo na região próxima ao colo da planta ou pulverizando folhas. A
14 inoculação com *Fot* foi realizada 24 horas após a aplicação dos tratamentos utilizando a
15 concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} . Para o teste *in vitro*, os ajustes da regressão linear para
16 o índice de velocidade de crescimento micelial e o diâmetro da colônia de crescimento de *Fot*
17 em placas de Petri demonstraram uma redução dessas variáveis à medida que as doses de
18 CuNPs e AgNPs aumentaram. A severidade da doença foi reduzida em 65% em plantas tratadas
19 pelo método de inundação com CuNPs. Para o método de pulverização, houve uma redução
20 significativa para a severidade da ordem de 30, 28 e 72% para os tratamentos CuNPs, ASM e
21 AgNPs, respectivamente. Diante desses resultados, observou-se que as NPs apresentam
22 potencial para serem incluídas como uma das estratégias de manejo da murcha de fusarium,
23 sendo esta resposta dependente do método de aplicação utilizado.

24 **Palavras-chave:** Feijão-caupi, murcha de fusarium, nanotecnologia, atividade antifúngica

1 ABSTRACT

2 Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (Fot) is a disease considered
3 of great importance for cowpea, which affects the yield and productivity of this crop. On the
4 ground, Fot can survive inactive for long periods through resistance structures. Considering the
5 difficulty of establishing control measures for fusarium wilt, this study aimed to evaluate the
6 effect of Silver Nanoparticles (AgNPs) and Copper (CuNPs) on this disease. First, in vitro tests
7 were performed to verify the growth of Fot in Petri dishes with increasing doses of both NPs.
8 Subsequently, an in vivo experiment was carried out in a greenhouse with a completely
9 randomized design in four replications, using the cowpea cultivar BR17 Gurguéia. The
10 treatments used were: distilled water (control treatment), Acibenzolar-S-Methyl (ASM),
11 AgNPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$) and CuNPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$). These treatments were applied by soil flooding
12 methods in the region close to the plant collar or by spraying leaves. Inoculation with Fot was
13 performed 24 hours after application of treatments using a concentration of 1×10^6 conidia mL⁻¹.
14 1. For the in vitro test, the linear regression adjustments for the mycelial growth velocity index
15 and the diameter of the Fot colony growth in Petri dishes demonstrated a reduction of these
16 variables as the doses of CuNPs and AgNPs increased. Disease severity was reduced by 65%
17 in plants treated by the flooding method with CuNPs. For the spraying method, there was a
18 significant reduction for the severity of the order of 30, 28 and 72% for the treatments CuNPs,
19 ASM and AgNPs, respectively. In view of these results, it was observed that NPs have the
20 potential to be included as one of the management strategies of fusarium wilt, and this response
21 depends on the application method used.

22 **Keywords:** Cowpea, wilt, nanotechnology, antifungal activity

1. INTRODUÇÃO

A cultura do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é umas das espécies de leguminosas tradicionalmente cultivada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, e vem se expandindo cada vez mais para a região Centro-Oeste, principalmente durante a entressafra da soja (Zilli et al. 2011). A cultura representa grande importância em locais menos desenvolvidos, uma vez que ela representa uma atividade de subsistência, gerando emprego, renda e por ser uma excelente fonte de proteína e nutrientes essenciais (Santos et al. 2009; Vasconcelos et al. 2010). Apesar de o feijão-caupi ser uma planta rústica, que se adapta a diferentes condições edafoclimáticas, sua produção é afetada por diversas doenças, dentre elas a murcha de fusarium causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Fot) (E.F. Smith) Synder & Hasen. (Assunção et al. 2006). Este fungo sobrevive no solo na forma de clamidósporos, por vários anos mesmo na ausência de seu hospedeiro, o que lhe permite aguardar a renovação do desenvolvimento do novo ciclo do hospedeiro (Rejeki et al. 2014; Sampaio et al. 2020). Esta espécie possui todos os tipos de esporos, macroconídios, microconídios e clamidósporos. (Gordon 2017). A capacidade desse patógeno de sobreviver no solo dificulta seu controle, sendo o controle químico inviável e por apresentar alto risco a de contaminação ao meio ambiente, o manejo por meio de rotação de cultura tem efeito limitado devido a presença de estruturas de sobrevivência. Diante disso novas estratégias surgem para controle dessa doença (Santiago et al. 2017), a exemplo do uso de nanopartículas.

Uma das grandes inovações deste século é a nanotecnologia, podendo ser utilizada em diferentes ferramentas agrícolas como na produção de nanofertilizantes, nanocidas ou pesticidas encapsulados em nanopartículas para liberação lenta, além de nanosensores na agricultura de precisão (Furlaneto 2011). Nanotecnologia é a ciência envolvida na síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos cuja estrutura encontra-se em escala nanométricas com dimensões entre 1- 100 nm (Ferreira e Rangel 2009; Clark e Pazdernik

1 2016). As nanopartículas metálicas, têm sido cada vez mais exploradas. Os estudos apontam
2 que elas têm fortes características antifúngicas, e estão sendo amplamente desenvolvidas contra
3 fitopatógenos. Diversos autores têm comprovado a eficiência de NPs para controle de doenças
4 e pragas (Choudhury et al. 2010; Rai e Ingle 2012). As NPs de prata (AgNPs) são um dos
5 metais mais estudados na literatura (Frattini et al. 2005), por apresentar atividade
6 antimicrobiana e pela sua baixa toxicidade para os seres humanos (Edwards-Jones 2009;
7 Sintubin et al. 2012). Vários trabalhos prévios têm mostrado o potencial e impacto das AgNPs
8 contra *Cladosporium cladosporoides*, o *Aspergillus niger*, *Candida albicans* (Kim et al. 2009);
9 o *Rhizopus* sp., o *Aspergillus* sp. (Medda et al. 2015); *Bipolaris sorokiniana* (Shoemaker 1959)
10 e *Magnaporthe grisea* (Jo et al. 2009); *Fusarium culmorum* (Kasprowicz et al. 2013);
11 *Colletotrichum* spp. (Lamsal et al. 2011); *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinérea*, *Sclerotinia*
12 *sclerotiorum* (Krishnaraj et al. 2012); *Phytophthora* spp. (Ali et al. 2015). O Cobre é um
13 micronutriente essencial aos vegetais. Está envolvido em muitos processos fisiológicos, tais
14 como, respiração, fotossíntese, metabolismo da parede celular e lignificação (Dalcorso et al.
15 2014). O mecanismo de ação de Nps de cobre (CuNPs) ainda é pouco conhecido, o que se sabe
16 é que elas danificam a membrana celular do patógeno (Raffi et al. 2010; Deryabin et al. 2013;
17 Shende et al. 2015) e degradam o seu DNA (Rai et al. 2018). Assim como as AgNPs as CuNPs
18 são comprovadamente eficazes na proteção vegetal contra vários fungos fitopatogênicos, a
19 exemplo de *Phytophthora infestans* (Giannous et al. 2013), *Phoma destructiva*, *Curvularia*
20 *lunata*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*
21 e *Rhizoctonia solani* (Pariona et al. 2019).

