

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a

Silva, Risoneide de Cássia Zeferino

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. - 2022.

109 f. : il.

Orientador: Jonas Alberto Rios.

Coorientador: Alessandro Nicoli.

Inclui referências e apêndice(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2022.

1. *Vigna unguiculata*, murcha de fusarium, herança genética, melhoramento de plantas, nanotecnologia.. 2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Vigna unguiculata*, Melhoramento Genético.. 3. Estresse biótico, enzimas oxidativas, fotossíntese, *Vigna unguiculata*.. I. Rios, Jonas Alberto, orient. II. Nicoli, Alessandro, coorient. III. Título



**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 (ARAUJO, 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 po 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 gloesporioides* (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 formas especiais dentre as quais destaca-se *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (LESLIE; SUMMERREL, 2006; MICHIELSE; 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 (TROISI; 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 ovóides, 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 sobreviver 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 Tvú 1990, Iron Tvú 1072 e Iron Tvú 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. (LAMSALE *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 homozigóticos, 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 (H_0) 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 (H_1) (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.; BRIOSO, 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: EDUFPRPE, 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 stress tolerance 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 benzotriazolazole 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.; SCHOLLES, 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. Physiologiactal 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

Herança da resistência do feijão-caupi à murcha de fusarium

Risoneide de Cássia Zeferino Silva¹, Keyla Walescka Lopes da Silva¹, Alessandro Nicoli², Walter Wagner do Nascimento Carneiro, Sérgio Rogério Alves de Santana⁴, Jonas Alberto Rios*^{1,3}

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

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

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

* Autor para correspondência:

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*, *Vigna unguiculata*, Genetic 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 Tvú 1990, Iron Tvú 1072 e Iron Tvú 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

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

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

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

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho experimental

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

2.2. Genótipos de Feijão-caupi

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

2.3. Ensaio de Cruzamento

Após a realização do cruzamento entre os parentais, as sementes F_1 foram obtidas e posteriormente semeadas dando origem às plantas F_1 que, por autofecundação originaram a população F_2 . Semanalmente, após a emergência das folhas primárias foram realizadas fertirrigações com solução nutritiva contendo $6,4 \text{ g L}^{-1}$ de KCl; $3,48 \text{ g L}^{-1}$ de K_2SO_4 ; $5,01 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $2,03 \text{ g L}^{-1}$ de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$; $0,009 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{NH}_4\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $0,054 \text{ g L}^{-1}$ de H_3BO_3 ; $0,222 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,058 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $0,137 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $0,27 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $0,37 \text{ g L}^{-1}$ de EDTA bisódico (Xavier Filha et al. 2011), sendo aplicado um volume de 50 mL de solução nutritiva por vaso.

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

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



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

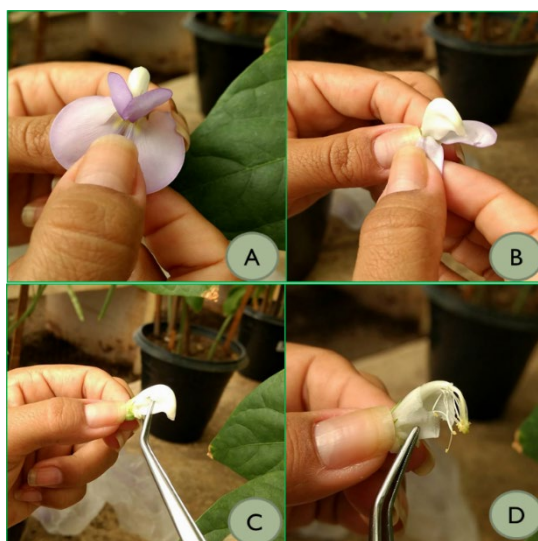


Figura 2. Preparação da flor masculina para emasculação A) remoção do estandarte; B) remoção das asas; C) remoção de parte da quilha; D) flor com estigma exposto recoberto de pólen.



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

2.4. Teste de resistência ao *Fot*

Após o cruzamento e obtenção das gerações F_1 e F_2 , as plantas das gerações parentais P_1 (Resistente), P_2 (suscetível), F_1 (híbridos) e F_2 (população segregante) foram inoculadas com o isolado CMM-732 de *Fot* (Figura 4) que apresenta alto nível de agressividade (Veloso 2013; Noronha et al. 2013; Silva et al. 2021). Esse isolado foi obtido junto à Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof.^a Maria Menezes” – CMM, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife- PE). Após a semeadura as plântulas com o primeiro par de folhas trifoliolada expandidas (aproximadamente 14 dias), foram inoculadas utilizando a metodologia de imersão de raiz em suspensão de conídios (Pastor-Corrales e Abawi 1987). As raízes das plantas de feijão-caupi foram cuidadosamente retiradas dos copos e lavadas com água até a retirada do substrato. Após o corte do terço final, a raiz foi imersa por cinco minutos em becker plástico com 200 mL de suspensão contendo 1×10^6 conídios/mL. Imediatamente após a inoculação, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3 dm³ de substrato previamente descrito. O controle consistiu em plantas com raízes cortadas e imersas em água destilada por cinco minutos.

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

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

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

3. RESULTADOS

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

4. DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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



1

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

CAPÍTULO III

9

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO FEIJÃO-CAUPI INFECTADOS****POR *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum***

12

13

14

15

16

17

18

19

20

Aspectos Bioquímicos e Fisiológicos do Feijão-Caupi Infectados por
Fusarium oxysporum f. sp. *tracheiphilum*

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

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

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

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

* Autor para correspondência:

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*) é 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*.