22 Considerando a necessidade de se utilizar produtos alternativos para manejo da murcha
23 de fusárium, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação preventiva de
24 AgNPs e CuNPs sobre o desenvolvimento do fungo *Fot* em experimentos *in vitro*, bem como
25 no controle dos sintomas da murcha de fusarium em experimentos *in vivo*.

1 2. MATERIAL E MÉTODOS

2 2.1 Experimento *in vitro*

3 O experimento *in vitro* foi conduzido no laboratório de Interação Patógeno Hospedeiro
4 da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O ensaio foi realizado para examinar a
5 sensibilidade de *Fot* às crescentes doses de AgNPs e CuNPs. Em meio de cultivo de batata-
6 dextrose-ágar autoclavado, ainda fundente, foram adicionadas doses de AgNPs e CuNPs em
7 concentrações crescentes (1; 5; 10; 25; e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$). Posteriormente, a concentração de cada
8 tratamento foi ajustada e o meio vertido com um volume de 10 mL por placa de Petri. Em
9 seguida, um disco de BDA (8 mm de diâmetro) contendo micélio fúngico obtido da borda de
10 uma colônia de *Fot* com 10 dias de idade, foi colocado no centro das placas de Petri, que foram
11 mantidas em uma câmara de crescimento (25 °C e fotoperíodo de 12 h). A colônia do fungo em
12 cada placa de Petri foi medida para obter seu diâmetro em duas direções ortogonais às 48, 96,
13 144 horas após a repicagem do fungo usando um paquímetro digital. O experimento foi
14 instalado em delineamento inteiramente causalizado (DIC), com 10 repetições (placas) para
15 cada concentração das NPs. Como testemunha, foram utilizadas placas de Petri contendo BDA
16 sem nanopartículas. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado
17 segundo adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962):

$$18 \quad \text{IVCM} = (C1 / N1) + (C2 / N2) + \dots + (Cn / Nn)$$

19 Em que: C1, C2 e Cn = diâmetro da colônia na primeira, segunda e n-ésima avaliação; N1, N2,
20 Nn = número de dias após a instalação do ensaio.

21 2.2 Experimento *in vivo*

22 Os Experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Universidade Federal
23 Rural de Pernambuco, Recife-PE, localizado nas coordenadas geográficas 08° 00' 59,9'' S e
24 34° 56' 38,6'' W. Foi utilizado o genótipo BR-17 Gurguéia (padrão de suscetibilidade) (Silva
25 et al. 2021). Um total de 120 sementes foram semeados em copos plásticos contendo substrato

1 composto de uma mistura de 1: 1: 1 de casca de pinheiro, turfa e vermiculita expandida
2 ((Basaplant[®], Artur Nogueira, São Paulo, Brazil). O substrato em cada vaso foi fertilizado com
3 uma solução nutritiva contendo o seguinte em g L⁻¹: 6,4 KCl; 3,48 K₂SO₄; 5,01 MgSO₄.7H₂O;
4 2,03 (NH₂)₂CO; 0,009 NH₄MO₇O₂₄.4H₂O; 0,054 H₃BO₃; 0,222 ZnSO₄.7H₂O; 0,058
5 CuSO₄.5H₂O; 0,137 MnCl₂.4H₂O; 0,27 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 0,37 g L⁻¹ de EDTA bisódico
6 (Xavier filha et al. 2011). Um volume de 25 mL de solução nutritiva foi aplicado semanalmente
7 em cada vaso, após a emergência das mudas. O experimento foi conduzido até as plantas
8 apresentarem três pares de folhas desenvolvidas.

9 **2.2.1 Aplicação dos tratamentos e procedimentos de inoculação**

10 Os tratamentos utilizados nos experimentos foram: controle inoculado, AgNPs (5 µL L⁻¹
11 ¹, pH ajustado de 6,5), CuNPs (5 µL L⁻¹, pH ajustado de 6,5) e acibenzolar-S-metil (ASM) (25
12 g / ha, BION, Syngenta). Esses produtos foram aplicados 24 horas antes da inoculação das
13 plantas com a suspensão de *Fot*. Dois métodos de aplicação foram testados sendo: *i*)
14 pulverização foliar de todos os tratamentos usando um atomizador VL Airbrush (Paasche
15 Airbrush Co, Chicago, IL) ou *ii*) inundação utilizando uma pipeta onde foram colocados 500
16 microlitros em dois pontos no solo próximo ao caule da planta. Após um período de 24 horas
17 após aplicação dos tratamentos todas as plantas foram inoculadas utilizando a metodologia de
18 imersão de raízes em suspensão de conídios (Pastor-Corrales e Abawi 1987). A produção do
19 inóculo de *Fot* foi conduzida por meio do cultivo do isolado CMM-732, o qual foi obtido junto
20 à Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof.^a Maria Menezes” – CMM, da
21 Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esse isolado usado apresenta alto nível de
22 agressividade, sendo comprovado em estudos realizados anteriormente (Veloso 2013; Noronha
23 et al. 2013; Silva et al. 2021). Após a repicagem, o fungo foi cultivado por sete dias em placas
24 de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), e mantidas em câmara de
25 crescimento sob temperatura de 25 °C e luminosidade constante. No dia da inoculação, as placas
26 foram raspadas e a suspensão de conídios foi filtrada em gaze dupla e ajustada para 1x10⁶

1 conídios/mL⁻¹ com o auxílio da câmera de Neubauer.

2 **2.2.2 Avaliação da intensidade da doença**

3 A severidade da murcha de fusarium foi avaliada 15 dias após a inoculação com
4 patógeno nas plantas, com o auxílio de uma escala de notas adaptada de Schoonhoven e Pastor-
5 Corrales 1987, onde: 0 = planta sem sintomas externos; 1 = menos de 10% da folhagem com
6 clorose e/ou murcha; 2 = aproximadamente 25% de folhas com clorose e/ou murcha; 3 =
7 aproximadamente 50% das folhas e ramos com clorose e/ou murcha, com as plantas
8 manifestando nanismo; 4 = aproximadamente 75% ou mais das folhas e ramos com murcha,
9 nanismo severo e desfolha prematura, frequentemente resultando na morte da planta. O valor
10 médio das notas considerando as três repetições em cada genótipo foi utilizado para discriminar
11 os genótipos em classes de reação, sendo: 0 a 1,0 = resistente (R); 2,1 a 4,0 = suscetível (S).

12 A altura da planta, foi mensurada utilizando-se uma régua a partir do nível do solo até a
13 base da inserção do broto terminal e dada em centímetro, para cada tratamento foram medidas
14 quatro plantas.

15 **2.3 Análise Estatística**

16 Os experimentos foram realizados no delineamento inteiramente causalizado. Dentro de
17 cada período avaliado, as médias das doses de cada tratamento foram submetidas à análise de
18 regressão. Os experimentos *in vivo* foram realizados em casa de vegetação no esquema fatorial
19 (4 x 2) sendo o primeiro fator tratamentos (aplicação de AgNPs e CuNPs, ASM e água) e o
20 segundo fator métodos de aplicação (inundação e pulverização foliar) dos tratamentos. Cada
21 unidade experimental consistiu em um vaso de plástico contendo três plantas. Os dados de todas
22 as variáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Dentro de cada tempo de
23 amostragem, as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando teste de tukey ($P \leq 0,05$).
24 Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS (v. 6.12; SAS Institute,
25 Inc.)

1 3. RESULTADOS

2 3.1. Testes *in vitro*

3 Para todos os testes *in vitro*, os ajustes de regressão linear para o IVCM e diâmetro da
4 colônia de crescimento micelial de *Fot* demonstraram uma redução destes parâmetros à medida
5 que as doses (0, 1, 5, 10, 25 e 50 μL) de AgNPs e CuNPs aumentaram (Fig. 1). O crescimento
6 micelial, medido nas placas de Petri, permitiu quantificar o efeito das AgNPs e CuNPs sobre
7 *Fot*. Foi observada uma redução do IVCM de 84 e 87% nas doses de 5 e 10 μL de NPs de
8 Cobre, respectivamente comparado ao controle. Similarmente para o diâmetro micelial, esta
9 redução foi de 87 e 90% (Figura. 2A). Já para AgNPs o IVCM teve uma redução de 77, 86 e
10 86 % para as doses 1, 5 e 10 μL respectivamente, comparado ao controle. Similarmente para o
11 diâmetro micelial, esta redução foi de 76, 87 e 88% (Figura. 2B). A dose mais eficaz, que
12 resultou redução significativa do IVCM nas nanopartículas de cobre e prata foi 5 μL .

13 Para as análises estatísticas qualitativas dos parâmetros do teste *in vitro*, foram
14 selecionadas somente as doses de 5 μL de ambas as NPs. Assim, houve uma redução
15 significativa do IVCM de 84 e 86% para os tratamentos com AgNPs e CuNPs, respectivamente,
16 em comparação com o tratamento controle. Similarmente para o diâmetro micelial, esta redução
17 significativa foi de 87 e 87% (Figura. 3).

18 3.2 Experimentos *in vivo*

19 A intensidade da murcha de fusarium foi máxima nas folhas do tratamento controle
20 apresentando sintomas de clorose, amarelecimento e murcha das folhas (Figura 4 A, B), sendo
21 esses sintomas influenciados pelos tratamentos aplicados. A severidade da doença foi
22 significativamente reduzida em 65% em plantas tratadas pelo método de inundação com
23 CuNPs. Quando as plantas foram tratadas pelo método de pulverização, houve uma redução
24 significativa para a severidade de 30 e 28% para os tratamentos com CuNPs e ASM,
25 respectivamente. O efeito mais elevado para o tratamento pulverizado com AgNPs que reduziu

1 em 72% a severidade da doença (Figura 4C). Diante desses resultados, observou-se que os três
2 tratamentos testados influenciaram a severidade da doença para a cv. BR-17 Gurguéia, sendo
3 esta resposta dependente do método de aplicação.

4 A murcha de fusarium reduz o vigor vegetativo de plantas de feijão-caupi, sendo
5 observado um negativo desenvolvimento das plantas nos tratamentos controle. A altura de
6 plantas em todos os tratamentos foi significativamente maior que o controle a níveis superiores
7 a 90%, independentemente do método de inoculação utilizado (Figura 4D).

8 **4. DISCUSSÃO**

9 O manejo de doenças fúngicas em culturas alimentares é economicamente
10 importante. De modo recente, mais esforços têm sido feitos para desenvolver métodos de
11 manejo seguros que representem menos risco para humanos, animais e meio ambiente, e têm
12 se concentrado na superação de deficiências de fungicidas sintéticos. O presente estudo
13 apresenta informações importantes e inéditas no controle de murcha de fusarium em plantas de
14 feijão-caupi. Aqui, os testes *in vitro* demonstraram que as NPs apresentam um efeito indireto
15 sobre *Fot*, com menor desenvolvimento de colônias. Adicionalmente, a aplicação prévia em
16 plantas, principalmente, pelo método de inoculação reduziu a intensidade de murcha em folhas
17 das plantas. Essa mesma eficiência é relatada para outros patógenos como *B. sorokiniana* e
18 *Magnaporthe grisea* (Jo et al. 2009); *Fusarium culmorum* (Kasprowicz et al. 2010);
19 *Colletotrichum* spp. (Lamsal et al. 2011a), *Botrytis cinerea* (Krishnaraj et al. 2012) e
20 *Phytophthora* spp. (Ali et al. 2015). *Bipolaris oryzae* (Souza 2021) *Colletotrichum*
21 *lindemuthianum* (Siqueira et al. 2019), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Rodrigues et
22 al. 2006).