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 concentration of photosynthetic pigments), the activities of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD),) and phenylalanine ammonia lyase (FAL) activity in roots and leaves of susceptible plants (BR 17 Gurguéia) and resistant plants (Miranda IPA 207 and MNCO1-649F-2-1). 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 infected leaves and roots compared to uninoculated pairs, and the magnitude of increase was higher in resistant plants. For the roots of resistant plants, the activity of FAL was significantly higher compared to the roots of BR 17 Gurguéia. Based on the data of the present study, it can be concluded that photosynthesis was less impaired in resistant and Fot-infected plants. There was a greater effectiveness of the enzymes scavenging reactive oxygen species in the leaves and roots of resistant plants, suggesting a lower infection by Fot. Furthermore, wilt severity was reduced in the roots of resistant genotypes due to increased FAL activity.

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

2. INTRODUÇÃO

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

O excesso de radicais livres gerados durante a infecção por patógenos é nocivo às plantas, sendo importante a atuação do sistema 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). Plantas de trigo infectadas por *Bipolaris sorokiniana* apresentaram acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam estresse oxidativo, e aumentam as atividades de

enzimas antioxidantes (Rios et al. 2017). As ROS incluem radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH), bem como moléculas não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sharma et al. 2012). 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 ROS, retardando a senescência foliar e prolongando a duração da fotossíntese (Wu e 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 Chl a permitiram compreender as mudanças no potencial fotossintético em plantas infectas por patógenos (Baker et al. 2001; Rolfe et al. 2010).

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

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Implantação do experimento

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

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

3.2 Procedimento de inoculação

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

3.3 Avaliação da severidade da murcha

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

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

3.4 Avaliação do vigor vegetativo das plantas

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

3.5 Determinação da fluorescência

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

3.6 Pigmentos fotossintéticos

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

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

3.7 Potencial hídrico (ψ_w)

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

3.8 Análises bioquímicas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.9. Análise estatística dos Dados

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

4. RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

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

5. DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

6. AGRADECIMENTOS

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

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

7. REFERENCIAS

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

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

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

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

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

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

Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A, Bergerv RD (2002) 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* 150: 37-47

Bastiaans L, Kropff MJ (1993) Effects of leaf blast on photosynthesis of rice. 2. Canopy 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 Physiology* 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, Berteaux 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 Chine 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

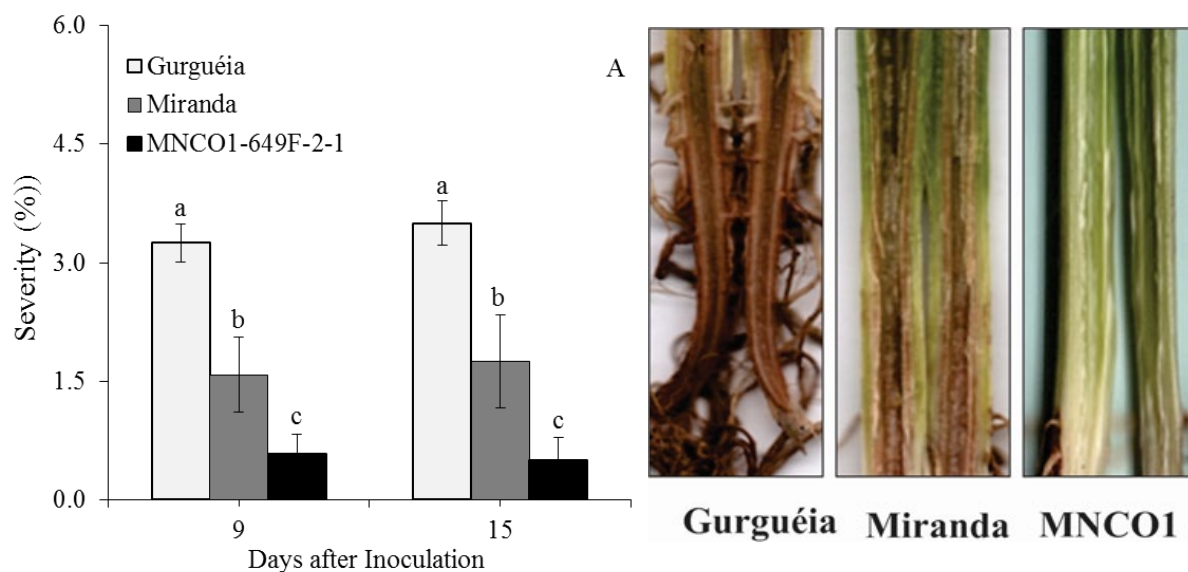
- 1 Lozovaya VV, Lygin AV, Li S, Hartman GL, Widholm JM (2004) Biochemical response of
2 soybean roots to *Fusarium solani* f.sp. *glycines* infection. Crop Sci 44: 819–826
- 3 Magbanua ZV, De Moraes CM, Brooks TD, Williams WP, Luthe DS (2007) Is catalase activity
4 one of the factors associated with 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

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

FIGURAS



Gurguéia

Miranda

MNCO1

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. *tracheophilum*. (B) Plantas de feijão-caupi não inoculadas e inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (indicada por setas pretas)