23 Para determinar a atividade antifúngica das AgNPs e CuNPs sobre *Fot* foram realizados
24 ensaios *in vitro* onde o crescimento micelial do fungo foi avaliado por meio de diferentes
25 variáveis. Os resultados encontrados neste estudo demonstram que ambas as NPs apresentam

1 efeitos inibitórios significativos ou atividade antifúngica durante a formação de colônias de *Fot.*
2 De fato, foi constatada uma inibição significativa do crescimento e do diâmetro fúngico a partir
3 da concentração de $5 \mu \text{L}^{-1}$ para CuNPs e de $1 \mu \text{mL}^{-1}$ para AgNPs. Outras pesquisas também
4 demonstraram que o uso de CuNPs inibiu o crescimento micelial de outros fitopatógenos
5 *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, e *Monilia fructicola* (Ouda et al 2014; Malandrakis et al.
6 2019). Similarmente, as AgNPs também inibiram o crescimento *in vitro* de *Fusarium solani*,
7 *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*,
8 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis Cinerea* *Curvularia lunata* e *Bipolaris oryzae* (Krishnaraj et al.
9 2012; Villamizar-Gallardo, Cruz e Ortíz-Rodrigues, 2016). Kim et al. (2009) testaram uma
10 maior concentração de diferentes formas de nanopartículas de prata e confirmaram um forte
11 efeito fungistático nas hifas fúngicas e na germinação de conídios de o patógeno do carvalho
12 *Raffaelea* sp. Assim com os resultados de Kim et al. (2009) os aqui apresentados mostraram
13 que os fungos reagem mesmo a concentrações muito baixas de nanopartículas de prata.

14 O mecanismo de ação das NPs_{Ag} não é completamente elucidado. Contudo, sua atuação
15 resulta em inibição do crescimento e perda da inefetividade, impossibilitando os processos que
16 ocorrem na superfície e no interior da célula dos microorganismos (Morones et al. 2005;
17 Sharma et al. 2009). Em fungos, o efeito de NPs de prata tem sido explanado e associado a
18 inibição da respiração celular, inativação de enzimas, distúrbios da função de proteínas e a
19 interação com o fósforo em moléculas de DNA levando ao comprometimento da replicação
20 celular (Prathna et al. 2011; Ocoy et al. 2013). Além disso, podem causar transformações
21 estruturais em hifas, deformações da parede celular, danos à membrana e alterações
22 morfológicas dos esporos durante a germinação (Lamsal et al. 2011; Villamizar-Gallardo, Cruz
23 e Ortíz-Rodrigues, 2016). Da mesma forma, NPs à base de cobre danificam a membrana
24 celular, alterando sua permeabilidade, causando assim lise e morte celular (Chatterjee et al.
25 2014; Yadav et al. 2017; Rai et al. 2018; Pariona et al. 2019). Outros estudos relatam que as

1 NPs de cobre podem interromper os processos bioquímicos e estruturais do fungo, associado à
2 inibição da expressão gênica de fatores de virulência no patógeno (Yadav et al. 2017; Chen et
3 al. 2019).

4 Os resultados do ensaio *in vivo* demonstraram que a aplicação preventiva de AgNPs,
5 CuNPs e ASM reduzem os sintomas da murcha de fusarium em BR-17 Gurguéia. Estudos
6 envolvendo NPs têm apresentado atividade antifúngica em trabalhos utilizando pulverização
7 prévia (Lamsal et al. 2011; Carvalho et al. 2019) ou após a inoculação do patógeno (Mishra et
8 al. 2014), tendo apresentado eficácia de controle variável de acordo com os patossistema.
9 Siqueira et al. (2019), estudando a eficiência do Bion em diferentes doses aplicadas previamente
10 em feijão infectados com *Colletotrichum lindemuthianum* URM 5771 observaram uma maior
11 redução da severidade dos sintomas na maior concentração. Resultados semelhante foi
12 encontrado por Rodrigues et al. (2006) ao estudar o efeito do Bion em cultivares de BR-17
13 Gurguéia e IPA-206, cultivares de caupi inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp.
14 *tracheiphilum*, relatado uma redução de 68,90% e 71,59% da doença respectivamente.

15 Nesta pesquisa, a prévia aplicação de NPs proporcionou nível de controle satisfatório à
16 murcha de fusarium, sendo este efeito possivelmente associado à presença residual das NPs nas
17 folhas que afetaram direta e negativamente o processo infeccioso de *Fot*. De forma adicional,
18 espera-se um efeito indireto quando a prévia aplicação de NPs de prata e cobre aumentariam as
19 respostas de defesa das plantas de feijão contra o patógeno. De acordo com Elmer et al. (2018)
20 nanopartículas de prata e cobre podem estar relacionadas com a ativação de respostas de defesa
21 da planta. Mudanças de café cultivar Mundo Novo 376/4 tratadas com nanopartículas de prata
22 e cobre proporcionaram maiores teores de lignina e compostos fenólicos reduzindo a infecção
23 de *Cercospora coffeicola*. (Carvalho et al. 2019). As nanopartículas de prata e cobre
24 apresentaram resultados promissores *in vitro* e *in vivo*, contudo a aplicação preventiva destas
25 são uma alternativa no controle da murcha de fusarium em feijão-caupi, no entanto devido ao

1 maior uso de AgNPs como agente antimicrobiano, mais pesquisas são necessárias para elucidar
2 a toxicidade bem como, o mecanismo exato de interação AgNPs com as células fúngicas. A
3 aplicação pelo método de pulverização apresentou melhores resultados no efeito sobre os
4 sintomas de murcha em relação ao método de inundação. Diante desse resultado, pode-se
5 hipotetizar um possível efeito de aumento das respostas no sistema radicular da planta, mesmo
6 com a aplicação de NPs sendo realizada na parte aérea. Para efeitos ambientais esta resposta se
7 torna importante uma vez que o efeito da aplicação direta do produto sobre a microbiota no solo
8 é desconhecido.

9 Contudo, o presente trabalho concluiu que o uso de NPs pode ser adotado como um
10 potencial estratégia de manejo contra patógenos. Novos estudos devem ser realizados para
11 determinar os mecanismos de defesa que são ativados em plantas de feijão-caupi infectadas por
12 Fot. Além disso, o uso de NPs deve ser estudado em relação aos seus efeitos ecológicos, sendo
13 importante determinar o efeito destas sobre a população microbiana no solo.

14

15

16

17 **5. AGRADECIMENTOS**

18 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da
19 bolsa de Doutorado. À Profa Thaís Ribeiro Santiago da, Universidade de Brasília (BSB), pelo
20 preparo e envio das Nanopartículas de cobre e prata. Ao Dr Antônio Félix da Costa pesquisador
21 do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pelo fornecimento das sementes dos genótipos
22 de feijão.

23

24

25

1 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 Ali GS, El Sayed AS, Patel JS, Green KB, Ali M, Brennan M, Norman D (2015) Ex vivo
3 application of secreted metabolites produced by soil-inhabiting *Bacillus* spp: efficiently
4 controls foliar diseases caused by *Alternaria* spp. Applied and Environmental Microbiology
5 82(2): 478-490
- 6 Assunção IP, Michereff SJ, Mizubuti ESG, Brommonschenkel SH (2006) Influence of
7 Fusarium wilt intensity on cowpea yield. Fitopatologia Brasileira 28: 615–619
- 8 Carvalho CA (2019) Uso de nanopartículas no controle da cercosporiose em mudas de caféiro
9 (*coffea arabica* l.) 41f.Dissertação(Mestrado em Fitopatologia) -Universidade Federal de
10 Lavras, Minas Gerais, Brasil.
- 11 Chatterjee AK, Chakraborty R, Basu T (2014) Mechanism of antibacterial activity of copper
12 nanoparticles. Nanotechnology 25(13): 135101
- 13 Chen H, Wu J, Wu M, Jia H (2019) Preparation and antibacterial activities of copper
14 nanoparticles encapsulated by carbon. New Carbon Mater 34(4): 382–389.
- 15 Choudhury SR, Nair KK, Kumar R, Gogoi R, Srivastava C, Gopal M, Subhramanyam BS,
16 Devakumar C, Goswami A (2010) Nanosulfur: a potent fungicide against food pathogen,
17 *Aspergillus niger*. AIP Conference Proceedings (1): 154-157
- 18 Clark DP, Pazdernik NJ (2016) Nanobiotechnology. Biotechnology p. 219–248
- 19 Dalcorso G, Manara A, Manara A, Piasentin S, Furini A (2014). Nutrient metal elements in
20 plants. Metallomics 10:1770-88
- 21 Deryabin DG, Aleshina ES, Vasilchenko AS, Deryabin TD, Efremova LV, Karimov IF,
22 Korolevskay LB (2013) Investigation of copper nanoparticles antibacterial mechanisms tested
23 by luminescent *Escherichia coli* strains. Nanotechnol. Russia 8: 402–408

- 1 Edwards-Jones V (2009) The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. Letters
2 in *Applied Microbiology* 49: 147–152
- 3 Elmer W, Ma C, White J (2018) Nanoparticles for plant disease management. *Current Opinion*
4 in *Environmental Science & Health*, 6: 66–70
- 5 Ferreira HS, Rangel MC (2009) Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em
6 catálise. *Quím. Nova* 32:1860-1870
- 7 Frattini A, Pellegrini N, Nicastro D, Sanctis OD (2005) Effect of amine groups in the synthesis
8 of Ag nanoparticles using aminosilanes. *Materials Chemistry and Physics* 94:148-152
- 9 Furlaneto FPB, (2011) Nanotecnologia no setor agropecuário. *Pesquisa & Tecnologia* 8:1-4
- 10 Giannousi K, Avramidis I, Dendrinou-Samara C (2013) Synthesis, characterization and
11 evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*.
12 *RSC Adv* 3:21743–21752
- 13 Gordon R Thomas (2017) *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. *Annual*
14 *Review of Phytopathology* 55:23-39
- 15 Jo YK, Kim BH, Jung G (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on
16 phytopathogenic fungi. *Plant Disease* 93(10): 1037-1043
- 17 Kasprowicz MJ, Gorczyca A, Frandsen RJ (2013) The effect of nanosilver on pigments
18 production by *Fusarium culmorum* (W.G.Sm) Sacc. *Polish Journal of Microbiology* 4: 365–
19 372
- 20 Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG (2009) Antifungal activity
21 and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals* 9: 235-242