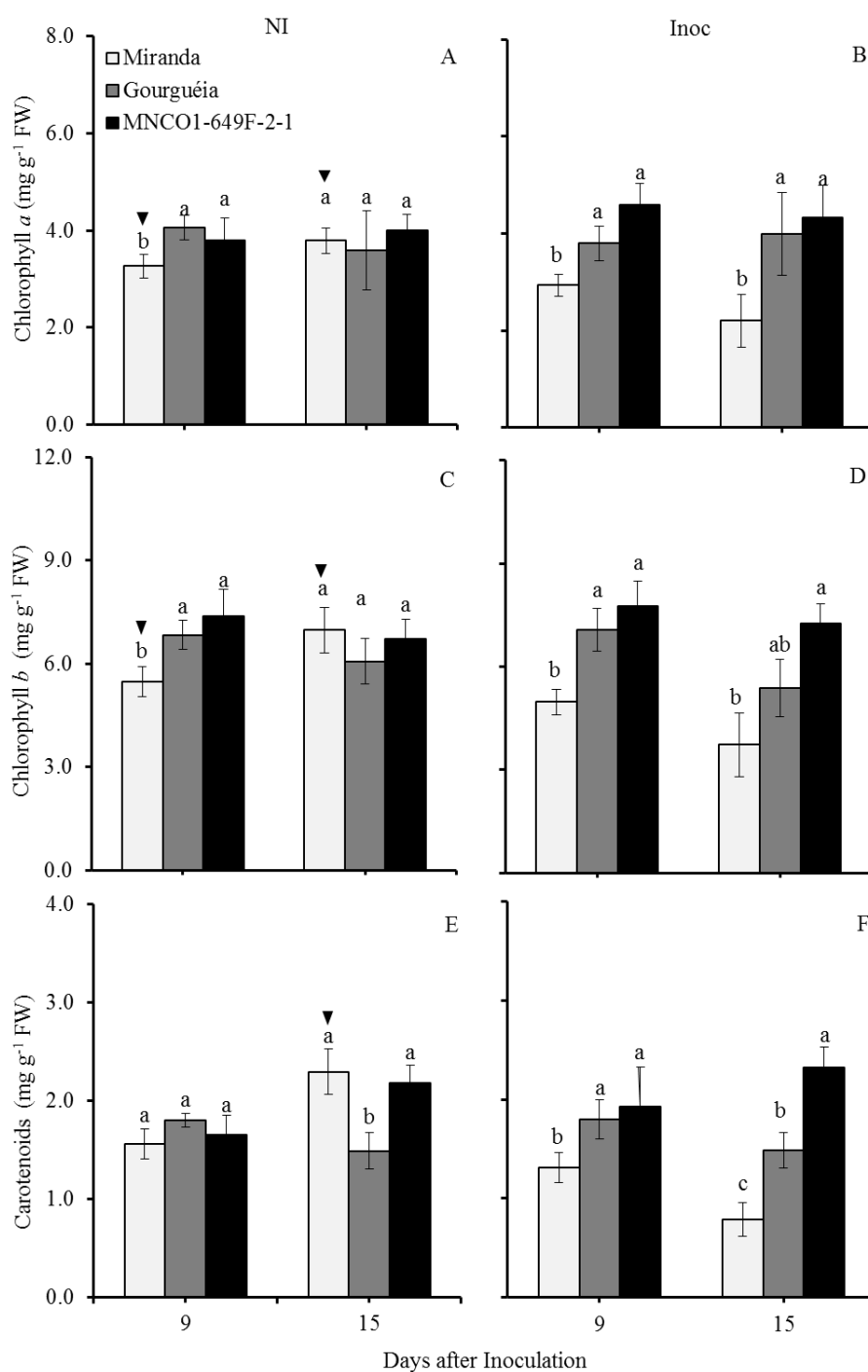


Figure 2. Concentração de clorofila (Chl) *a*, Chl *b* e carotenoides determinadas em folhas de genótipos de feijão-caupi (MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207). Plantas foram não inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. As médias dos tratamentos 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. $n = 5$.

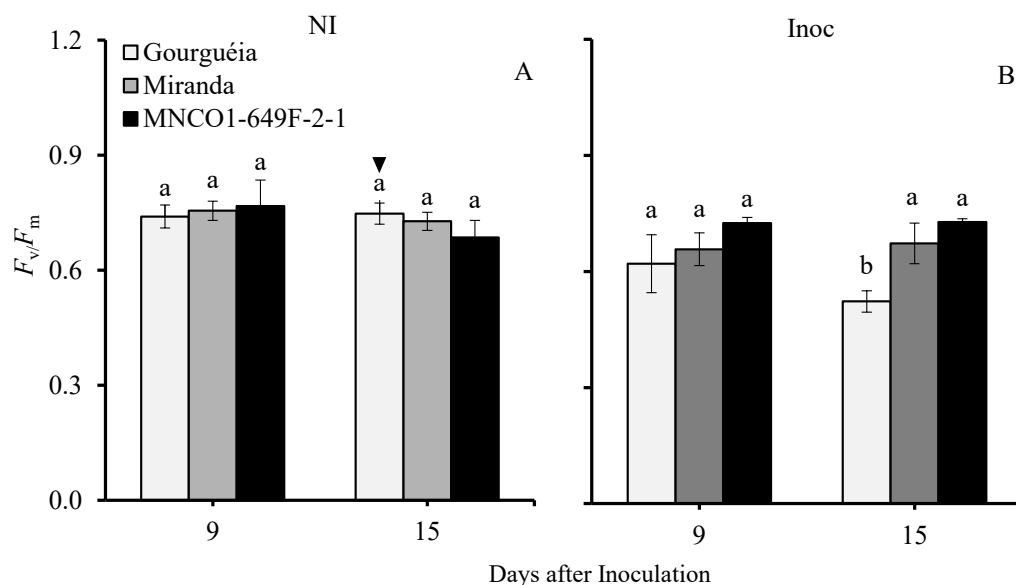


Figure 3. Valores de fluorescência (F_v/F_m) determinados em folhas de genótipos de feijão-caupi (MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207). Plantas foram não inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. As médias dos tratamentos dos genótipos dentro de 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. $n = 5$.