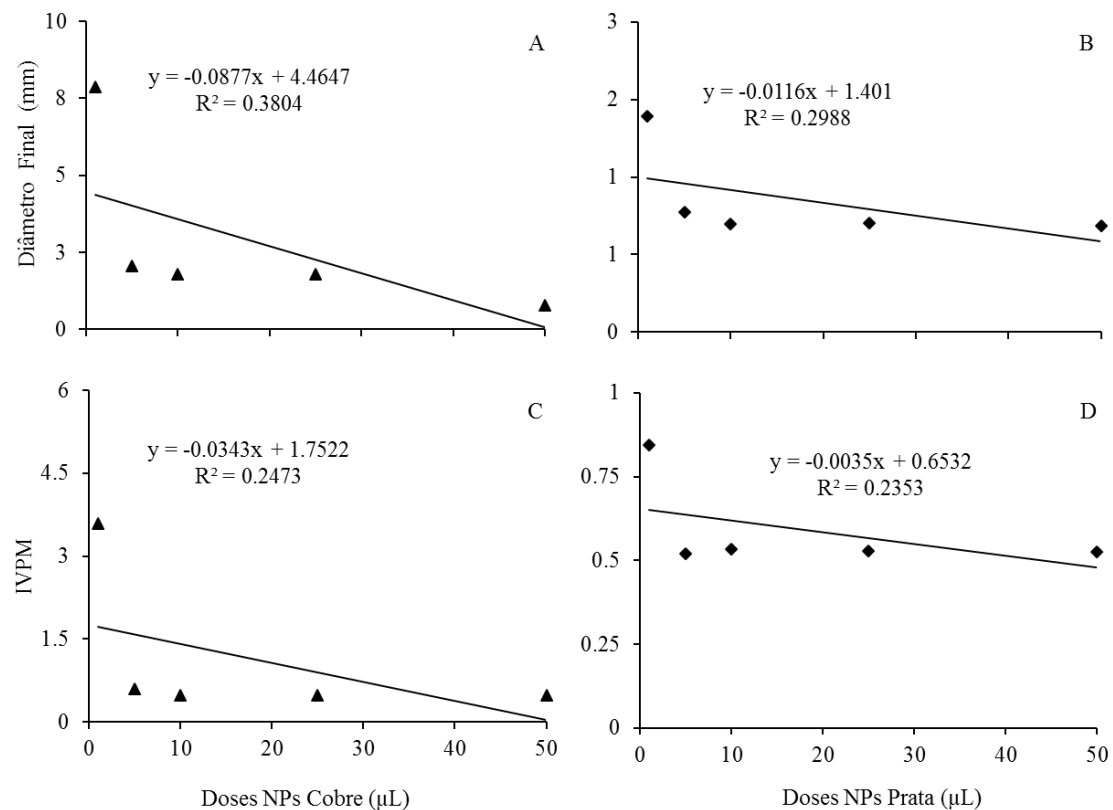
- 1 Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012)
2 Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant
3 growth metabolism. *Process Biochemistry* 47(4): 651-658.
- 4 Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim KS, Lee YS (2011a) Application of silver
5 nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species in vitro and pepper anthracnose disease
6 in field. *Mycobiology* 39:194–199
- 7 Maguire JD (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence
8 and vigor. *Crop Science* 2:176-77
- 9 Malandrakis AA, Kavroulakis N, Chrysikopoulos CV (2019) Use of copper, silver and zinc
10 nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens. *Science of the total environment*,
11 670: 292-299
- 12 Medda S, Hajra A, Dey U, Bose P, Mondal NK (2015) Biosynthesis of silver nanoparticles
13 from *Aloe vera* leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp.
14 *Applied Nanoscience* 5: 875-880
- 15 Mishra A, Kumari SM, Pandey V, Chaudhry KC, Guptay CS, Nautiyal (2014) Biocatalytic and
16 an-timicrobial activities of gold nanoparticles synthe-sized by *Trichoderma* sp. *Bioresource*
17 *Technol* 166: 235-242
- 18 Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez J T, Yacaman MJ (2005)
19 The Bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 2346
- 20 Noronha MA, Lopes CLRBP, Oliveira BMM, Ventura H P, Tôrres RJA, Michereff SJ, Silva
21 K.J D (2013) Resistência de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp.
22 *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* In: Congresso Nacional de Feijão-caupi,
23 Recife-PE, 3p.

- 1 Ocsoy I, Paret ML, Ocsoy MA, Kunwar S, Chen T, You M, Tan W (2013) Nanotechnology in
2 plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as na
3 antibacterial against *Xanthomonas perforans*. ACS Nano 10:8972–8980
- 4 Ouda Sahar M (2014) Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant
5 pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. Research Journal of Microbiology 9: 34
- 6 Pariona N, Mtz-Enriquez AI, Sánchez-Rangel D, Carrión G, Paraguay-Delgado FE, Rosas-
7 Saito G (2019) Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant
8 pathogens. RSC advances 9:18835-18843
- 9 Pastor-Corrales MA, Abawi GS (1987) Reactions of selected bean germplasms to infection by
10 *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Plant Disease 71:990-993
- 11 Prathna TC, Chandrasekaran N, Raichur AM, Mukherjee A (2011) Biomimetic synthesis of
12 silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of
13 particle size. Coll Surf B Biointerfaces 82: 152–159
- 14 Raffi M, Mehrwan S, Bhatti TM, Akhter JI, Hameed A, Yawar W, Ul Hasan MM (2010)
15 Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*.
16 Ann. Microbiol 60: 75–80
- 17 Rai M, Ingle A (2012) Role of nanotechnology in agriculture with special reference to
18 management of insect pests. Applied Microbiology and Biotechnology. 94: 287–293
- 19 Rai M, Ingle AP, Pandit R, Paralikar P, Shende S, Gupta I, DA Silva SS (2018) Copper and
20 copper nanoparticles: role in management of insect-pests and pathogenic microbes.
21 Nanotechnology Reviews 7: 303-315
- 22 Rejeki Siti Ferniah, Budi Setiadi Daryono, Rina Sri Kasiamdari and Achmadi Priyatmojo, 2014.
23 Characterization and Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* as the causal agent of Fusarium
24 Wilt in Chili (*Capsicum annuum* L.). Microbiology Indonesia 3: 121-126

- 1 Rodrigues AAC, Bezerra Neto E, Coelho RSB (2006) Indução de resistência a *Fusarium*
2 *oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade e
- 3 Sampaio AM, Araújo SS, Rubiales D, Patto MCV (2020) Fusarium Wilt Management in
4 Legume Crops Agronomy 10: 1073
- 5 Santiago ES, dos Santos JP, Cota LV, Guimaraes I, Guimaraes PDO, da Silva (2017) Incidência
6 de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em grãos de milho em fase experimental de
7 desenvolvimento. In: Seminário De Iniciação Científica Pibic/Bic Júnior. Sete Lagoas:
8 Embrapa Milho e Sorgo.
- 9 Santos JFdos, Grangeiro JIT, Brito CHde, Santos MdoCCA (2009) Produção e componentes
10 produtivos de variedades de feijão-caupi na microrregião Cariri paraibano. Engenharia
11 Ambiental 6: 214-222
- 12 Schoonhoven AV, Pastor-corrales MA (1987) Standard system for the evaluation of bean
13 germplasm. Cali: CIAT. 53P
- 14 Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their
15 antimicrobial activities. Advances in Colloid and Interface Science 145: 83–96.
- 16 Shende S, Ingle AP, Gade A, Rai M (2015) Green synthesis of copper nanoparticles by Citrus
17 medica Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. World J. Microbiol. Biotechnol 3:
18 865–873
- 19 Shoemaker RA (1959) Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated
20 from '*Helminthosporium*'. Canadian Journal of Botany 37(5): 879-887
- 21 Silva RCZ, Silva AC, Carvalho RM, Costa AF, Nicoli A, Rios JA (2021) Identification of
22 cowpea genotypes resistant to fusarium wilt. Revista Caatinga 34: 957-964

- 1 Sintubin L, Verstraete W, Boon N (2012) Biologically produced nanosilver: Current state and
2 future perspectives. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 2422–2436
- 3 Siqueira ITD, Cruz LR, Souza-Motta CM, Medeiros EV, Moreira KA (2019) Indução de
4 resistência por acibenzolar-S-metil em feijão-caupi no controle da antracnose. *Summa*
5 *Phytopathologica* 45 :76-82
- 6 Sousa CB, de Amorim EAF, Miranda RCM (2021) Antimicrobial activity in cultures of
7 endophytic fungi isolated from *Talinum triangulare*. *Acta Scientiarum. Biological*
8 *Sciences*, 43:49478
- 9 Vasconcelos IM, Maia FMM, Farias DF, Campello CC, Carvalho AFU, Moreira RA, Oliveira
10 JTA (2010) Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-
11 yielding cowpea cultivars. *Journal of food composition and analysis* 23:54-60
- 12 Veloso JS (2013) Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium*
13 *oxysporum* associados à murcha em feijão- caupi. 43f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) -
14 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- 15 Villamizar-Gallardo R, Cruz JFO, Ortiz-Rodriguez OO (2016) Fungicidal effect of silver
16 nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(12): 1929-1936
- 17 Xavier filha MS, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR (2011)
18 Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian. Plant Pathology* 40:28-38
- 19 Yadav L, Tripathi RM, Prasad R, Pudake RN, Mittal J (2017) Antibacterial activity of Cu
20 nanoparticles against *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Nano*
21 *Biomedicine and Engineering* 9(1): 9-14
- 22 Zilli JE, Silva Neto MS, França Júnior I, Perin L and Melo AR (2011) Resposta do feijão-caupi
23 à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. *Revista Brasileira de*
24 *Ciências do Solo* 35: 739-742

1 FIGURAS



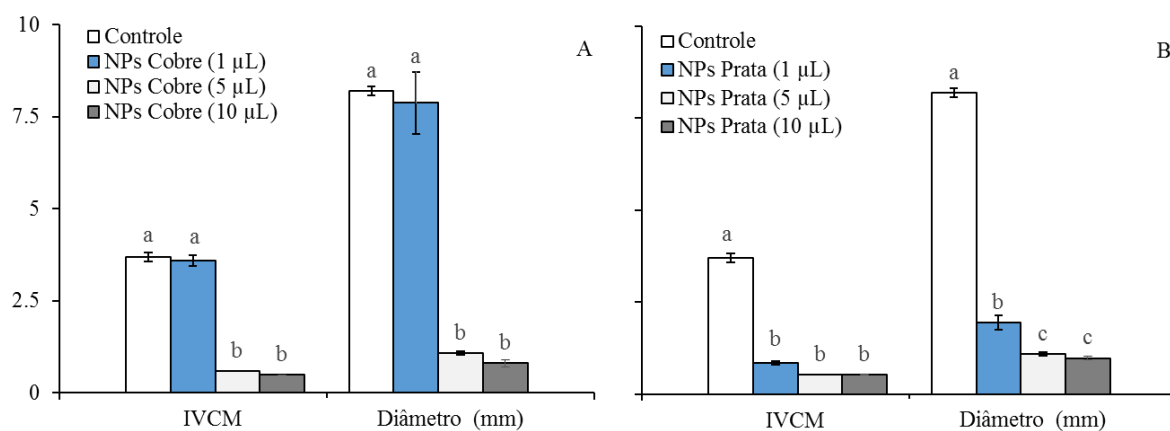
2

3 **Figura 1.** Análise de regressão linear do efeito das doses crescentes (1, 5, 10, 2 e 50 microlitros
 4 (μ)) das nanopartículas (NPs) de cobre (A, C) e NPs de prata (B, D) sobre o diâmetro micelial
 5 (cm) (A, B) e o índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) (C, D) de *Fot*