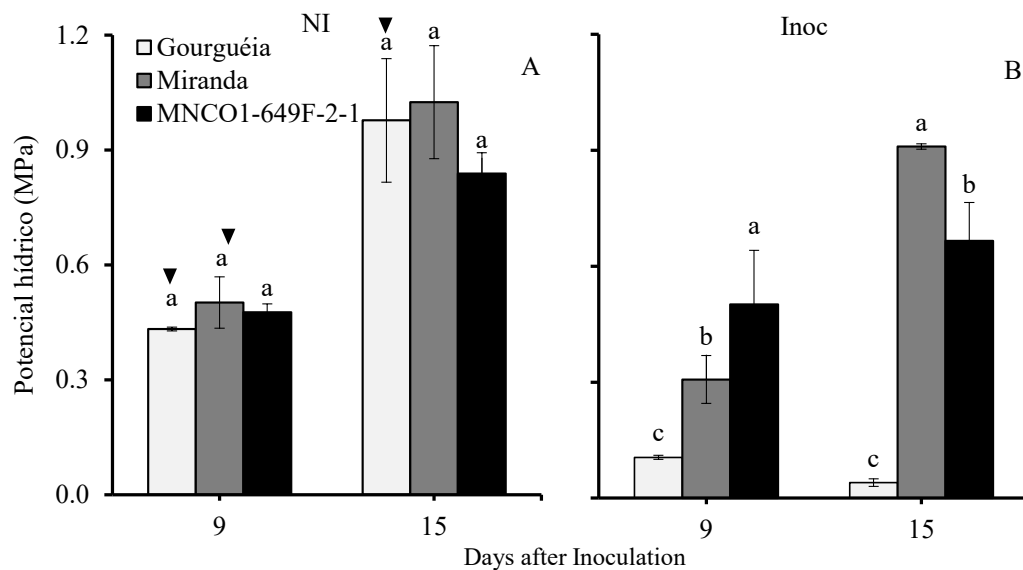


Figura 4. Potencial hídrico (Mpa) determinado em folhas de genótipos de feijão-caupi (MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207)). Plantas foram não inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. As médias dos tratamentos dos genótipos dentro de cada tempo 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.

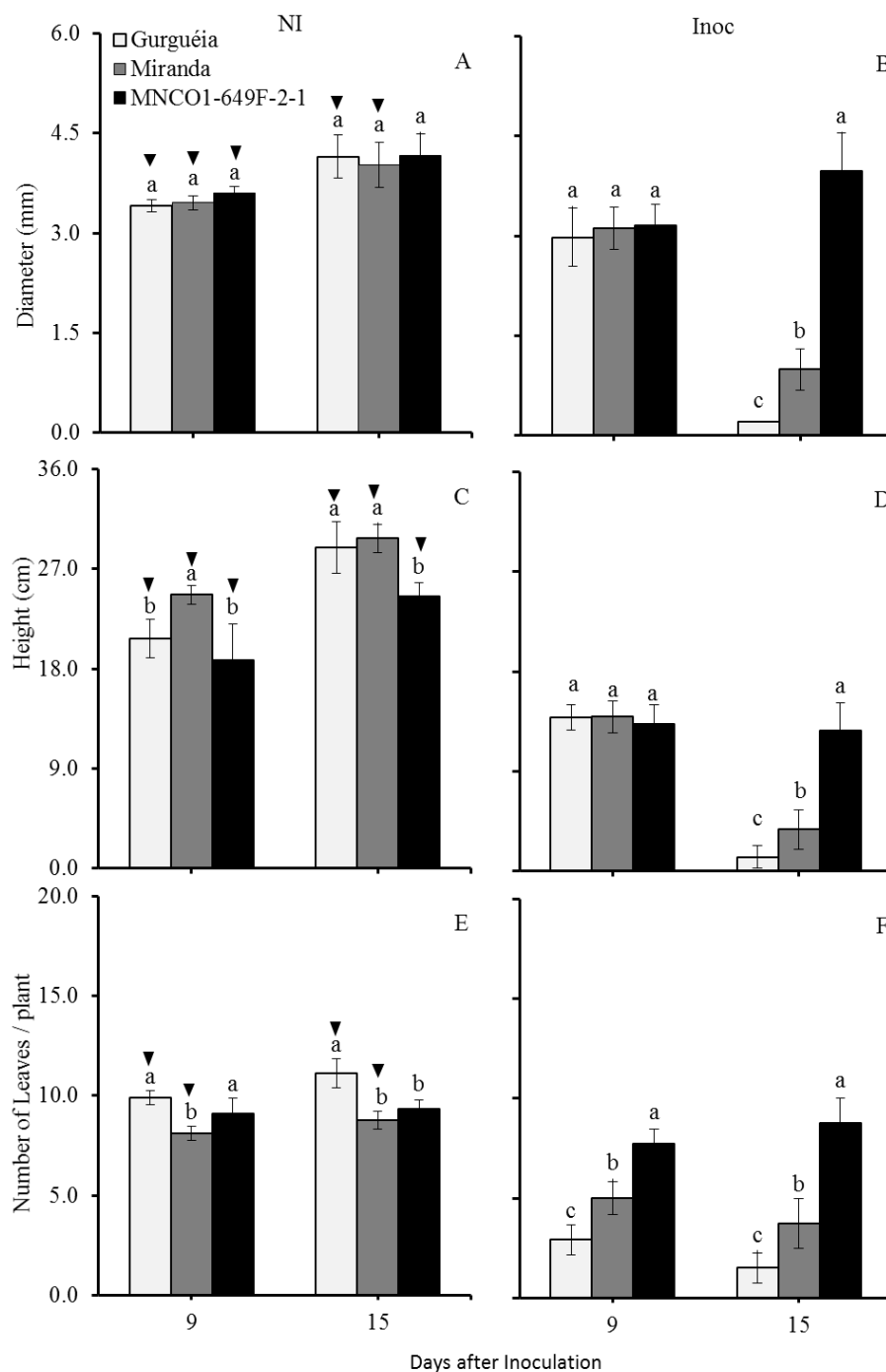
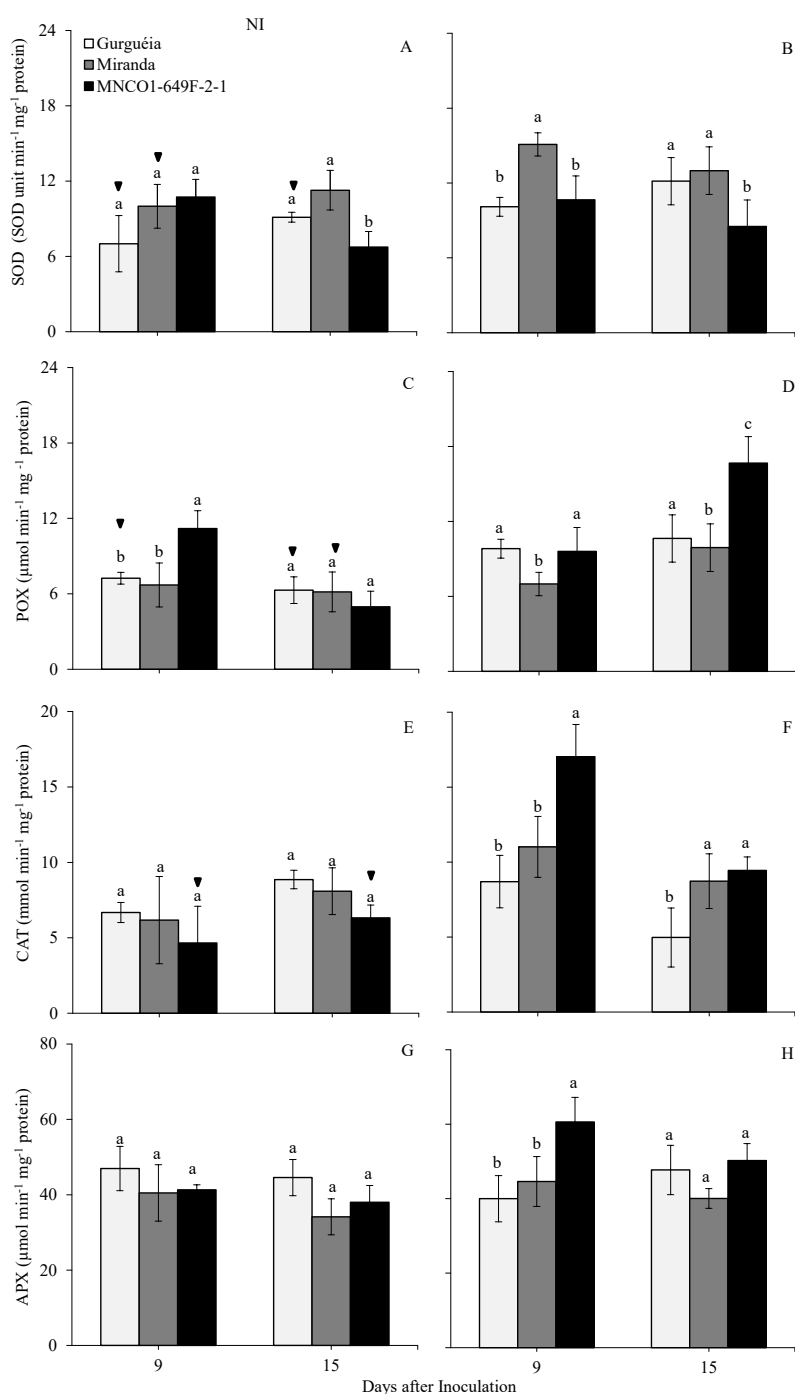


Figura 5. Diâmetro do caule (A, B), Altura das plantas (C, D) e Número de folhas por planta (E, F) dos genótipos de feijão-caupi (MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207). Plantas foram não inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. As médias dos tratamentos 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

4

5

6

7

8

9

10

Figura 6. Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A e B), peroxidase (POX) (C e D, catalase (CAT) (E e F) e ascorbato peroxidase (APX) (G e H) determinadas a partir de folhas de genótipos de feijão-caupi (MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA 207) que não foram inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *traheiphilum* foram significativamente diferente ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. As médias dos tratamentos não inoculados e inoculados 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.

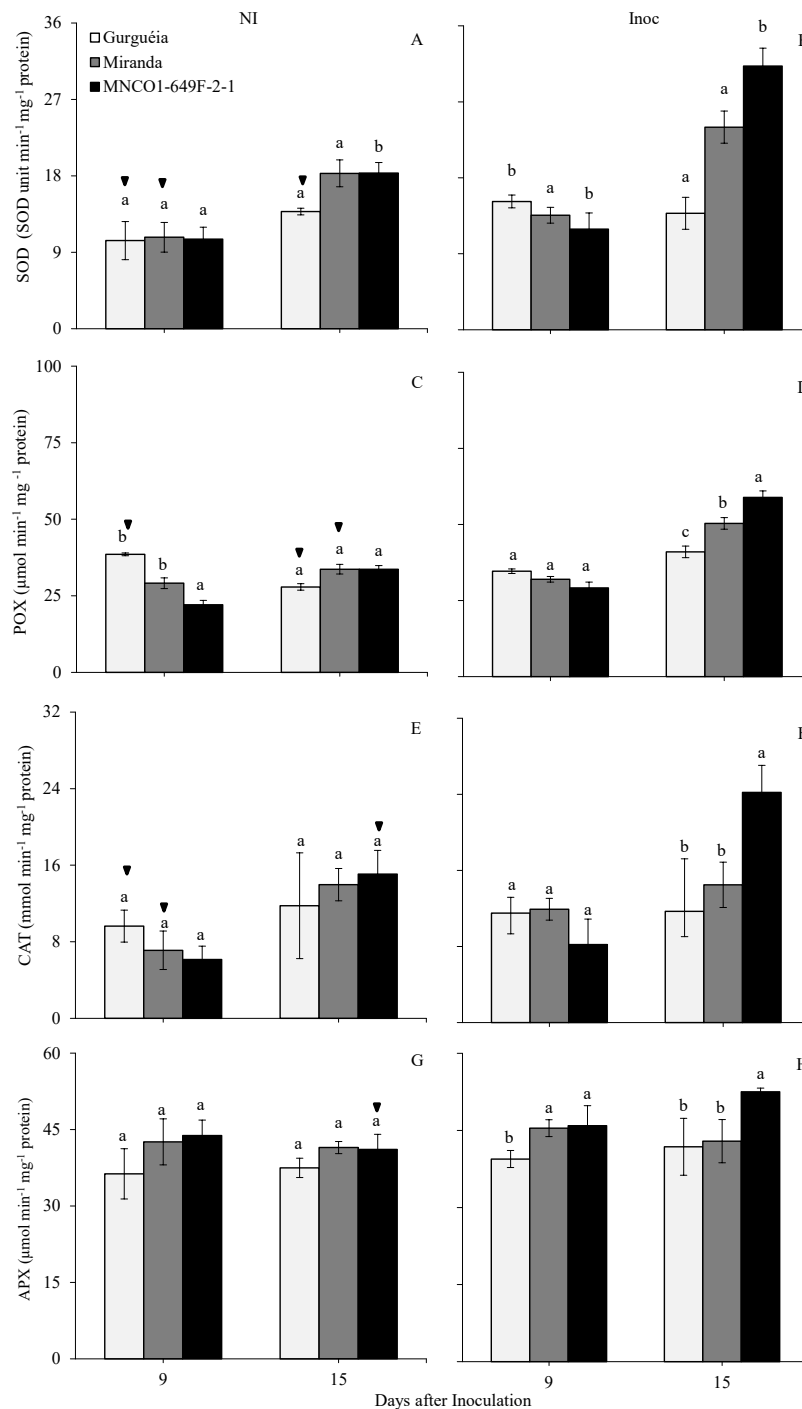


Figura 7. Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A e B), peroxidase (POX) (C e D, catalase (CAT) (E e F) e ascorbato peroxidase (APX) (G e H) determinadas a partir de raízes de genótipos de feijão-caupi (MNCO1-649F-2-1, Gurguéia e Miranda) que não foram inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *traheiphilum* foram significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. As médias dos tratamentos não inoculados e inoculados 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. $n = 5$.

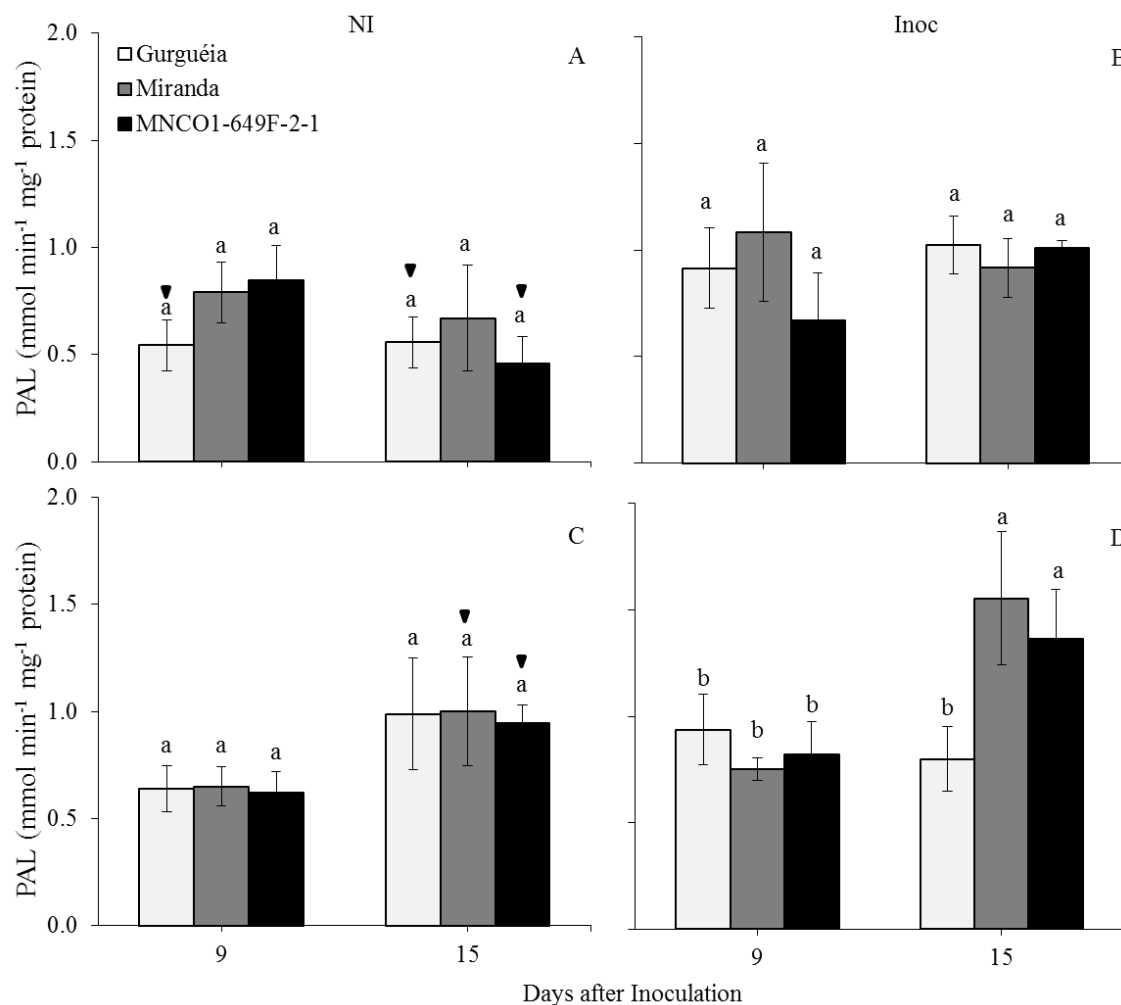


Figura 8. Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) em folhas de feijão-caupi (A, B) e raízes de feijão-caupi (C, D) dos genótipos MNCO1-649F-2-1, BR-17 Gurguéia e Miranda IPA207. Aqueles não foram inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *traheiphilum*. As médias dos tratamentos 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

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

CAPITULO IV

17



18

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

19

20

21

22

23

24

25

26

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

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

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

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

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

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

* Autor para correspondência:

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento *in vitro*

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

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

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

2.2 Experimento *in vivo*

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

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

2.2.1 Aplicação dos tratamentos e procedimentos de inoculação

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

1 conídios/mL⁻¹ com o auxílio da câmara 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.)