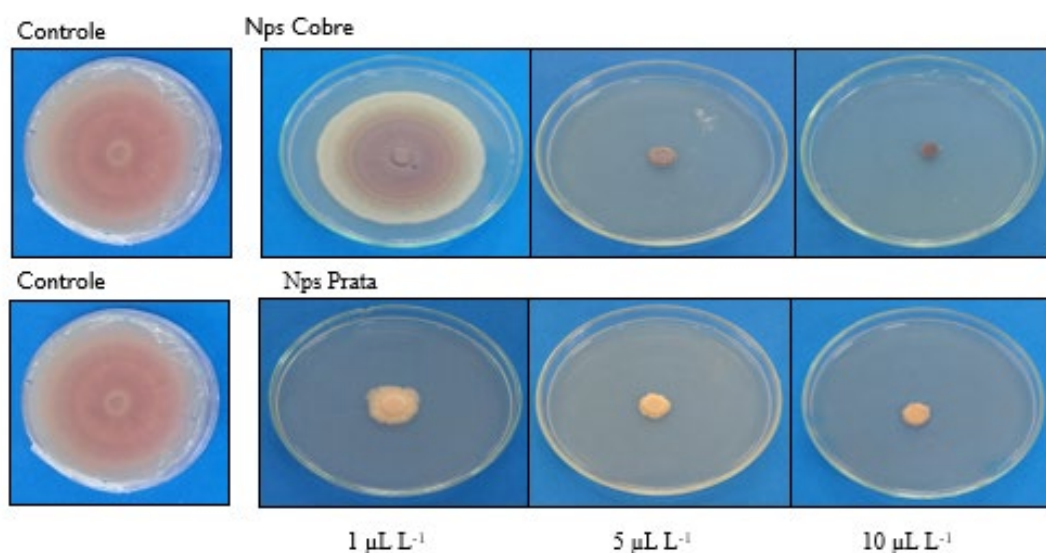
6

7

1



2



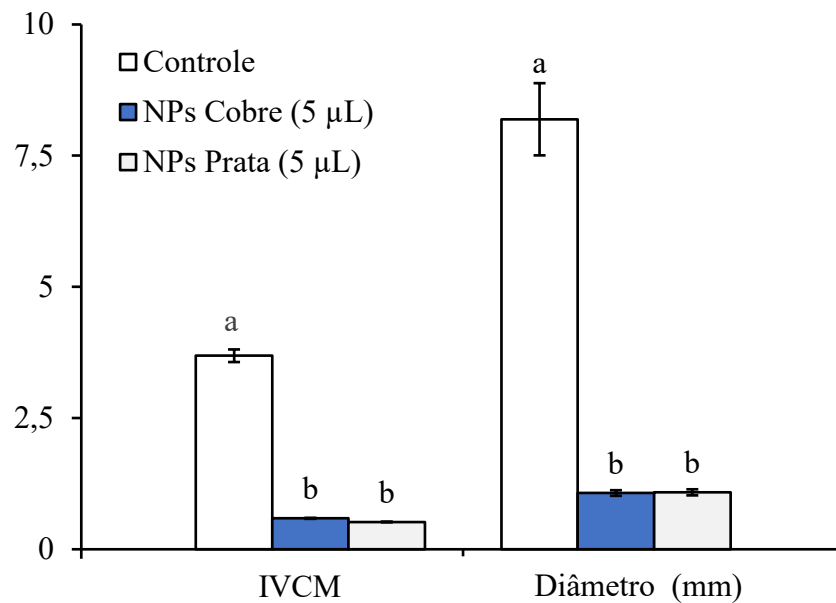
3

4 **Figura 2.** Efeito de Nanopartículas (NPs) de cobre (A) e NPs de prata (B) sobre o índice
5 velocidade de crescimento micelial (IVCM) e o diâmetro micelial (cm) de *Fot*. Para cada
6 variável, as médias de cada tratamento que são seguidas com letras diferentes são
7 significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras indicam os
8 desvios padrão das médias. n = 10.

9

10

11



1

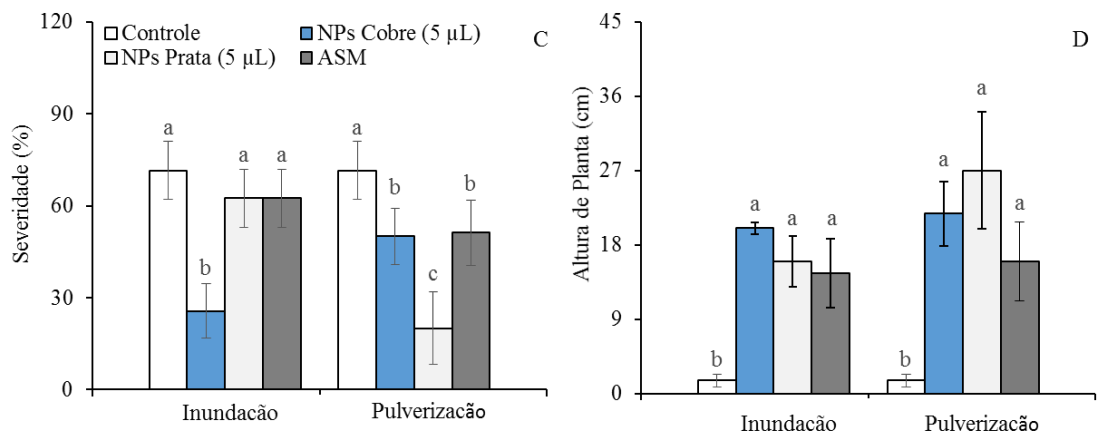
2 **Figura 3.** Efeito de Nanopartículas (NPs) de cobre (A) e NPs de prata (B) sobre o índice
3 velocidade de crescimento micelial (IVCM) e o diâmetro micelial (cm) de *Fot.* Para cada
4 variável, as médias de cada tratamento que são seguidas com letras diferentes são
5 significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras indicam os
6 desvios padrão das médias. $n = 10$.

7

1



2



3

4 **Figura 4.** (A, B) Sintomas de murcha de fusarium, (C) Severidade e (D) Altura em plantas de
 5 feijão-caupi do genótipo BR-17 Gurguéia previamente tratados com Nanopartículas (NPs) de
 6 Prata (A), NPs de cobre e Acibenzolar-S-Metil (ASM) (Bion). Todos os tratamentos foram
 7 aplicados na forma de Inundação (A) ou pulverização (B) às 24 horas antes da inoculação com
 8 *Fot*. As médias dos tratamentos marcados com letras diferentes são significativamente
 9 diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. Barras significam o desvio padrão da média.

CAPÍTULO V



CONCLUSÕES GERAIS

1 CONCLUSÕES GERAIS

- 2 • O genótipo de feijão-caupi Miranda IPA207 apresenta a herança genética da resistência
3 à *Fot* controlada por dois genes dominantes complementares, e pode ser recomendado
4 o retrocruzamento como método de melhoramento.
- 5 • A colonização de tecidos radiculares de feijão-caupi por *Fot* foi reduzida no genótipo
6 Miranda IPA 207 (resistente), e principalmente no genótipo, MNOCO1 (resistente)
7 devido ao menor estresse oxidativo e maior atividade da FAL. Consequentemente,
8 menores danos radiculares permitiram a preservação do processo fotossintético e,
9 consequentemente, um maior desenvolvimento dessas plantas.
- 10 • As nanopartículas de Cobre e Prata foram eficientes em reduzir o desenvolvimento de
11 *Fot in vitro* e os sintomas de murcha de fusarium nas plantas de caupi em casa de
12 vegetação.