3. RESULTADOS

3.1. Testes *in vitro*

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

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

3.2 Experimentos *in vivo*

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

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

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

4. DISCUSSÃO

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

Para determinar a atividade antifúngica das AgNPs e CuNPs sobre *Fot* foram realizados ensaios *in vitro* onde o crescimento micelial do fungo foi avaliado por meio de diferentes 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 Ortiz-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; Ocsoy 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 Ortiz-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 cafeeiro 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

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

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

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

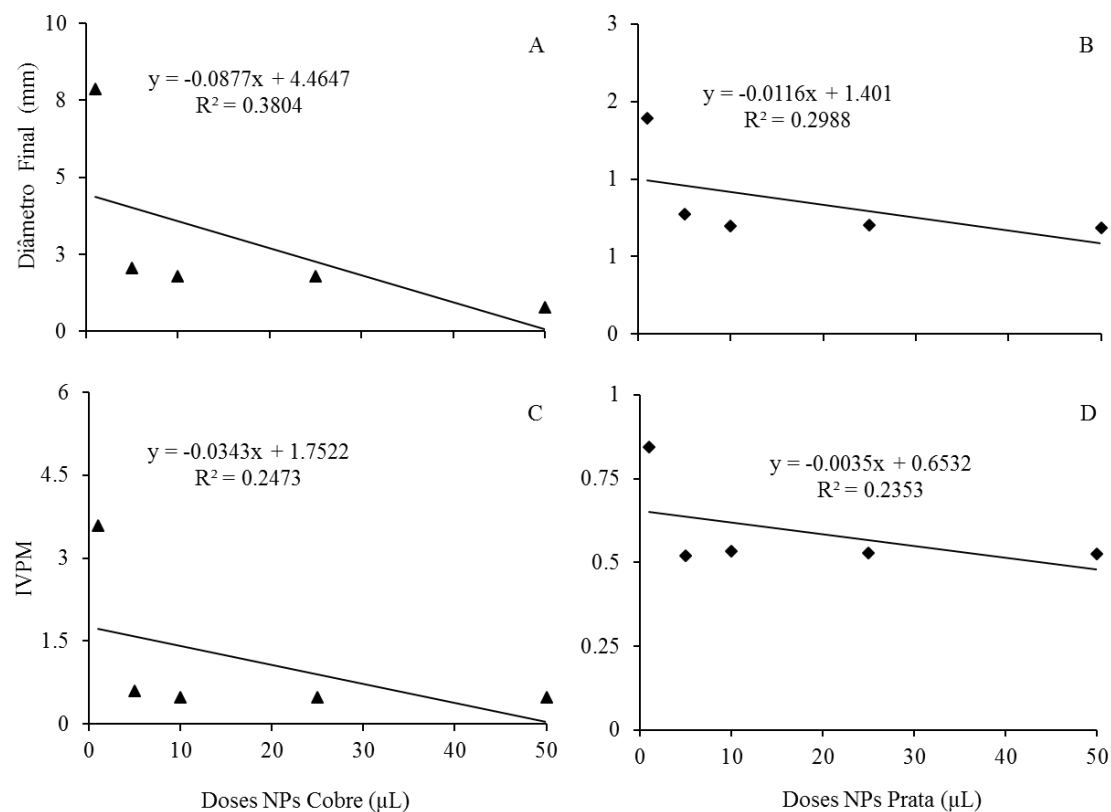
- 1 Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012)
- 2 Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant
- 3 growth metabolism. *Process Biochemistry* 47(4): 651-658.
- 4 Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim KS, Lee 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

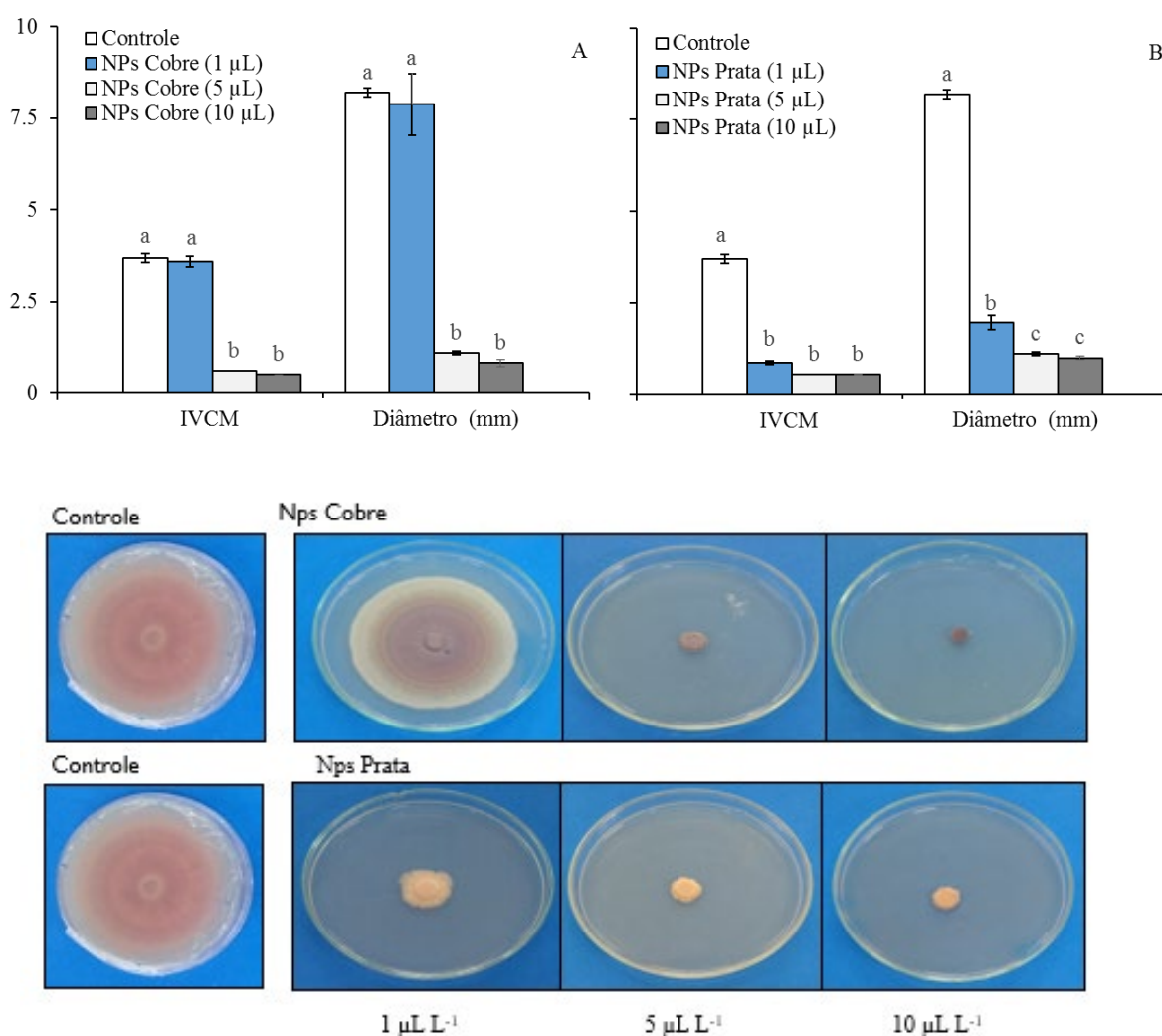


Figura 2. Efeito de Nanopartículas (NPs) de cobre (A) e NPs de prata (B) sobre o índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) e o diâmetro micelial (cm) de *Fot*. Para cada variável, as médias de cada tratamento que são seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)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

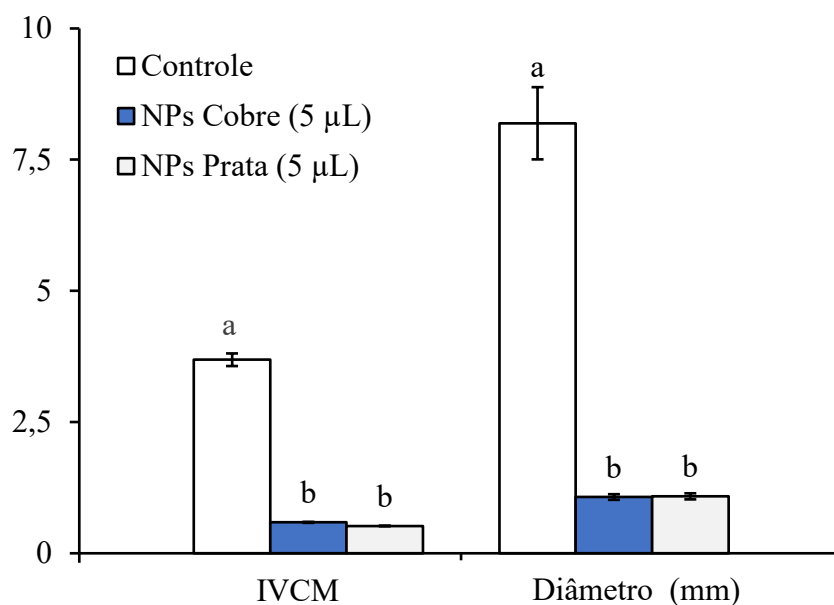
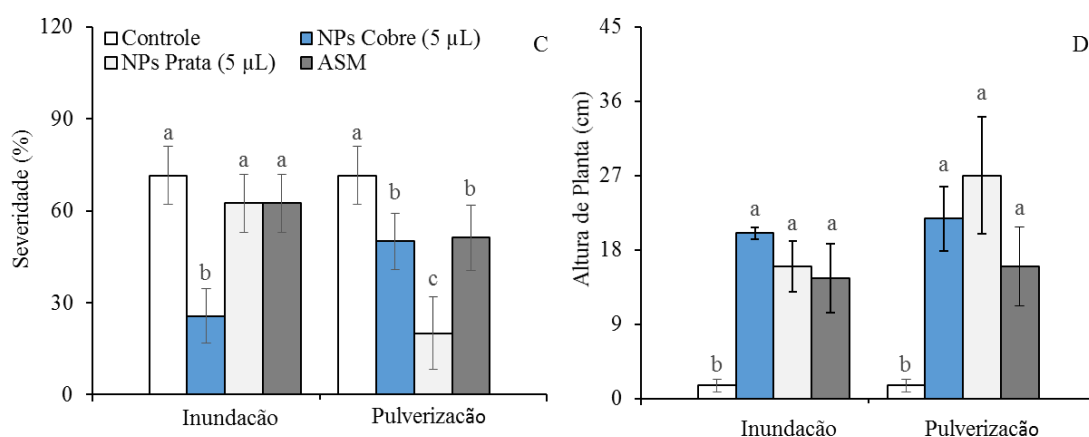


Figura 3. Efeito de Nanopartículas (NPs) de cobre (A) e NPs de prata (B) sobre o índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) e o diâmetro micelial (cm) de *Fot.* Para cada variável, as médias de cada tratamento que são seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)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

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.